

ROENICK PROVETI OLMO



Análise da resposta do vetor *Aedes aegypti* à infecção por *Dengue virus*: foco na barreira do intestino

BELO HORIZONTE - MG,
JULHO DE 2015



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioinformática

TESE DE DOUTORADO

Análise da resposta do vetor *Aedes aegypti* à infecção por *Dengue virus*: foco na barreira do intestino

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Bioinformática.

Orientado: Roenick Proveti Olmo
Orientador: Dr. João Trindade Marques
Co-orientador: Dr. Luciano Andrade Moreira

Belo Horizonte,
Julho de 2015

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer (em *Parerga und Paralipomena*, 1851).

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. João por ter me aceitado no laboratório e pacientemente ter me orientado durante a execução do projeto;

Agradeço ao Prof. Luciano por ter aberto as portas do seu laboratório e sempre prontamente nos ajudar com o que fosse necessário;

Agradeço à Profa. Fabíola pelas inúmeras contribuições e pelo agradável convívio no laboratório;

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas do Laboratório de RNAi pela colaboração científica e pelos laços de amizade formados ao longo destes 4 anos de convivência. Deixo um abraço especial aos RNAianos Ana P, Errícs, Andrews, Flebs, Isaquesson, Rrrromina e Katita;

Agradeço à Casa das Sete Mulheres, quero dizer, ao Laboratório de Neurobioquímica, por sempre serem prestativas e presentes em todos os momentos do laboratório;

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, principalmente o Prof. Vasco, Sheila, Ana Paula e Natália, por sempre nos ajudarem tão prestativamente;

Agradeço ao Laboratório de Vírus, em especial à Profa. Erna e ao João Rodrigues por todo o suporte durante estes 4 anos;

Agradeço ao grupo Mosquitos Vetores liderado pelo Prof. Luciano, em especial à Carol, Fabiano, Fernanda, Etiene, Dani, Marcelle, Eric, e todos mais que, mesmo eu não citando o nome aqui, sou grato por toda a colaboração;

Ao Prof. Jean-Luc, do CNRS-UPR9022 na França, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório durante o doutorado sanduíche, e à Carine, Akira, Simona, Francesco, Olivier, Estelle, Alice, Laurent que neste período sempre estenderam a mão cientificamente para discutir e ajudar. Agradeço também ao Florian, Magda, Laurent Troxler, Christelle, Gabriela, e Valérie, pela agradável convivência e ajudas durante minha estadia na França. Somente não agradeço aos alemães do instituto que, após o 7x1 na copa de 2014, fizeram um evento especial em nosso escritório para celebrar a vitória.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais Edison e Edna, por me encorajarem a seguir em frente mesmo quando não sabiam exatamente onde isso iria dar. E agradeço carinhosamente à minha esposa Isabella (esposa balão), que conheci no laboratório e que após rigorosas pesquisas durante o doutorado me laçou com seu jeitinho meigo e cativante. Sem o apoio, a generosidade, e a motivação deles certamente eu não teria conseguido chegar até aqui.

Sumário

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Lista de abreviaturas	iii
Resumo	5
Abstract	6
Colaborações	7
1. Introdução	9
1.1. Dengue.....	9
1.1.1. Epidemiologia.....	10
1.1.2. Ciclo de transmissão.....	12
1.1.3. <i>Dengue virus</i>	14
1.2. Mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	15
1.3. A infecção do mosquito pelo DENV.....	17
1.3.1. Barreiras à infecção e disseminação viral.....	18
1.3.2. Imunidade antiviral mediada por RNAi.....	19
1.3.3. Imunidade inata.....	22
2. Justificativa	26
3. Objetivos	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. Material e Métodos	30
4.1. Obtenção dos estoques virais.....	30
4.2. Manutenção das colônias de mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	31
4.3. Infecção por alimentação dos mosquitos com DENV.....	32
4.4. Procedimento para infecção por microinjeção em mosquitos.....	33
4.5. Extração do RNA total de mosquitos	34
4.6. Quantificação relativa da abundância de RNAs virais e do hospedeiro.....	35
4.6.1. Transcrição reversa (RT)	35
4.6.2. Transcrição reversa fita específica.....	35
4.6.3. Desenho dos iniciadores	36
4.6.4. PCR quantitativo (qPCR)	37
4.6.5. PCR quantitativo (qPCR)	37
4.7. Imunohistoquímica	38
4.8. Silenciamento gênico	39
4.9. Controle de qualidade do RNA para construção das bibliotecas.....	40
4.10. Construção e sequenciamento das bibliotecas.....	41
4.10.1. RNAs de baixo peso molecular	41
4.10.2. Transcriptoma	41
4.11. Processamento das bibliotecas.....	42
4.11.1. Pré-processamento das bibliotecas de pequenos RNAs	42
4.11.2. Pré-processamento das bibliotecas de transcriptoma	42

4.12. Análise dos pequenos RNAs.....	42
4.13. Análise das bibliotecas de transcriptoma	43
4.13.1. Mapeamento e estimacão da abundância dos transcritos	43
4.13.2. Análise de enriquecimento GSEA	44
5. Resultados e Discussão	47
5.1. Caracterizacão da infecção de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> pelo DENV.....	47
4.2. Influência da barreira do intestino na infecção pelo DENV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	52
4.3. Caracterizacão celular e molecular da cinética de infecção pelo DENV-4 no mosquito <i>Ae. aegypti</i>	54
4.3.1. Marcadores da replicacão viral nos mosquitos infectados com DENV	59
4.3.2. Caracterizacão da infecção DENV-4 em intestinos de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> por microscopia de fluorescência	60
4.4. Influência da via de RNAi na infecção de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> pelo DENV	65
4.4.1 Efeito da via de siRNA na susceptibilidade dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> ao DENV	65
4.4.2 - Análise do repertório de pequenos RNAs de origem viral durante a infecção pelo DENV no mosquito <i>Ae. aegypti</i>	69
4.5. Análise da resposta transcricional do mosquito <i>Ae. aegypti</i> à infecção pelo DENV no intestino	75
4.6. Modelo da infecção viral pelo DENV no mosquito <i>Ae. aegypti</i>	81
5. Conclusões	87
6. Perspectivas	89
7. Referências bibliográficas.....	91
8. Anexos	104

Lista de figuras

Figura 1 – Sinais clínicos e sintomas observados após a infecção pelo vírus da Dengue.	10
Figura 2 – Cartograma do número anual de infecções por Dengue para todas as idades proporcional à área geográfica nacional ou parte dela	12
Figura 4 – Ciclo de transmissão urbano e silvestre do <i>Dengue virus</i> .	13
Figura 4 – Representação esquemática do genoma do <i>Dengue virus</i> .	14
Figura 5 – Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	16
Figura 6 – Rota migratória do DENV após repasto sanguíneo pelo mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	18
Figura 7 – Vias de RNA de interferência no modelo <i>D. melanogaster</i> .	20
Figura 8 – Vias de imunidade inata no modelo <i>D. melanogaster</i> .	23
Figura 9 – Correlação da quantificação viral por pfu e RT-qPCR durante a infecção pelo DENV.	48
Figura 10 – A quantidade de vírus ingerido é essencial para o DENV infectar o mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	49
Figura 11 – A quantidade de vírus injetado não interfere na infecção em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .	53
Figura 12 – Cinética da infecção pelo DENV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .	55
Figura 13 – Correlação da quantificação da carga do DENV quantificado por RT-qPCR e por unidades formadoras de placa nos tempos iniciais à infecção.	57
Figura 14 – Detecção fita específica do DENV em mosquitos infectados por alimentação.	59
Figura 15 – Tropismo do DENV-4 no intestino do mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	61
Figura 16 – Prevalência da infecção em intestinos de mosquitos infectados pelo DENV-4.	62
Figura 17 – Organização estrutural do intestino do mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	64
Figura 18 – Silenciamento transiente do gene AGO2 em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .	66
Figura 19 – Cinética de crescimento do DENV em mosquitos deficientes para a via de siRNA.	68
Figura 20 – Distribuição de tamanho das sequências de pequenos RNAs que mapeiam no genoma do DENV-4.	71
Figura 21 – Correlação do sinal de RT-qPCR pela densidade média dos vsRNAs de DENV.	72
Figura 22 – Distribuição de tamanho das sequências de pequenos RNAs derivadas do DENV em mosquitos injetados.	73
Figura 23 – Vias ou processos biológicos modulados durante a infecção pelo DENV-4 em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .	78
Figura 24 – Modelo da resposta à infecção pelo DENV no mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	83

Lista de tabelas

Tabela 1 – Título viral e origem das amostras de <i>Dengue vírus</i>	31
Tabela 2 – Iniciadores para detecção da carga viral e expressão gênica.	37
Tabela 3 – Iniciadores para a amplificação dos moldes para síntese dos dsRNA.	40
Tabela 4 – Comparação da susceptibilidade de diferentes populações de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> à infecção pelo DENV-4.	50
Tabela 5 – Número de focos de infecção por região do intestino com 4 dpf.	63
Tabela 6 – Resumo das bibliotecas de pequenos RNAs.	70
Tabela 7 – Resumo das bibliotecas de transcriptoma.	76

Lista de abreviaturas

- BSA – Soro albumina bovina
- cDNA – DNA complementar
- CHIKV – *Chikungunya virus*
- CV – competência vetorial
- DENV – *Dengue virus*
- DH – Dengue hemorrágica
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- dNTP – dideoxynucleotídeos
- dpf – dias após a alimentação
- dpi – dias após a injeção
- dsRNA – *double stranded RNA*
- dsRNA – RNA de dupla fita
- DTT – ditionitrito
- EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético
- FLUC – *Firefly* luciferase
- FPKM – fragmentos por kilobase de exons por milhão se sequências mapeadas
- HCV – *Hepatitis C virus*
- JEV – *Japanese Encephalitis virus*
- Kb – kilobases
- MEB – Barreira de escape do intestino
- MIB – Barreira de infecção do intestino
- moi – multiplicidade de infecção
- nt – nucleotídeo(s)
- ONNV – *O'nyong-nyong virus*
- PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
- PAHO – Organização Pan-Americana de Saúde
- PBS – tampão fosfato-salino
- PCR – reação em cadeia da polimerase
- PFA – paraformaldeído
- pfu – unidades formadoras de placa
- PIE – período de incubação extrínseco

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa

QTL – *Quantitative Trait Loci*

RE – retículo endoplasmático

RNA – ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RPM – sequências por milhão

RT – transcrição reversa

RT-PCR – transcrição reversa seguida de PCR

SFB – soro fetal bovino

TA – temperatura ambiente

TB – barreira de transmissão

UTR – região não traduzida

WHO – *World Health Organization*

WNV – *West Nile virus*

YFV – *Yellow Fever virus*

Resumo

A Dengue, causada pelo *Dengue virus* (DENV), é uma das mais importantes doenças infecciosas no mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que ocorram 100 milhões de casos sintomáticos por ano e que 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de infecção ao redor do globo. No momento, não há vacina ou tratamentos efetivos para a Dengue, o que reforça a necessidade de combater a transmissão do vírus feita principalmente por mosquitos vetores *Aedes aegypti*. Após o repasto sanguíneo no indivíduo com Dengue, o sucesso da infecção do mosquito pelo DENV requer que o vírus ultrapasse importantes barreiras à infecção, sendo a principal no intestino. Somente após atravessar com sucesso as barreiras do intestino, o vírus é exposto às outras barreiras sistêmicas. Neste trabalho, nós desenvolvemos modelos de infecção em laboratório para analisar as diferentes barreiras à infecção utilizando gerações F₂ de mosquitos *Ae. aegypti* de campo. Nós observamos em uma mesma população de mosquitos, que 4 dias após a alimentação com sangue contaminado com DENV, é possível diferenciar grupos distintos de indivíduos baseado na carga viral. No primeiro grupo, não há carga viral detectada nos mosquitos, no segundo observamos uma baixa carga viral que é constante ao longo da cinética da infecção, e um terceiro grupo que desenvolve altas cargas virais que aumentam ao longo dos tempos testados. Considerando o terceiro grupo como sendo o único a ter uma infecção produtiva, nós mostramos que a prevalência da infecção é dependente do genótipo viral e do título do vírus no sangue além de fatores intrínsecos de cada população de mosquitos. Contudo, quando o vírus é injetado no mosquito observamos 100% de prevalência da infecção mesmo com a menor dose de ~1 pfu do DENV por mosquito. Estes resultados sugerem que a barreira do intestino é o principal determinante do sucesso da infecção e depende tanto de fatores virais quanto do hospedeiro. Como a principal via de defesa antiviral em insetos baseia-se na produção de pequenos RNAs interferentes (siRNA), nós fizemos o sequenciamento em larga escala dos RNAs dos grupos de mosquitos de acordo com a carga viral. Nossos resultados mostraram um número crescente de pequenos RNAs de origem viral somente no grupo com alta carga viral correlacionando com a replicação viral. Estes resultados sugerem que as barreiras do intestino são independentes da via de RNAi. Assim, nós investigamos quais outras vias e processos biológicos poderiam estar potencialmente envolvidos no fenótipo de resistência/susceptibilidade observado nos diferentes grupos de mosquitos. Para isto, nós analisamos o transcriptoma de insetos inteiros ou intestinos dos grupos com alta carga viral comparados aos grupos com carga viral não detectada, 4 dias após a alimentação. Nos mosquitos susceptíveis com alta carga viral, nós observamos a ativação do catabolismo de lipídeos sistêmico e processos relacionados à ativação metabólica no intestino. A ativação destas vias sugere que este é um ambiente ideal para favorecer a replicação do DENV no intestino. Em contraste, nestes mosquitos, as vias de RNAi e Toll parecem ser ativadas sistemicamente para o controle da infecção após a disseminação do intestino. Assim, de maneira paradoxal, a ativação destas vias se correlaciona com a replicação viral ativa. Em contraste, nos mosquitos refratários à infecção onde não houve replicação viral detectada, nós observamos vias biológicas que sugerem replicação celular ativa que podem estar relacionadas ao estabelecimento das barreiras do intestino. Apesar do mecanismo não estar claro, nosso trabalho estabelece novas perspectivas e alvos potenciais para novas estratégias de intervenção no mosquito vetor. Entender as interações vírus-hospedeiro é essencial para o combate à transmissão do DENV e outras arboviroses por mosquitos vetores. Além disto, nosso trabalho sugere que novos marcadores moleculares podem ser utilizados para determinação de resistência e susceptibilidades à infecção em populações naturais de mosquitos.

Abstract

Dengue, caused by *Dengue virus* (DENV), is one of the most important human infectious diseases in the world. The World Health Organization estimates 100 million symptomatic cases per year and 2.5 billion people are at risk of infection worldwide. There are no available vaccines and no effective treatment for Dengue, which reinforces the need for strategies to prevent virus transmission by the main vector *Aedes aegypti*. When the mosquito feeds on viremic individual, successful systemic infection requires that the virus go through barriers. The major barriers seem to be at the midgut level. Successful crossing of the midgut barriers then exposes the virus to other systemic barriers. Here, we developed infection models in the laboratory to analyze different barriers of infection in F₂ generation of wild *Ae. aegypti* mosquitoes. We observed that upon feeding on DENV contaminated blood different mosquito groups can be distinguished in terms of viral load after 4 days post infection, regarding the same original population. In the first, no viral load is detected; in the second, viral RNA levels remain low but constant throughout the time-course of infection; and in the third, we observe high viral loads that increase over the tested time points. Considering the third group as the only successfully infected individuals, the prevalence of infection relies on viral load in blood meal, the viral genotype and intrinsic mosquito population factors. In contrast, when mosquitoes were injected, we observed that 100% of individuals became infected even at low doses of ~1 pfu per mosquito. These results suggest the midgut barriers are the main determinant of a successful infection and are affected by viral and host features. As the small interfering RNA (siRNA) pathway is a major antiviral defense in insects we performed high-throughput small RNA sequencing from different viral load mosquito groups. Deep-sequencing data shows an increasing number of virus-derived small RNAs over time only in high viral load group that correlates with productive virus replication. These data suggest that the midgut barriers act in an RNAi independent manner. We also investigated which other pathways or biological processes can be potentially involved in the resistance/susceptibility phenotype comparing high viral load or undetected mosquitoes groups by transcriptomic analysis of whole insects and midguts 4 days post feeding. In high viral load susceptible mosquitoes we observed systemic activation of lipid catabolism while in midgut were observed processes related to metabolic activation. This suggests a favorable environment for viral growth in the midgut. In contrast, RNAi and Toll pathways are only activated systemically controlling the disseminated infection. Paradoxically active viral replication correlates the activation of these pathways. Nevertheless, we observed processes related to high cellular replication rates in mosquitoes with undetectable viral load that may be involved on the establishment of midgut barriers. Besides the unclear mechanism, our work sets new potential targets and perspectives for intervention strategies in the vector mosquito. The understanding of virus-host interactions could help lead to new ways to control transmission of DENV and other insect borne viruses in mosquitoes. Altogether, our work suggests new molecular markers that can be used for resistance or susceptibility determination of wild populations of mosquitoes.

Colaborações

Para a realização deste trabalho nós desenvolvemos colaborações entre diversos laboratórios, e o resultado foi um esforço que sempre convergiu para o auxílio mútuo e troca de experiências. Com o Laboratório de Vírus (LabVírus), vinculado ao departamento de microbiologia da UFMG e é liderado pela Dra. Erna Kroon, nós obtivemos o DENV-4, as linhagens celulares, e também alguns suprimentos. Com o laboratório de Mosquitos Vetores no Centro de Pesquisas René Rachou, liderado pelo Dr. Luciano Moreira, obtivemos os mosquitos, e também realizamos todas as infecções de mosquitos com o vírus da Dengue. Com o laboratório de Virologia Molecular do ICC/Fiocruz-PR, liderado pela Dra. Cláudia Duarte dos Santos, e com o auxílio do Dr. Juliano Bordignon, nós obtivemos o clone viral DENV-1 BR/90, e também o anticorpo 4G2 para detecção do envelope viral do DENV. Por último e não menos importante, na unidade de pesquisa *Réponse immunitaire et développement chez les Insectes* – UPR9022 – CNRS – França, fiz meu estágio de doutorado sanduíche no grupo do Dr. Jean-Luc Imler, líder do grupo *Réactions antivirales*. Neste período preparei as bibliotecas de pequenos RNAs e de transcriptoma, aprendi sobre o modelo *Drosophila* e avancei nas análises de bioinformática, sempre auxiliado pelo Prof. João e também pelo aluno de doutorado Eric Aguiar, também vinculado ao programa de doutorado em bioinformática da UFMG.

Cabe ressaltar que durante os 4 anos do doutoramento vi o laboratório de RNA de interferência, ao qual faço parte, desenvolver-se a passos largos fisicamente e intelectualmente. Nosso grupo cresceu neste período, e todos que dele fazem e fizeram parte auxiliaram de alguma forma para este trabalho, seja intelectualmente ou colaborando diretamente com experimentos e experiências.

1. Introdução

Algumas das mais importantes doenças humanas são transmitidas por vetores, que são comumente artrópodes hematófagos, como mosquitos ou carrapatos. Doenças transmitidas por vetores causam alta mortalidade e morbidade em humanos, sendo uma ameaça tanto para países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Hill, Kafatos et al. 2005). Das doenças transmitidas por artrópodes, destacamos as arboviroses que são causadas pelos arbovírus. O termo arbovirus vem da expressão do inglês '*arthropod-borne viruses*', e foi introduzido em 1942 para designar os vírus que requerem um vetor artrópode para que haja transmissão para o hospedeiro vertebrado (WHO 1985). A principal arbovirose humana é atualmente a Dengue.

1.1. Dengue

A dengue é uma enfermidade viral infecciosa, transmitida por mosquitos, tendo como agente etiológico o *Dengue virus* (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). Desta família também pertencem os vírus causadores da Febre Amarela (YFV – *Yellow Fever virus*), Encefalite Japonesa (JEV – *Japanese Encephalitis virus*), Encefalite do Nilo Ocidental (WNV – *West Nile virus*) e Hepatite C (HCV – *Hepatitis C virus*) (Burke and Monath 2001). A dengue possui diversas apresentações clínicas, sendo o curso da infecção no humano iniciado normalmente com um quadro febril autolimitante, que pode agravar-se com hemorragias e um quadro de choque hipovolêmico, conhecido como Síndrome do choque da Dengue (Figura 1). O agravamento da doença acontece principalmente nos casos de infecções recorrentes por diferentes sorotipos (Halstead 1979, Lindenbach, Thiel et al. 2001).

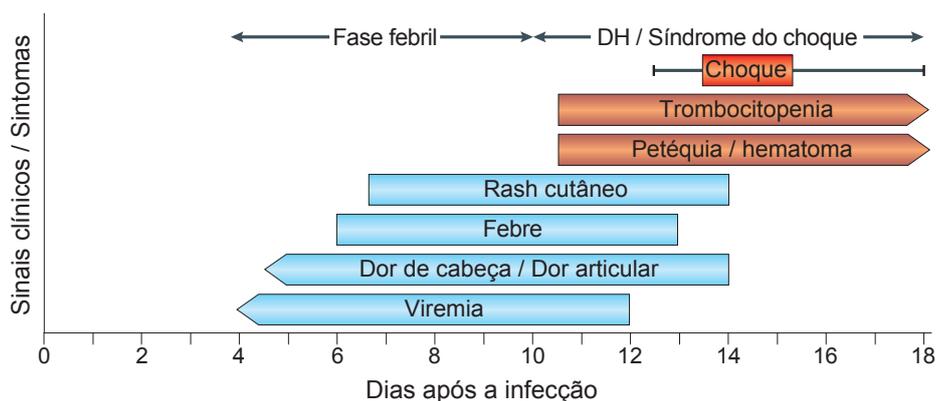


Figura 1 – Sinais clínicos e sintomas observados após a infecção pelo vírus da Dengue. A figura mostra o curso dos eventos associados à Febre da Dengue, à Dengue Hemorrágica e à Síndrome do Choque da Dengue. O período de incubação antes do aparecimento dos sintomas geralmente varia de 4 a 7 dias. O choque hipovolêmico pode acontecer no último estágio da doença, e pode durar de 1 a 2 dias. Adaptado de Whitehead, Blaney et al. (2007).

1.1.1. Epidemiologia

Os mais antigos registros de uma doença com características compatíveis à Dengue são datados do ano 992 e foram feitos na enciclopédia médica Chinesa (Gubler 2006). No entanto, os primeiros registros epidemiológicos bem documentados de casos que possivelmente sejam de dengue foram feitos em 1779-1780 na Ásia, África e América do Norte, sugerindo que o inseto vetor já havia espalhado antes do fim do século 17 (Guzman and Isturiz 2010). Durante a Segunda Guerra Mundial os dois primeiros sorotipos de DENV foram isolados no Japão e no Havaí, seguido do isolamento dos outros dois sorotipos em 1954 (Hotta 1952, Hammon, Rudnick et al. 1960).

Mudanças ecológicas e demográficas causadas pela Segunda Guerra Mundial facilitaram tanto o espalhamento do mosquito vetor quanto do DENV na Ásia (Gubler 2006). Destas destacam-se a urbanização descontrolada, falta de gerenciamento na deposição adequada do lixo humano, falta de saneamento básico e ineficientes ou mesmo ausentes políticas públicas de controle de mosquitos vetores, que favoreceram a

multiplicação intensa do mosquito. Estes fatores auxiliaram a expansão geográfica do DENV, fazendo a incidência de dengue aumentar 30 vezes nos últimos 50 anos (WHO 2009).

Durante o período de 1923 até 1980 o Brasil não registrou casos de dengue em seu território (Nobre, Antezana et al. 1994, Braga and Valle 2007). Porém com o relaxamento nas políticas de controle, em 1976 o mosquito vetor foi reintroduzido no país possivelmente a partir de Salvador, no estado da Bahia (Franco 1976). Neste período, em países vizinhos ao Brasil como Venezuela, Colômbia, Suriname, e Caribe já registravam casos de transmissão do DENV. Em 1981, os sorotipos 1 e 4 do DENV foram os primeiros a serem isolados numa epidemia ocorrida em Boa Vista, estado de Roraima (Osanai, Travassos da Rosa et al. 1983). Em pouco tempo ambos os sorotipos do DENV invadiram a região Sudeste e Nordeste do Brasil, com a introdução subsequente dos sorotipos 2 e 3 nos anos 1990 e 2001, respectivamente (Schatzmayr, Nogueira et al. 1986, Nogueira, Zagner et al. 1991, Nogueira, Miagostovich et al. 2001).

Atualmente a dengue é a arbovirose de maior importância médica no mundo, sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 2), com as Américas e a Ásia como principais zonas de risco de contágio (Bhatt, Gething et al. 2013). É estimado que por volta de 3,6 bilhões de pessoas, mais da metade da população do globo, vivam em áreas de risco de infecção pelo DENV. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram de 50 a 100 milhões de infecções por ano (WHO 2012), no entanto recentes estimativas indicam que o número total de infecções (aparentes e não aparentes) possa atingir 390 milhões de pessoas por ano (Bhatt, Gething et al. 2013).

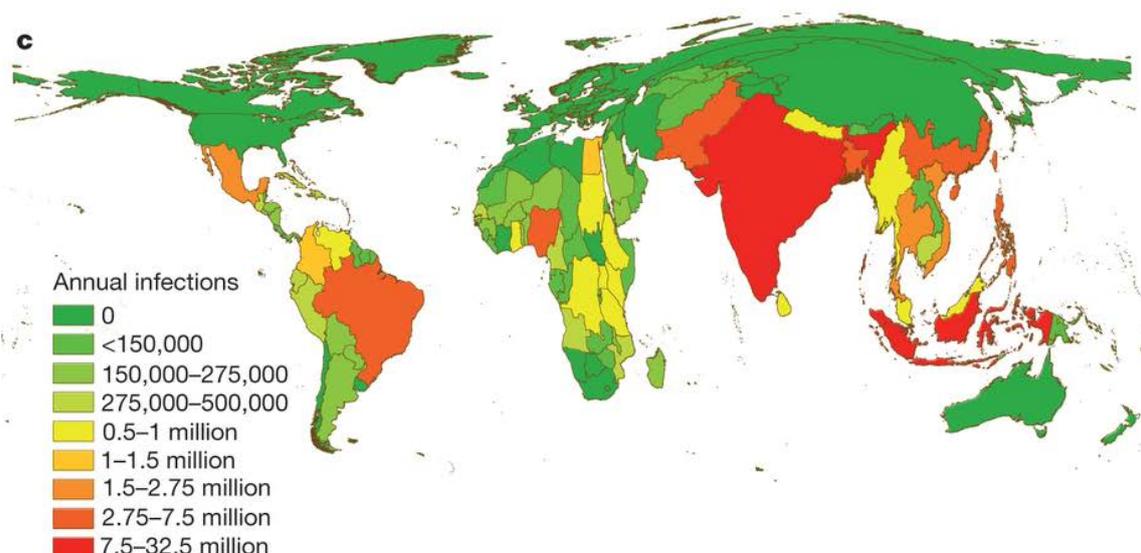


Figura 2 – Cartograma do número anual de infecções por Dengue para todas as idades proporcional à área geográfica nacional ou parte dela (China). Fonte: Bhatt, Gething et al. (2013).

Nas Américas, segundo o boletim epidemiológico n° 24 (Julho/2015) da Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO), foram notificados 1.473.965 casos de dengue nas américas no ano de 2015, tendo o Brasil contribuído com 84,5% dos casos (1.244.842 notificações). Ainda segundo a PAHO, no Brasil há o registro da circulação concomitante dos 4 sorotipos do DENV, e neste ano já foram atribuídas à esta infecção viral um total de 529 mortes. O custo anual total da dengue nas Américas foi estimado em 2,1 bilhões de dólares entre 2000 e 2007, contando somente para o Brasil 878 milhões de dólares (Shepard, Coudeville et al. 2011).

1.1.2. Ciclo de transmissão

O DENV possui ciclos de transmissão em áreas urbanas e em áreas silvestres. No ciclo urbano, os principais vetores para o DENV são mosquitos do gênero *Aedes*, particularmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Gubler 1998, Wang, Ni et al. 2000). O *Ae. aegypti* é normalmente encontrado próximos à habitações humanas, e suas larvas são

encontradas em recipientes capazes de acumular água como pneus, baldes, e jarros de plantas (WHO 2009). Outras espécies do mosquito estão relacionadas com a transmissão no ciclo silvestre envolvendo principalmente primatas não humanos (Figura 3), que apresentam infecções assintomáticas (Hanley, Monath et al. 2013).

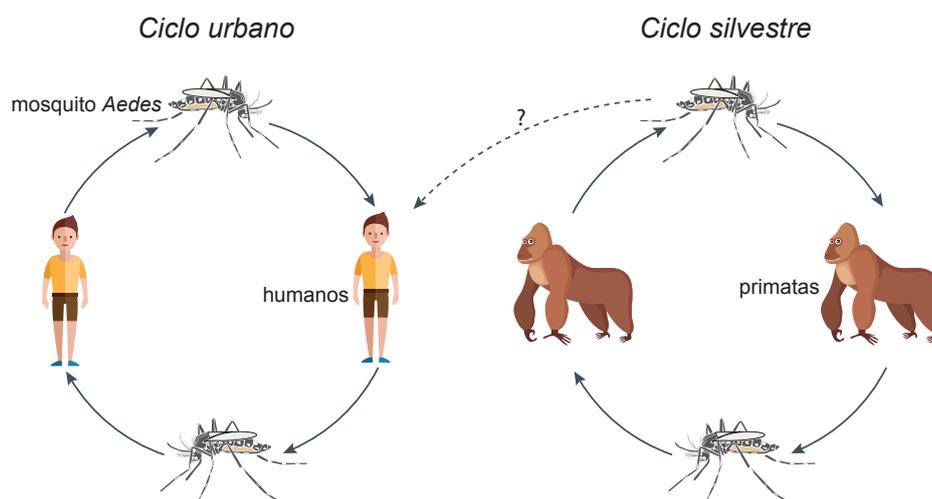


Figura 3 – Ciclo de transmissão urbano e silvestre do *Dengue virus*. No ciclo urbano o DENV é transmitido eficientemente entre humanos e mosquitos sem a necessidade de um hospedeiro intermediário. O ciclo silvestre da dengue foi descrito na África ocidental e sudeste Asiático. Diferente da Febre amarela, o impacto da interação entre os ciclos silvestre e urbano da dengue é desconhecido, mas sugere ser mínimo. Adaptado de Whitehead, Blaney et al. (2007).

O ciclo de transmissão DENV inicia-se com a picada de fêmeas do mosquito, que entram em contato com o vírus ao alimentarem do sangue de indivíduos infectados. O vírus inicialmente infecta as células do esôfago e intestino do mosquito (Beerntsen, James et al. 2000), e após um período que pode variar de 8 a 12 dias (WHO 2009), atinge as células da glândula salivar, tornando o mosquito apto a transmitir o DENV. Este período compreendido entre o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado e o mosquito tornar-se infeccioso é chamado de período de incubação extrínseco (Chan and Johansson 2012). Há relatos da transmissão vertical do DENV, na qual as fêmeas transmitem o DENV aos ovos por passagem transovariana. Este evento não possui significância epidemiológica conhecida, dado ocorrer em baixíssimas taxas na natureza

(Gunther, Martinez-Munoz et al. 2007, Martinez, Dzul-Manzanilla et al. 2014, Vikram, Nagpal et al. 2015).

1.1.3. Dengue virus

O DENV é um vírus envelopado medindo 40-50 nm de diâmetro, cujo genoma de RNA fita simples com senso positivo tem tamanho de aproximadamente 10,7 Kb (Figura 4). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é clivada dando origem a 3 proteínas estruturais (capsídeo [C], pre-membrana/membrana [prM/M] e envelope [E]) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – do inglês *nonstructural*) por proteases do hospedeiro e proteases codificadas pelo vírus (Lindenbach, Thiel et al. 2001). Geneticamente, existem 4 sorotipos com propriedades antigênicas distintas, designados DENV-1, -2, -3 e -4, que apresentam até 30% de divergência entre suas poliproteínas (revisado por Holmes and Twiddy 2003).

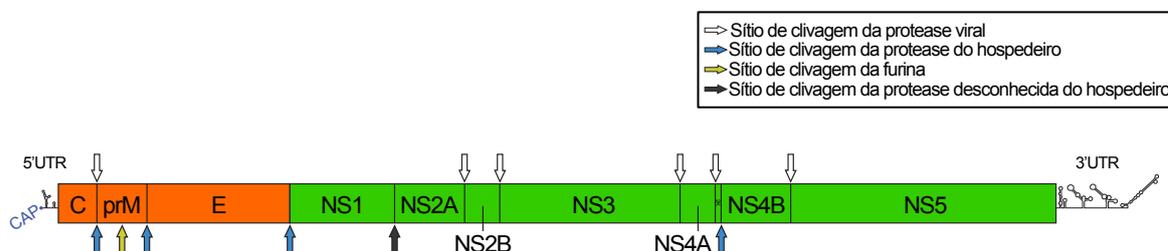


Figura 4 – Representação esquemática do genoma do Dengue virus. A linha representa o RNA genômico viral, e a caixa representa a poliproteína. Em laranja a região codificante para as proteínas estruturais do vírus e em verde para as proteínas não estruturais. As setas representam os sítios de clivagem para as diferentes proteases virais e do hospedeiro.

O processo de infecção pelo DENV se inicia com a ligação do vírus aos receptores na superfície de células susceptíveis levando a endocitose da partícula mediada por receptor. A acidificação dos endossomos tardios dispara a fusão da partícula do envelope viral com a membrana no endossomo (Allison, Schalich et al.

1995), liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, que dissocia-se em seguida liberando o RNA viral para ser traduzido por ribossomos da superfície do retículo endoplasmático (Burke and Monath 2001, Lindenbach, Thiel et al. 2001, Lindenbach and Rice 2003). A poliproteína sintetizada é clivada (Figura 4) e com suporte das proteínas não estruturais são feitas invaginações na membrana do RE para a formação das fábricas virais, que se comunicam com o citoplasma através de um pequeno poro com aproximadamente 11 nm (Junjhon, Pennington et al. 2014).

Supõe-se que a maquinaria de replicação viral localiza-se no interior das vesículas formadas no RE, sendo responsável pela replicação do genoma do vírus. Este processo é mediado pela RdRP (RNA-polimerase dependente de RNA) NS5 que gera um RNA complementar de fita negativa, sendo este usado como molde para a síntese de múltiplas cópias do RNA genômico do vírus. Os novos RNAs genômicos são associados com proteínas do capsídeo e no lúmen do RE associados com as proteínas de membrana e envelope. O transporte para o exterior da célula é feito através da via secretória convencional, e durante a passagem do vírus imaturo pelo trans-Golgi a protease tipo furina cliva a proteína pré-membrana, dando origem aos vírions (revisado em Burke and Monath 2001).

1.2. Mosquitos *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* é um artrópode pertencente à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, e subfamília Culicinae, sendo popularmente conhecido como mosquito da dengue (WHO 2009). É responsável pela transmissão de doenças com importante relevância médica, como Febre amarela e Chikungunya além da Dengue. O *Ae. aegypti* possui hábitos antropofílicos e diurnos, e praticamente não faz nenhum som audível antes de picar (Consoli and Lourenço-de-Oliveira 1994). Por ser uma espécie invasiva e muito adaptável colonizou a maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente por colocar seus ovos

resistentes à desidratação em recipientes contendo água, que são frequentemente abundantes em regiões urbanas e periurbanas habitadas pelo homem nos países em desenvolvimento (WHO 2009).

Os mosquitos são insetos holometábolos, e seu ciclo de vida consiste das fases de ovo, larva, pupa e mosquito adulto (Figura 5). Após o repasto sanguíneo as fêmeas do mosquito produzem uma média de 100 a 200 ovos por ovipostura, e aproximadamente 5 oviposturas durante a vida. O início do ciclo se dá com a postura dos ovos pelas fêmeas do mosquito geralmente nas paredes internas de recipientes como baldes, jarros de plantas, pneus, etc., que são postos separadamente num substrato úmido, próximo à água, ou em locais que podem temporariamente ficar inundados. A fecundação dos ovos acontece durante a postura, e os ovos podem permanecer viáveis por até 1 ano. Geralmente os ovos não são colocados todos num mesmo local, aumentando a chance de sucesso da reprodução e a dispersão dos mosquitos numa determinada área.

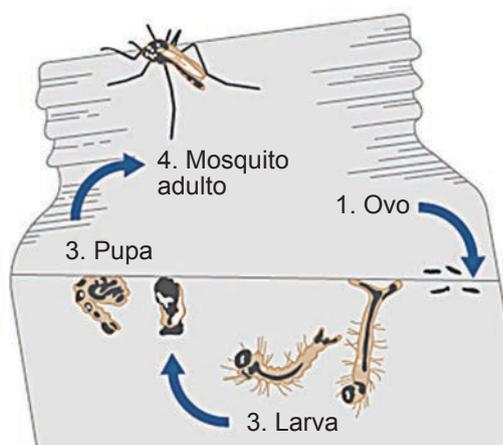


Figura 5 – Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fêmeas do mosquito colocam ovos nas paredes de recipientes destampados. Quando os recipientes são preenchidos, os ovos que entrarem em contato com a água eclodem, dando origem às larvas. Após os 4 estágios do desenvolvimento larval, se transformam em pupas ainda na água. Depois de 2 dias, o mosquito quebra a pele da pupa, e emerge na superfície da água. O mosquito adulto então pode voar por seu habitat terrestre, reiniciando o ciclo. Adaptado de *Nature Education* (2011).

Uma vez em contato com a água, os ovos eclodem dando origem às larvas, que se alimentam de partículas orgânicas na água, como algas e organismos microscópicos.

As larvas passam por 4 estágios de desenvolvimento – L1 a 4, passando o maior tempo no estágio L4. Em seguida entram no estágio de pupa e não se alimentam neste período. Após aproximadamente 2 dias os mosquitos adultos emergem na superfície da água, e após a cópula e subsequente repasto sanguíneo o ciclo é reiniciado. O ciclo do mosquito pode durar de 10 a 15 dias, dependendo das condições do ambiente (revisado em Christophers 1960). Os mosquitos adultos vivem em média de 2 a 4 semanas na natureza, podendo chegar a vários meses dependendo das condições de temperatura e umidade.

1.3. A infecção do mosquito pelo DENV

Após o repasto sanguíneo feito pelo mosquito fêmea em um indivíduo infectado, múltiplos fatores influenciam a probabilidade da infecção, disseminação e capacidade de transmissão do DENV pelo vetor. A capacidade intrínseca de um vetor em ser infectado e transmitir a doença é denominada Competência Vetorial (Hardy, Houk et al. 1983, Black and Severson 2005), e diversos fatores podem influenciar neste processo, como temperatura média do ambiente (Watts, Burke et al. 1987), genótipo do mosquito e do vírus (Lambrechts, Chevillon et al. 2009), concentração do vírus no sangue (Nguyen, Thi Hue Kien et al. 2013), microbiota intestinal (Ramirez, Souza-Neto et al. 2012), dentre outros (Kramer and Ebel 2003). O período de tempo entre o mosquito ingerir o vírus e tornar-se apto à transmiti-lo é chamado de período incubação extrínseco (PIE) e é também um fator crítico para a competência vetorial (Christofferson and Mores 2011, Smith, Battle et al. 2012, Nguyen, Thi Hue Kien et al. 2013). A duração do PIE é geralmente descrita sendo de 8 a 12 dias (WHO 2009), porém um estudo recente utilizando modelagem Bayesiana em dados publicados sugeriu que este período pode variar de 2 a 15 dias à 30°C (Chan and Johansson 2012).

1.3.1. Barreiras à infecção e disseminação viral

A competência vetorial está associada a diversas barreiras anatômicas (Figura 6) que são determinantes para a capacidade do vírus em infectar, multiplicar e ser transmitido pelo mosquito *Ae. aegypti* (Beerntsen, James et al. 2000, Black, Bennett et al. 2002). Quando o mosquito se alimenta de sangue num indivíduo que apresenta viremia, os vírus ingeridos precisam primeiramente infectar produtivamente as células do epitélio do intestino médio. Os mecanismos que afetam a capacidade dos vírus de infectar estas células compõem a chamada barreira de infecção do intestino (MIB – *Midgut Infection Barrier*). Após a infecção do intestino, o vírus devem então ser capazes de se disseminar sistemicamente passando a chamada barreira de escape/disseminação do intestino (MEB – *Midgut Escape Barrier*). A MEB pode ser caracterizada em mosquitos onde ocorre a infecção no epitélio do intestino mas mesmo com altos títulos virais, não há disseminação da infecção para tecidos adjacentes. Por fim, cabe destacar a barreira de transmissão (TB – *Transmission Barrier*), definida quando o vírus se dissemina a partir do intestino do hospedeiro mas não infecta a glândula salivar, e, portanto, não é transmitido através da picada do inseto (Beerntsen, James et al. 2000).

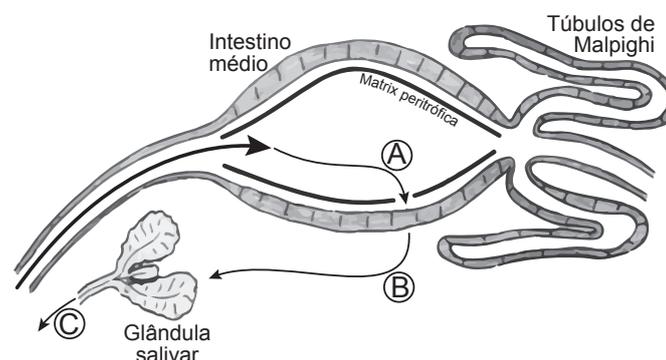


Figura 6 – Rota migratória do DENV após repasto sanguíneo pelo mosquito *Ae. aegypti*. As setas indicam a trajetória de infecção do vírion após entrar no intestino. Em A e B a representação da barreira de infecção do intestino e barreira de disseminação do intestino, respectivamente. Em C a representação da barreira de transmissão do DENV. Adaptado de Beerntsen, James et al. (2000).

Diversos estudos mostraram que entre populações distintas de mosquitos há grandes diferenças na susceptibilidade à infecção pelo DENV e outros arbovírus (Bennett, Olson et al. 2002, Black, Bennett et al. 2002, Bennett, Beaty et al. 2005, Schneider, Mori et al. 2007). Esta diferença existe não somente entre populações de regiões distintas, como também entre indivíduos dentro de uma mesma população (Miller and Mitchell 1991, Bennett, Beaty et al. 2005).

A existência de fatores genéticos subjacentes à susceptibilidade ao DENV foi inicialmente demonstrada pela seleção artificial de linhagens resistentes e susceptíveis de *Ae. aegypti* (Miller and Mitchell 1991), e mais tarde foram demonstrados possíveis QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados à este fenótipo (Bosio, Fulton et al. 2000, Fansiri, Fontaine et al. 2013, Dickson, Sanchez-Vargas et al. 2014), que foram associados às barreiras de infecção e disseminação do intestino. Apesar dos QTLs sugerirem alguns genes associados às regiões ligadas ao fenótipo de susceptibilidade ao DENV, pouco ainda se sabe sobre o mecanismo pelo qual estes genes afetam a competência vetorial. Esta é uma característica multifatorial complexa e pode ser afetada por diferentes genes, incluindo os genes que controlam a resposta imune antiviral do inseto (Miller and Mitchell 1991, Bosio, Fulton et al. 2000, Bennett, Olson et al. 2002).

1.3.2. Imunidade antiviral mediada por RNAi

Após a infecção no mosquito *Ae. aegypti*, o DENV é confrontado por diferentes mecanismos antivirais, dentre eles a imunidade inata antiviral mediada por RNA de interferência (RNAi), que é uma via autônoma de cada célula. No organismo modelo *Drosophila melanogaster* e em outros insetos de forma geral, existem pelo menos 3 vias de RNAi: a via de siRNA (*small interfering RNAs*), via de miRNA (*microRNAs*), e a via de piRNA (*piwiRNAs*), sendo seu funcionamento dependente de componentes e

transcritos em pares anti-senso ou longos grampos (Figura 7B e C). O resultado da ativação desta via é a clivagem processiva dos dsRNAs, gerando pequenos RNAs com tamanho de 21 nucleotídeos (nt), que quando de origem viral são chamados de vsRNAs (*viral small interfering RNAs*). Alguns autores sugerem que a via de piRNA também possa ter papel antiviral nestes organismos (Wu, Luo et al. 2010, Morazzani, Wiley et al. 2012, Vodovar, Bronkhorst et al. 2012, Aguiar, Olmo et al. 2015).

No mosquito *Ae. aegypti* os genes centrais da via de siRNA *dcr2*, *r2d2* e *ago2* foram identificados (Sánchez-Vargas, Scott et al. 2009). Estes mesmos autores detectaram pequenos RNAs com sequência e tamanho semelhantes aos siRNAs em mosquitos infectados com DENV-2, e também mostraram que o silenciamento transiente de componentes da via de RNAi aumentaram a carga viral do DENV no mosquito e diminuíram o período de incubação extrínseco. Além disso, utilizando uma linhagem de mosquito transgênica expressando um dsRNA complementar ao DENV-2 no intestino, Franz, Sanchez-Vargas et al. (2006) e Franz, Sanchez-Vargas et al. (2014) mostraram que quando a via de exo-siRNA é pré-ativada há diminuição da carga viral nos intestinos dos mosquitos infectados e também há diminuição da prevalência da infecção com 7 e 14 dias após a alimentação (dpf), sugerindo seu papel na MIB e MEB durante a infecção pelo DENV. Em contrapartida, (Khoo, Doty et al. 2013) usando mosquitos transgênicos que expressam a proteína B2 do *Flock House virus* no intestino de mosquitos *Ae. aegypti*, que é um potente inibidor da via de siRNAs, mostraram que há aumento da carga do arbovírus *Sindbis virus* (SINV) e do DENV nos mosquitos infectados, porém não há alteração da prevalência da infecção. Este mesmo grupo mostrou utilizando outra linhagem transgênica (Khoo, Piper et al. 2010) que eficientemente silencia Dcr-2 no intestino, o aumento significativo da carga viral e prevalência do SINV no intestino com 7 dpf, porém com 14 dpf este fenótipo é revertido, ficando a carga viral e a prevalência neste tempo semelhantes ao controle. Estes resultados sugerem que a via de siRNA está presente e ativa no mosquito *Ae. aegypti*, e que a ativação desta via após o início da replicação viral pode não ser suficiente para eliminar a infecção, porém auxilia no controle

da carga viral e conseqüentemente na MEB. Assim, mais estudos são necessários para compreender o papel da ativação desta via nas populações de mosquitos e entender o mecanismo da via de siRNAs como mecanismo de defesa antiviral natural.

1.3.3. Imunidade inata

Os insetos utilizam seu sistema imune inato como primeira linha de defesa para controlar infecções por patógenos, e este sistema caracteriza-se por sua rápida ativação mediante o reconhecimento do patógeno por receptores, chamados PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) (Merkling and van Rij 2013). Estes receptores reconhecem pequenos motivos que são conservados entre as classes de micróbios, mas não estão presentes no hospedeiro, como componentes da parede celular ou RNAs de dupla fita (dsRNA – *double stranded RNAs*) (de Faria, Olmo et al. 2013).

As respostas desenvolvidas durante uma infecção são altamente efetivas e incluem a produção de peptídeos antimicrobianos, fagocitose, encapsulação e melanização do patógeno invasor (Lehane, Aksoy et al. 2004). No modelo *D. melanogaster* estas respostas são controladas por três grandes vias de sinalização: Toll, Imd e Jak-STAT (De Gregorio, Spellman et al. 2002), mostradas na Figura 8. A via de Toll media a imunidade sistêmica contra bactérias gram-positivas e fungos, e a via de Imd (*Immune deficiency*) a imunidade contra bactérias gram-negativas (Revisado por Ferrandon, Imler et al. 2007). Foi demonstrado, também na mosca *D. melanogaster*, que a via de Jak-STAT (*Janus kinase – signal transducers and activators of transcription*) participa na imunidade contra bactérias e vírus (Agaisse and Perrimon 2004, Dostert, Jouanguy et al. 2005, Buchon, Broderick et al. 2009).

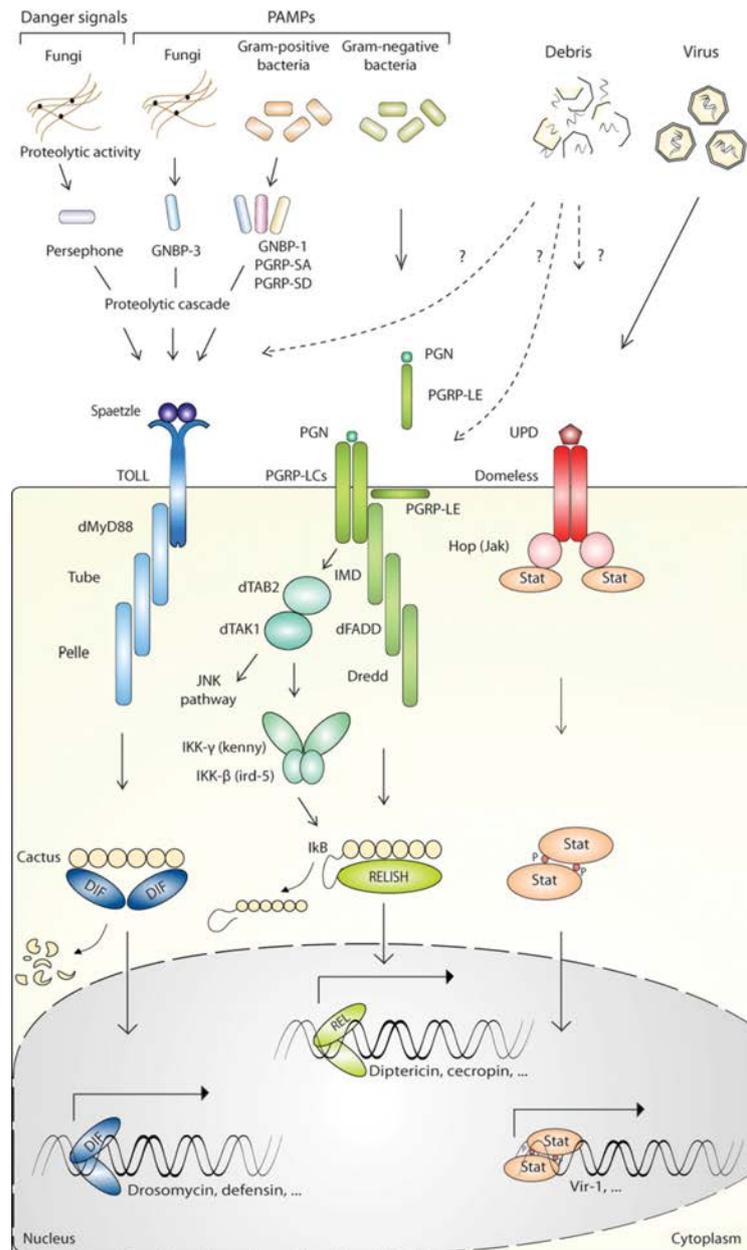


Figura 8 – Vias de imunidade inata no modelo *D. melanogaster*. **Via de Toll:** detecção de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou sinal de perigo através de persephone. Sua ativação leva a clivagem de Spätzle, que liga-se no receptor Toll e induz sua dimerização, levando a ligação de proteínas e culminando com a fosforilação de Cactus e sua degradação, liberando Dif (*Dorsal-related immunity factor*). Este transloca-se para o núcleo, induzindo a transcrição de genes de resposta imune. **Via de IMD:** a ligação de peptídeoglicanos (PGN) de bactérias Gram-negativas às PGRPs (*Gram-negative bacteria to peptidoglycan recognition proteins*) levam ao recrutamento do adaptador IMD (*Immune deficiency*), culminando com a ativação do complexo IKK- β e IKK- γ que fosforila Relish e este é clivado. A translocação do domínio Rel para o núcleo induz a transcrição de genes imunes. **Via de Jak-STAT:** após a infecção viral é ativada pela ligação de Upd ao receptor domeless. Então a Jak quinase Hopscotch (Hop) associada a domeless se fosforila e fosforila a domeless. Stat92E então reconhece domeless fosforilada, dimeriza-se e transloca-se para o núcleo onde induz a transcrição de genes imunes. Adaptado de Merkle and van Rij (2013).

Um importante passo para o entendimento das respostas imunológicas desenvolvidas pelo mosquito *Ae. aegypti* foi dado com a identificação de genes ortólogos das vias de imunidade inata neste organismo (Waterhouse, Kriventseva et al. 2007). Trabalhos recentes demonstraram a importância via de Toll em *Ae. aegypti* no controle da replicação viral após o estabelecimento da infecção por DENV (Xi, Ramirez et al. 2008, Ramirez and Dimopoulos 2010), nos quais foi mostrado que o silenciamento transiente do gene *MyD88* leva ao aumento da carga viral do DENV, e quando silenciado o inibidor da via de Toll *Cactus*, há diminuição da carga viral nestes mosquitos. Interessantemente, é descrito de maneira análoga à via de Toll o aumento da replicação do DENV com o silenciamento de *Hop* e *Dome*, reguladores positivos da via de Jak-STAT, enquanto que com o silenciamento de *PIAS*, um regulador negativo desta via, há diminuição da replicação deste vírus (Souza-Neto, Sim et al. 2009). Apesar destes resultados sugerirem a coparticipação destas vias no controle da infecção pelo DENV em mosquitos *Ae. aegypti* mais estudos são necessários para elucidar a influência destas vias na competência vetorial durante a infecção pelo DENV.

Justificativa

2. Justificativa

O mosquito *Ae. aegypti* é vetor para uma série de arbovírus que causam doenças graves, dentre as quais destaca-se o *Dengue virus*, causador da Dengue. Esta doença é difundida nas regiões tropicais e subtropicais, possuindo ciclos de transmissão tanto endêmico quanto epidêmico. Recentemente Bhatt, Gething et al. (2013), após uma compilação de publicações científicas, estimaram que somente no ano de 2010 ocorreram aproximadamente 400 milhões de casos de dengue aparentes e não aparentes em todo o mundo. Considerando que ainda não há no mercado vacinas ou tratamentos que sejam eficiente contra o DENV, as atividades de controle de transmissão desta doença dependem principalmente no combate a transmissão pelo mosquito vetor *Ae. aegypti*. Para isto, é essencial que a interação entre DENV e o inseto vetor seja melhor caracterizada.

Os trabalhos envolvendo a interação inseto-arbovírus podem ser divididos em duas abordagens. A primeira onde o foco é a caracterização das vias antivirais ativadas durante a infecção e como elas afetam o crescimento viral no inseto. Em contraste, outros estudos abordam a caracterização das diferentes barreiras à infecção afetando a probabilidade do mosquito se infectar ou transmitir o vírus. A conexão entre as duas abordagens, é essencial para entendermos como as respostas antivirais afetam as barreiras à infecção que determinam a competência vetorial (Prasad, Brackney et al. 2013). Neste contexto, a genômica funcional e a biologia de sistemas são ferramentas fundamentais para estudo da competência vetorial do mosquito *Ae. aegypti* frente à infecção pelo *Dengue virus*. Entender os mecanismos moleculares que estabelecem as barreiras à infecção seria de grande ajuda para o desenvolvimento de ferramentas de controle da transmissão desta arbovirose.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral caracterizar o papel da via de vsiRNAs e outras vias imunes do hospedeiro invertebrado *Ae. aegypti* no controle da infecção pelo *Dengue virus*, com ênfase nas barreiras do intestino.

3.2. Objetivos específicos

- 1 – Padronizar e caracterizar molecularmente as etapas da infecção de mosquitos *Ae. aegypti* pelo DENV;
- 2 – Caracterizar o papel da via de siRNAs na resposta antiviral em mosquitos *Ae. aegypti* infectados pelo DENV;
- 3 – Caracterizar e analisar o padrão de processos biológicos ativados sistemicamente e nos intestinos associados a resistência ou susceptibilidade à infecção pelo DENV em mosquitos *Ae. aegypti*;

4. Material e Métodos

4.1. Obtenção dos estoques virais

Os vírus utilizados neste trabalho foram isolados nos municípios do Rio de Janeiro (RJ) e de Boa Vista (RR), pertencendo aos sorotipos DENV-1 cepa BR/90 (Despres, Frenkiel et al. 1993) e DENV-4, respectivamente, e foram gentilmente cedido pela Dra. Cláudia dos Santos (DENV-1) do laboratório de Virologia Molecular do ICC/Fiocruz-PR, e pela Dra. Erna Kroon (DENV-4) do Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

Para a multiplicação do DENV, garrafas de 75 cm² com uma confluência de 60-80% de células C6/36 de *Aedes albopictus* (ATCC[®] - CRL1660TM) foram infectadas com 4 mL de meio L-15 *Leibovitz Medium* (Gibco[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco[®]) contendo vírus suficiente para uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. Após 1 hora de adsorção, o meio contendo o inoculo foi descartado sendo adicionado em seguida 14 mL de meio L-15 suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina-B - Gibco[®]). A cultura foi mantida por 6 dias em estufa a 28°C. Após este período, o meio foi coletado e reservado, as células aderidas na garrafa foram lisadas por congelamento à -80°C e descongeladas a 37°C. O meio de cultura previamente coletado foi então misturado às células lisadas, sendo a mistura em seguida centrifugada a 1800 x g por 10 minutos à 4°C para clarificação. O sobrenadante foi alíquotado e congelado a -80°C até o momento do uso.

Os vírus foram titulados em células BHK-21 (ATCC[®] - CCL10TM) pela metodologia de formação de placas (PFU), segundo descrito originalmente por Dulbecco (1952) e modificada por Morens, Halstead et al. (1985). Os títulos dos vírus e as linhagens utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Título viral e origem das amostras de *Dengue vírus*.

Sorotipo	Isolado	Título viral (pfu/mL)
DENV-1	BR/90	5,0x10 ⁷
DENV-4	Boa Vista / 1981*	2,0x10 ⁷

* Ano do isolamento.

4.2. Manutenção das colônias de mosquitos *Ae. aegypti*

Os procedimentos para a manutenção da colônia foram realizados em salas de criação climatizadas, com temperatura de 26°C ± 1°C, umidade de 80% ± 10% e ciclo claro/escuro de 12 h/12 h. Foram utilizadas nos experimentos gerações F₂ de mosquitos, obtidas inicialmente a partir de ovos coletados nas 5 regiões mais endêmicas da Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro (Belford Roxo, Paquetá, Jurujuba, Tubiacanga e Vila Valqueire) e gentilmente cedidos pelo Dr. Rafael Maciel de Freitas do IOC/Fiocruz, bem como linhagens *Red Eye* (RED) originadas do Vector Biology Laboratory, (University of Notre Dame, Indiana, EUA) e gentilmente cedidas pelo Dr. Pedro Oliveira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Todos os procedimentos relacionados à manutenção da colônia e experimentação com mosquitos foram realizados no insetário do Dr. Luciano Andrade Moreira, no Laboratório de Mosquitos Vetores, Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ), como descrito a seguir.

Ovos foram colocados para eclosão em bandejas fechadas contendo 4 litros de água filtrada e suplementada com ração para peixe ornamental TetraMin (Tetra[®]). Após 7 dias, as pupas foram capturadas e transferidas para um recipiente plástico com água limpa, e acondicionadas em gaiolas para criação de mosquitos adultos. O recipiente foi mantido na gaiola por até 3 dias, período suficiente os adultos emergirem. Durante todo o tempo foi oferecido *ad libitum* solução de açúcar 10% aos mosquitos.

A manutenção da colônia de mosquitos da linhagem RED foi realizada segundo protocolo padrão do insetário, brevemente descrito a seguir: mosquitos adultos com uma semana após emergirem foram alimentados com o auxílio de alimentadores artificiais e sangue humano previamente testado contra Dengue, obtido através de uma parceria com um banco de sangue de Belo Horizonte. Para isso, alimentadores de vidro cobertos com membrana de tripa de porco seca foram abastecidos com sangue coletado com anticoagulante EDTA, e aquecidos à temperatura de 37°C através de um banho com circulação de água. Após, foram deixados em contato com as gaiolas por 1,5 hora. No 3º dia após a alimentação foi colocado em cada gaiola um copo plástico contendo papel filtro e água no fundo para que as fêmeas fizessem a postura dos ovos. Após 3 dias os papéis de filtro foram coletados, deixados à temperatura ambiente até secar, e acondicionados em envelopes plásticos. Os ovos são mantidos em temperatura ambiente por até 6 meses para posterior uso e manutenção da colônia.

4.3. Infecção por alimentação dos mosquitos com DENV

O procedimento de infecção por alimentação foi realizado segundo Moreira, Iturbe-Ormaetxe et al. (2009). Brevemente, mosquitos adultos fêmeas com 5 a 7 dias de vida foram colocados em gaiolas com capacidade para 500 cm³ utilizando um aspirador elétrico, num número máximo de 100 fêmeas por gaiola, e privadas de alimentação com solução de açúcar por um período de 24h antes da alimentação.

Para o preparo do sangue e dos alimentadores o seguinte procedimento foi realizado: sangue humano total, previamente coletado em tubos com EDTA (Vacuette®), foi centrifugado a 1800g por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma e as células brancas foram descartadas com o auxílio de uma pipeta, restando somente as células da série vermelha. Estas células foram então ressuspendidas com 3 vezes seu volume de meio RPMI-1640 (Sigma®) não suplementado com SFB nem

antibióticos e centrifugadas como descrito acima. Este processo foi repetido por 2 vezes. O sangue foi condicionado em gelo até o momento do uso.

Para o preparo do plasma, sangue coletado em tubos sem anticoagulante foi centrifugado à 1800 x *g* por 15 minutos para separação do soro, que foi coletado e incubado por 30 minutos a 56°C para inativação das proteínas do complemento. O soro inativado foi aliquoteado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

A contaminação do sangue com o DENV deu-se com a mistura de 400 µL de células da série vermelha, 500 µL de sobrenadante de células C6/36 infectadas com DENV e 100 µL de soro inativado, que foram acondicionados em gelo até o momento do uso.

A montagem dos alimentadores com o sangue contaminado foi feita como descrito anteriormente para a alimentação dos mosquitos. Os alimentadores foram mantidos em contato com as gaiolas por 1,5 horas, congelando-se uma alíquota após o término da alimentação para posterior confirmação do título viral utilizado no experimento. Após 18h, os mosquitos foram anestesiados com CO₂, transferidos para uma placa de Petri sobre o gelo. As fêmeas que alimentaram com sangue foram então separadas, colocadas em novas gaiolas, e mantidas em uma área reservada para experimentos de infecção. A solução de açúcar a 10% embebida em algodão utilizada para alimentar estes mosquitos foi trocada todos os dias, afim de evitar o surgimento de fungos.

Para a coleta, os mosquitos foram anestesiados utilizando CO₂ e com o auxílio de uma pinça foram coletados individualmente em tubos tipo *Eppendorf* e imediatamente congelados à -80°C.

4.4. Procedimento para infecção por microinjeção em mosquitos

O procedimento de infecção por microinjeção foi realizado segundo Moreira, Iturbe-Ormaetxe et al. (2009). Para os experimentos de microinjeção foram utilizados mosquitos adultos fêmeas com 5 a 7 dias de vida. O procedimento de microinjeção foi

realizado com um microinjetor Nanoject II™ (Drummond®) em sua capacidade máxima (69 nL), seguindo instruções do fabricante. Para isso, os mosquitos foram nocauteados utilizando CO₂ e em seguida acondicionados em gelo. Em seguida foram injetados intratoracicamente com 69 nL de sobrenadante de células C6/36 infectadas com DENV, que foi descongelado no momento do uso. As diluições virais utilizadas na microinjeção foram feitas utilizando meio de cultura similar ao utilizado no crescimento do vírus, a fim de minimizar a variação das condições experimentais.

4.5. Extração do RNA total de mosquitos

Todos os instrumentos utilizados foram esterilizados por autoclavação ou limpos com inibidor de RNase RNaseZap (Ambion®).

Mosquitos individualmente coletados como descrito anteriormente foram homogeneizados com 200 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) e 3-4 pérolas de vidro com 1,0 mm de diâmetro, utilizando o equipamento *Mini-BeadBeater-16* (Biospec®) por 1,5 minutos. O homogeneizado foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e foram então adicionados 40 µL de clorofórmio (Sigma®) seguido de agitação vigorosa em vortex por 15 segundos. Seguida uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x *g* em microcentrífuga a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 5 µg de glicogênio ultrapuro (Ambion®) em cada amostra, com posterior adição de 100 µL de isopropanol (Sigma®), agitação leve em vortex e, após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x *g*. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado em cada tubo 750 µL de etanol 75% v/v (Sigma®) preparado utilizando água livre de nucleases (*Nuclease-Free Water* – Ambion®). Após agitação branda em vortex, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 7.500 x *g*, e em seguida o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi seco pela inversão dos tubos em papel absorvente. Após a secagem do RNA, este foi

ressuspendido em 10 µL de água livre de nucleases (Ambion®). As amostras foram armazenadas imediatamente a -80°C até o momento do uso.

4.6. Quantificação relativa da abundância de RNAs virais e do hospedeiro

4.6.1. Transcrição reversa (RT)

A primeira fita do cDNA foi sintetizada 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 para um volume final de 20 µL. Primeiramente foi feita a desnaturação do RNA através da incubação da mistura RNA e *Random Primers* a 70°C em termociclador durante 10 minutos, seguido de banho de gelo. Em seguida, foram adicionados o tampão da enzima, DTT e 2 unidades da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, essa mistura foi incubada novamente em termociclador a 42°C durante 60 minutos e 72°C por 5 minutos. Por fim, a amostra foi estocada a -20°C até o momento do uso.

Foram feitos controles sem a presença da enzima (RT-) em todas as reações de transcrição reversa a fim de avaliar a possível contaminação com DNA, tendo em vista que não é feito o tratamento com DNase nas amostras de RNA total.

4.6.2. Transcrição reversa fita específica

A transcrição reversa fita específica foi feita para quantificar independentemente o genoma do DENV (senso positivo) e também o genoma replicativo (senso negativo). Para isso nós utilizamos uma modificação do protocolo proposto por Plaskon, Adelman et al. (2009) que, para o *O'nyong-nyong virus* (ONNV) e para o *Chikungunya virus* (CHIKV),

utilizou iniciadores específicos para o genoma senso positivo ou negativo, acrescidos de uma sequência específica que é fundamental para a especificidade da reação (Tabela 2).

Nós fizemos a síntese do cDNA a partir de 200 ng de RNA total extraído como descrito anteriormente utilizando a enzima SuperScript[®] III (Invitrogen[™]) segundo o protocolo padrão do fabricante, com as modificações na temperatura da etapa de transcrição reversa (52°C), o acréscimo de 1 µL de RNaseOUT[®] (Invitrogen[™]) e utilizando 2 mM de oligo específico em cada reação. Para os testes nós fizemos em paralelo 4 reações de 20 µL de cDNA para cada amostra de RNA, sendo: uma com um oligo específico para detectar a fita positiva do DENV (DV4rt-R), uma com oligo específico para detectar a fita negativa do DENV (DV4rt-F), uma utilizando oligo dT₁₈, e por fim uma reação controle não acrescentando nenhum oligo. O excesso de oligos contidos nas reações de cDNA foi digerido incubando-se o cDNA com 2,5 uL da enzima Exonuclease I (Thermo Scientific[®]) e 2,5 uL do tampão 10x (T_{10x}Exol) por 30 minutos à 37°C. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.6.3. Desenho dos iniciadores

O design dos iniciadores para PCR e qPCR utilizados neste trabalho foi feito utilizando o software Primer3Plus (Untergasser, Cutcutache et al. 2012), com pequenas modificações nos parâmetros padrões, sendo tamanho do amplicon entre 70 e 150 nt, temperatura ideal de anelamento em 60°C e conteúdo GC ideal de 50%, e são descritos na Tabela 2. A verificação por sítios espúrios de amplificação para cada iniciador foi feita utilizando a ferramenta Primer-BLAST (Ye, Coulouris et al. 2012), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Tabela 2 – Iniciadores para detecção da carga viral e expressão gênica.

Iniciadores	Nomes	Sequências (5' - 3')
DENV-1	DV1U-L DV1U-R	TCGGAAGCTTGCTTAACGTAG TCCGTTGGTTGTTTCATCAGA
DENV-4	DV4U-L DV4U-R	AAGCTCAACGTAGTTCTAACAGTTTTT GCCTTTTTCCGTTGGTTATTTC
RpL32	AaeRpL32-L AaeRpL32-R	AGCCGCGTGTTGTACTCTG ACTTCTTCGTCCGCTTCTTG
AGO2	AaeAGO2-L AaeAGO2-R	AGATTGACAAGCAGAAAATCCAC CATTTGGACGCATCAGCA
Actina	HsActin-L HsActin-R	AGCCGCGTGTTGTACTCTG ACTTCTTCGTCCGCTTCTTG
DENV-4 TR	DV4rt-F DV4rt-R	GCGTCATGGTGGCGAATAATCGGAAGCTTGCTTAACACA GCGTCATGGTGGCGAATAATTCGTTGGTTTCATTTTTCCAG
ss.DENV.fw.all		AATAAATCATAAGCGTCATGGTGGCGAATAA

4.6.4. PCR quantitativo (qPCR)

O ensaio de PCR foi feito a partir de cada amostra de cDNA utilizando a enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™) seguindo o protocolo recomendado do kit, e 2 nM de cada oligo, com a condição de ciclagem: 95°C por 10 min., 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 60°C por 30 seg., e 72°C por 30 seg, e uma etapa final e 6 min. O produto da reação foi verificado por PAGE 6% corado com Brometo de Etídeo.

4.6.5. PCR quantitativo (qPCR)

Para análise da expressão gênica e quantificação relativa da carga viral foi utilizada a técnica de PCR quantitativo, conhecida como *Real Time PCR*. As reações foram realizadas utilizando o kit *Power SYBR® GREEN PCR Master Mix* (Applied® Biosystems) conforme boletim técnico do fabricante, utilizando o equipamento

StepOnePlus™ RealTime PCR System (Applied® Biosystems) ou QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied® Biosystems). As análises foram realizadas utilizando o método do $2^{-\Delta Ct}$ calculado em relação ao gene constitutivo codificador para a partícula ribossomal L32 (RpL32 – *Ribosomal particle L32*). Os iniciadores para DENV utilizados neste trabalho amplificam especificamente a região 5'UTR do genoma viral, estão descritos na Tabela 2.

A eficiência dos diversos iniciadores foi verificada utilizando diluições seriadas de 10X de diferentes amostras de cDNA. Os ensaios foram realizados em duplicata e a concentração dos iniciadores foi de 400nM. Os valores de *baseline* e *threshold* foram ajustados de acordo com cada par de iniciadores.

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software Prism 5.0 (Graphpad® Software). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste D'Agostino e Pearson. Para dados paramétricos foram utilizados os testes de *t* de Student e análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para dados de natureza não paramétrica, foram utilizados os testes *t* de Student seguido de pós-teste de Mann-Whitney, ou realizado o teste de análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Dunns.

4.7. Imunohistoquímica

A preparação dos mosquitos para a imunohistoquímica foi feita segundo (Salazar, Richardson et al. 2007). Brevemente, mosquitos *Ae. aegypti* foram anestesiados com CO₂ e mantidos em gelo durante o processamento. Imediatamente após, foram dissecados submersos em solução de PBS gelada. Os tecidos foram fixados para posterior imunomarcção em PFA 4% por 30 min à temperatura ambiente (TA). As amostras foram lavadas com PBS (2 vezes de 5 min) e incubadas por 1 h em solução de bloqueio (PBS + BSA 1% + Triton X-100 0,1%), sob agitação à TA. Foram então incubadas por 16 horas anticorpo primário monoclonal 4G2 (ATCC: HB-112) diluído 1:50

na solução de bloqueio, sob agitação a 4°C. Em seguida foram lavadas com solução de bloqueio (5 vezes de 5 min) e incubadas por 1h com anticorpo secundário fluorescente e corantes (descritos abaixo) diluídos 1:500, sob agitação à TA. Posteriormente foram realizadas 2 lavagens de 1:30 h com solução de bloqueio seguidas de montagem em lâmina/lamínula com *Hydromount* (National Diagnostics®). As lâminas foram mantidas protegidas de luz em geladeira para posterior análise em microscópio confocal (5 Live, Zeiss™).

Os anticorpos secundários utilizados para a detecção foram adquiridos da Molecular Probes® (Life Technologies™), sendo utilizado os seguintes: anticorpo cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488, anticorpo cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 633 marcador nuclear Hoechst 33342 (Trihydrochloride, Trihydrate), marcador de actina Faloidina-rodamina.

4.8. Silenciamento gênico

A síntese do dsRNA foi feita de acordo com o protocolo descrito no DRSC (*Drosophila RNAi Screening Center*), disponível em <http://www.flyrnai.org/DRSC-PRS.html> (acessado em 01/06/2015). Resumidamente, foram desenhados oligos específicos (Tabela 3) utilizando a ferramenta SnapDragon (disponível em <http://www.flyrnai.org/snapdragon> - acessado em 01/06/2015) para uma região que amplifica aproximadamente 450 pb da sequência de AGO2 do mosquito *Ae. aegypti*, ou de uma região da sequência de *Firefly* Luciferase (FLUC) de tamanho semelhante. Em cada par dos iniciadores foi adicionada a sequência do promotor de T7 ou SP6 RNA polimerase nas extremidades. A obtenção das sequências com os promotores para síntese do RNA foi feita pela amplificação por RT-PCR no caso da AGO2, ou feito o PCR a partir do plasmídeo pAC5.1-Luc (Invitrogen®) para a FLUC. A síntese do RNA nas duas polaridades do produto de PCR foi feita separadamente utilizando o kit *MEGAscript® T7 Transcription Kit* ou *MEGAscript® SP6 Transcription Kit*, segundo o protocolo do

fabricante, com a modificação no tempo de síntese para 16 horas. Após a síntese o RNA foi precipitado com fenol-clorofórmio, ressuspendido em água e quantificado. O anelamento das fitas do RNA foi feito a partir de quantidades equimolares do RNA que foi desnaturado a 94°C e deixado esfriar naturalmente à temperatura ambiente na bancada. Após a quantificação, o dsRNA foi diluído para a concentração final de 7,25 µg/µL, e sucesso do anelamento foi verificado por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 3 – Iniciadores para a amplificação dos moldes para síntese dos dsRNA.

Iniciadores	Nomes	Sequências (5' - 3')
dsAGO2	Aae_dsAGO2-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGTTCAAGCAGACGAACCA
	Aae_dsAGO2-R	ATTTAGGTGACACTATAGAAGTGATGTAGACGCGTCCTCTG
dsFLUC	dsFLUC-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAACAATCCGGAAGCGACCAA
	dsFLUC-R	ATTTAGGTGACACTATAGAAGTGTGACTGGCGACGTAATCCAC

O procedimento de microinjeção foi realizado de maneira semelhante à utilizada para a infecção do vírus no mosquito descrita anteriormente. Fêmeas do mosquito com 3 a 4 dias de vida foram nocauteados com CO₂, acondicionadas em gelo, e microinjetadas intratoracicamente com 500 ng de dsRNA utilizando o microinjetor Nanoject II™ (Drummond®) em sua capacidade máxima (69 nL). Dois dias após a microinjeção as fêmeas foram alimentadas com sangue contaminado com o DENV, como descrito anteriormente. Para controle, no momento da alimentação fêmeas foram coletadas e testadas para o silenciamento de AGO2, tanto no inseto inteiro, quanto somente nos intestinos ou carcaças.

4.9. Controle de qualidade do RNA para construção das bibliotecas

A concentração do RNA total extraído foi determinada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), e a integridade do RNA total extraído foi avaliada utilizando o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent

Technologies) com o kit RNA 6000 Nano (Agilent Technologies), seguindo o protocolo do fabricante.

4.10. Construção e sequenciamento das bibliotecas

4.10.1. RNAs de baixo peso molecular

O preparo das bibliotecas foi realizado segundo descrito por (Pfeffer, Zavolan et al. 2004) e modificado por Mueller, Gausson et al. (2010). Resumidamente, o RNA total foi selecionado por tamanho (~16-30 nt) em PAGE desnaturante, seguido da ligação dos oligos adaptadores em cada extremidade do RNA. Após a transcrição reversa, o cDNA dos clones foi amplificado por RT-PCR, e enviado para sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq™ 2500, situada na *Plateforme Biopuces & Séquençage, Institut de Génétique e Biologie Moléculaire et Cellulaire* (IGBMC), em Estrasburgo, na França. Foram sequenciados 50 nt (1 x 50 nt) por clone.

4.10.2. Transcriptoma

As bibliotecas de RNAs longos foram construídas a partir de 300 ng de RNA total extraído de mosquitos inteiros ou intestinos, que foram enriquecidos para poli-A utilizando o kit *Dynabeads® mRNA DIRECT™ Purification Kit* (Ambion™) segundo as recomendações do fabricante, e realizado a depleção de RNA ribossomal (rRNA) utilizando o kit *TruSeq Stranded Total RNA kit* (Illumina®) de acordo com o protocolo padrão do fabricante. O sequenciamento foi feito na plataforma HiSeq® 2500 (Illumina®), sequenciando os clones 100 nt na direção senso e antisenso (2 x 100 nt). A média de tamanho dos insertos sequenciados foi de aproximadamente 160 nt. Os resultados do sequenciamento foram disponibilizados no formato FastQ, e baixados em servidores locais no nosso laboratório para análise.

4.11. Processamento das bibliotecas

4.11.1. Pré-processamento das bibliotecas de pequenos RNAs

As bibliotecas foram submetidas a um filtro de qualidade utilizando o *script fastq_quality_filter*, disponibilizado no pacote FastX-toolkit (disponível em http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Foram utilizados os parâmetros `-q 20` e `-p 60` que definem a qualidade mínima e a porcentagem do número total de bases que tenham a qualidade mínima estipulada, respectivamente. As sequências que passaram nos filtros de qualidade foram submetidas à remoção de adaptadores utilizando o software *cutadapt* (Martin 2011). As sequências menores que 15 nt após a remoção dos adaptadores foram descartadas.

4.11.2. Pré-processamento das bibliotecas de transcriptoma

No caso das bibliotecas de RNAs longos, as sequências brutas foram submetidas a filtro de qualidade e remoção dos adaptadores utilizando o software Trimmomatic (Bolger, Lohse et al. 2014) com os parâmetros `LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36`, que indicam a remoção de 3 bases de baixa qualidade nas extremidades 5' e 3', a remoção de porções na sequência que tenham qualidade menor que 15, e a remoção de sequências que após os filtros de qualidade tenham tamanho menor que 36.

4.12. Análise dos pequenos RNAs

O mapeamento das sequências contra o genoma de referência do mosquito *Ae. aegypti* ou do DENV foi realizado utilizando o software Bowtie versão 1.1.1 (Langmead and Salzberg 2012), permitindo-se uma base discordante por sequência mapeada (`-v`

1), reportando-se somente o melhor mapeamento para cada sequência (`--best`). Como genoma de referência para o mapeamento foi utilizada a versão AaegL3.3 do genoma do mosquito *Ae. aegypti* disponível em Vectorbase.org, ou as sequências do DENV-1 e -4 das linhagens por nós utilizadas neste trabalho, descritas anteriormente.

Em seguida foram realizadas as análises da distribuição de tamanho das sequências que mapearam contra o genoma do vírus, normalizando-se o total de sequências mapeadas no genoma do vírus pelo total de sequências mapeadas no genoma do mosquito, multiplicado por 10^6 (RPM – do inglês *Reads Per Million*). Todas as análises foram feitas utilizando scripts Perl próprios, ou scripts cedidos gentilmente pelos alunos de doutorado Eric Aguiar e André Gonçalves. Os gráficos foram gerados com o software estatístico R (R Development Core Team 2012) e o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio[®], disponível em <http://www.rstudio.com> (acessado em 01/06/2015). As seguintes versões foram utilizadas: Perl versão 5.12.4, biblioteca BioPerl versão 1.6.923, R versão 3.2.1 e o pacote ggplot2 versão 1.0.1.

A análise estatística do enriquecimento de sequências de tamanho 21 nt foi feita segundo o método estatístico de Audic-Claverie (A-C) descrito em (Tino 2009), que baseado na distribuição de Poisson calcula a probabilidade de duas contagens digitais num conjunto particular de sequências vir de populações similares num conjunto de dados.

4.13. Análise das bibliotecas de transcriptoma

4.13.1. Mapeamento e estimação da abundância dos transcritos

O mapeamento das bibliotecas de transcriptoma contra o genoma de referência do mosquito *Ae. aegypti* foi feito utilizando segundo o protocolo descrito por (Trapnell, Roberts et al. 2012). Para isso, nós usamos o pacote TopHat versão 2.0.14, que permite alinhar sequências no genoma e identificar transcritos que tenham origem em junções

éxon-éxon (Trapnell, Pachter et al. 2009, Trapnell, Roberts et al. 2012, Kim, Pertea et al. 2013). O TopHat utiliza como mapeador o Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012), por nós utilizado na versão 2.2.5. Para guiar o mapeamento, nós utilizamos a versão AaegL3.3 da anotação do genoma de *Ae. aegypti*, e permitimos a presença de 3 bases discordantes a cada par de sequências mapeadas.

Utilizando os arquivos de saída do TopHat nós estimamos a expressão relativa dos genes anotados no genoma do mosquito utilizando o pacote Cufflinks e Cuffdiff (Trapnell, Pachter et al. 2009, Trapnell, Roberts et al. 2012) na versão 2.2.1. Para a normalização entre bibliotecas nós selecionamos como parâmetros o método quartil (`--library-norm-method quartile`), que aumenta a robustez na análise de genes menos abundantes, e também o método de dispersão cego (`--dispersion-method blind`), que faz a normalização sem considerar o cálculo entre réplicas biológicas. A quantificação da expressão dos genes foi dada como a frequência de fragmentos mapeados por kilobase do gene por milhão de sequências mapeadas na referencia (FPKM – do inglês *Fragments Per Kilobase of exon per Million reads mapped*), corrigido em função da máxima probabilidade do mapeamento acontecer no locus gênico aos loci alternativos.

4.13.2. Análise de enriquecimento GSEA

A partir da expressão gênica normalizada entre as bibliotecas nós fizemos a análise de enriquecimento de processos com a ferramenta GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), proposta por Subramanian, Tamayo et al. (2005). Esta ferramenta compara a expressão de genes entre duas condições, gerando uma lista com o ranking dos genes diferencialmente expressos em cada condição. Conjuntos de genes associados com diferentes processos são comparados dentro deste ranking, analisando se há enriquecimento destes em uma ou outra condição. Então os valores são normalizados baseado no tamanho do conjunto de genes contidos em cada processo e é determinada

a taxa de falsos positivos para cada processo. Assim é gerada uma lista dos principais processos regulados entre as duas condições testadas, que são classificadas através da significância e da menor probabilidade de falsos positivos em cada grupo. Aceitamos um processo como regulado se a significância estatística foi menor que 0.05 e taxa de falsos positivos foi menor que 25% para cada grupo. Nós utilizamos os conjuntos de processos de *Drosophila melanogaster* (versão de abril de 2015) disponível no FlyBase.org, e realizamos a conversão dos *GeneIDs* de *Ae. aegypti* utilizando o ortólogo direto com maior similaridade entre estes organismos.

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da infecção de mosquitos *Ae. aegypti* pelo DENV

Neste trabalho utilizamos o RT-qPCR com iniciadores padronizados em nosso laboratório para medir a carga viral em mosquitos individuais. O *Dengue virus* é um vírus de RNA polaridade positiva, e seu genoma é utilizado tanto para transcrição quanto para replicação viral. Diversos autores mostraram que a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) é um método rápido e sensível para quantificar o RNA viral, que é um ótimo indicador da replicação do DENV correlacionando com a detecção de partículas infectivas (Houng, Hritz et al. 2000, Houng, Chung-Ming Chen et al. 2001, Bennett, Olson et al. 2002, Molina-Cruz, Gupta et al. 2005). Esta correlação pode ser observada em nossos próprios experimentos. Para comparação, amostras de mosquitos individuais foram testadas por RT-qPCR para quantificação do RNA viral, e também tiveram o título viral calculado em número de unidades formadoras de placa (pfu) (Figura 9). Nossas análises mostraram que nossos ensaios de RT-qPCR correlacionam linearmente com a carga viral observada nos mosquitos.

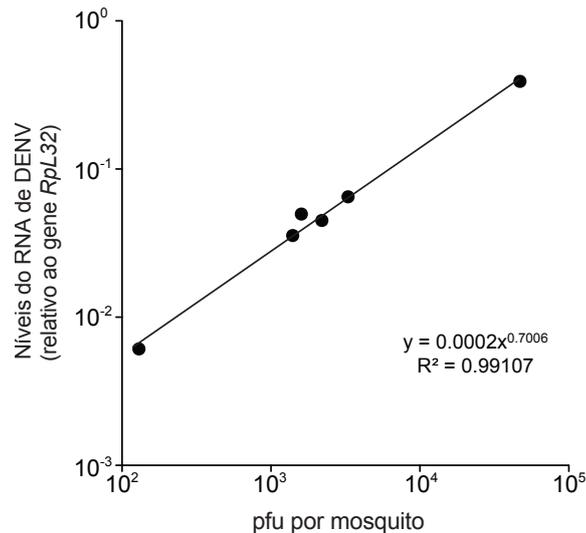


Figura 9 – Correlação da quantificação viral por pfu e RT-qPCR durante a infecção pelo DENV. Os gráficos mostram a relação entre a carga viral medida por RT-qPCR e o título viral por mosquito. Cada ponto representa um mosquito individual. A linha representa a tendência entre os pontos.

Para caracterizar os modelos de infecção com o DENV em mosquitos nós testamos as rotas de infecção por alimentação e microinjeção em fêmeas de *Ae. aegypti* com diferentes doses do DENV (**Figura 10** e **Figura 11**). Para estas infecções, utilizamos uma linhagem F₂ de mosquitos obtida a partir de ovos coletados na mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro, chamados de ‘mosquitos BR’ a partir deste momento. Os procedimentos para a infecção viral foram feitos segundo protocolos publicados previamente (Das, Garver et al. 2007, Moreira, Iturbe-Ormaetxe et al. 2009).

A Figura 10A mostra o curso da infecção em mosquitos alimentados com sangue humano contendo diferentes doses do DENV-4. Os títulos virais no sangue utilizado para alimentação dos mosquitos em cada grupo variaram entre 1x10⁷ e 1x10⁴ pfu/mL. A quantidade estimada em pfu de DENV ingerido pelos mosquitos (mostrado no gráfico) foi estimada considerando-se a alimentação média de um mosquito em 2,5 µL de sangue contaminado (valor obtido a partir do peso médio de fêmeas ingurgitadas – 4,6 µg – subtraído do peso médio de fêmeas não ingurgitadas – 2,1 µg).

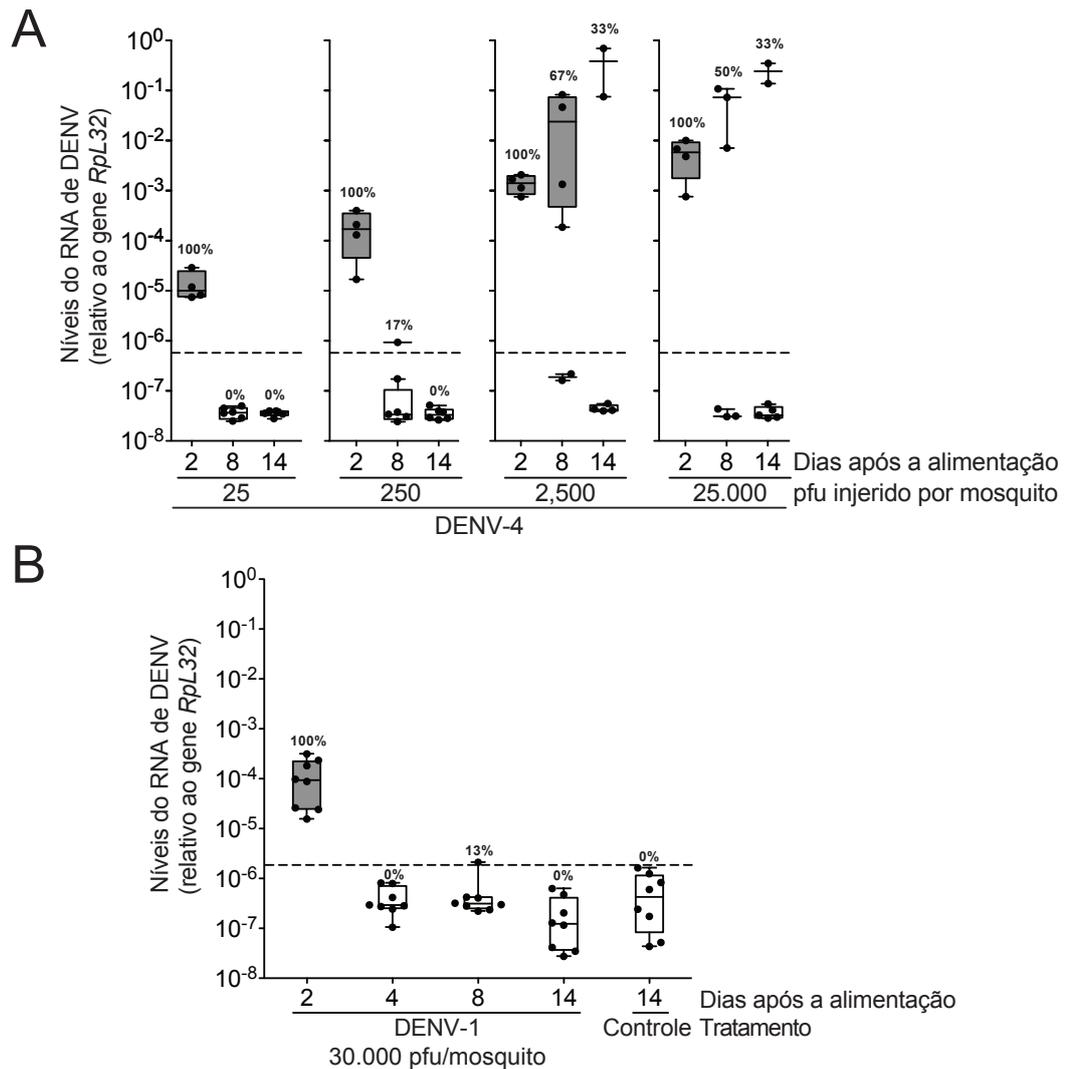


Figura 10 – A quantidade de vírus ingerido é essencial para o DENV infectar o mosquito *Ae. aegypti*. Os gráficos mostram a relação entre a carga viral e a expressão do gene constitutivo *RpL32* medidas por RT-qPCR. Em A, mosquitos BR foram alimentados com sangue humano contendo diferentes doses DENV-4, como indicado nos gráficos. Em B, mosquitos BR foram alimentados com aproximadamente 30.000 pfu de DENV-1 no sangue. Os mosquitos foram coletados individualmente nos tempos indicados nos gráficos. Os valores acima dos grupos representam a prevalência da infecção, as caixas preenchidas representam detecção viral e as caixas vazadas representam grupos abaixo do limite de detecção (linha pontilhada). As barras horizontais representam a mediana, os intervalos interquartis, e os valores máximo e mínimo observados para cada grupo de mosquitos.

Nos grupos de mosquitos alimentados com diferentes doses do DENV-4 (Figura 10A), a carga viral detectada com 2 dias é diretamente proporcional a concentração de vírus oferecida na alimentação (Pearson $r = 0,9891$, $n = 4$, $p = 0,0109$, $r^2 = 0,9783$), sugerindo que a detecção é oriunda do inóculo presente no bolo alimentar em processo

de digestão. Nos grupos alimentados com 250 e 25 pfu por mosquito a prevalência foi de 100% no 2° dpi, no 8° dpi a prevalência foi de 17% para o grupo alimentado com 250 pfu, enquanto nos outros grupos não houve detecção viral. Já nos grupos alimentados com 25.000 e 2.500 pfu de DENV-4 por mosquito nós observamos que a prevalência de 100% observada com 2 dias após a alimentação cai para 58-67% com 8 dias e 33% com 14 dias. Estes resultados sugerem que a dose mínima para infecção dos mosquitos com o DENV-4 foi de 2.500 pfu e que neste caso, o aumento em 10 vezes da dose para 25.000 pfu não aumentou a prevalência. Assim, parecem existir variações de resistência intra-populacionais na colônia de mosquitos que nós utilizamos. É importante destacar que ao compararmos diferentes populações de mosquitos em nosso laboratório (BR e Red Eyes - RED) e também com resultados obtidos por nosso colaborador Dr. Jayme Souza Neto, a prevalência da infecção em mosquitos foi específica de cada população, utilizando o mesmo vírus nas mesmas condições experimentais (Tabela 4). Estas observações estão de acordo com a literatura que mostram variações na resistência são características específicas de cada população de mosquitos (Bennett, Olson et al. 2002).

Tabela 4 – Comparação da susceptibilidade de diferentes populações de mosquitos *Ae. aegypti* à infecção pelo DENV-4.

Linhagem	Prevalência da infecção*
BR	71-88%
RED	88%
Neópolis (SE)**	73%
Botucatu (SP)**	27%

* - referente ao 4° dia após a alimentação. N = entre 24 e 60 fêmeas.

** - o nome das linhagens refere-se ao local de onde foram isoladas.

Para comparar a infecção viral entre diferentes sorotipos do DENV nós alimentamos mosquitos com o DENV-1. Interessantemente, mesmo alimentando os mosquitos com 30.000 pfu do DENV-1, que é uma dose 12 vezes superior à necessária à

infecção pelo DENV-4, não observamos infecção produtiva nos mosquitos (Figura 10B). De maneira similar ao DENV-4, com 2 dpf a detecção viral observada é provavelmente associada ao inóculo no bolo alimentar em digestão. Nos outros tempos testados não houve detecção viral persistente, sugerindo que o DENV-1 não é capaz de infectar os mosquitos nas mesmas condições que o DENV-4 (Figura 10B). Estes resultados estão de acordo com a literatura onde a capacidade de infectar mosquitos é determinada em parte pela genética do vírus (Gubler, Nalim et al. 1979, Nguyen, Thi Hue Kien et al. 2013).

O curso da infecção em mosquitos alimentados com diferentes doses do DENV sugere que a capacidade do DENV de infectar o mosquito *Ae. aegypti* é dependente do vírus utilizado e da dose. Um dos efeitos observados é a queda acentuada do percentual de mosquitos positivos para o DENV entre o 2° e o 8° dia após a alimentação. Segundo Salazar, Richardson et al. (2007), a infecção inicial em mosquitos alimentados com sangue com DENV-2 é restrita à células epiteliais da traqueia e do intestino. A disseminação deste vírus para tecidos adjacentes, como o abdômen, ocorre predominantemente a partir do 4° dpi. Estas observações sugerem que a barreira de infecção do intestino é o maior bloqueio à infecção pelo DENV em nosso modelo, conforme já observado por outros autores (Bennett, Olson et al. 2002). A concentração do vírus no sangue é determinante para que esta barreira seja superada.

Os mosquitos utilizados neste trabalho são gerações F₂ obtidas a partir de cruzamentos entre diversas linhagens coletadas em campo, o que sugere a existência de grande diversidade genética na população utilizada neste trabalho. Como discutido por Lambrechts, Chevillon et al. (2009), diferentes populações de mosquitos podem definir a população genética do DENV numa região, sugerindo que interações genótipo do vetor X genótipo do vírus (G x G) podem promover adaptação viral à população local de mosquitos. Esta seleção sugere que as barreiras de infecção afetam o fitness da transmissão viral por uma dada população, além de já ter sido demonstrado que as barreiras são um ponto crítico para impedir o vírus de ser transmitido por diferentes linhagens de mosquitos (Black, Bennett et al. 2002, Kramer and Ebel 2003). Em nosso

modelo de infecção nós observamos grande influência da barreira do intestino no curso da infecção pelo DENV nos mosquitos *Ae. aegypti* testados, quando comparadas as rotas de infecção por alimentação e por microinjeção com o DENV. Entender os processos que definem a o estabelecimento das barreiras pode auxiliar a compreensão da patogenicidade associada com a infecção pelo DENV no mosquito.

4.2. Influência da barreira do intestino na infecção pelo DENV em mosquitos *Ae. aegypti*

Para avaliar o crescimento viral sem a influencia da barreira do intestino, mosquitos *Ae. aegypti* foram microinjetados intratoracicamente com diversas doses de DENV-4 e -1, coletados e testados individualmente nos tempos de 1, 2, 4 e 8 dpi (Figura 11A e B). A grande maioria dos grupos de mosquitos injetados tiveram 100% de prevalência de infecção, ficando apenas os grupos 1 e 2 dpi injetados com 1,6 pfu de DENV-4 com prevalência de 66% (Figura 11A). Considerando que os tempos de 4 e 8 dpi do grupo injetado com 1,6 pfu de DENV-4 possuem 100% de prevalência, os mosquitos não detectados para DENV com 1 e 2 dpi possivelmente possuíam carga viral abaixo do limite de detecção do RT-qPCR.

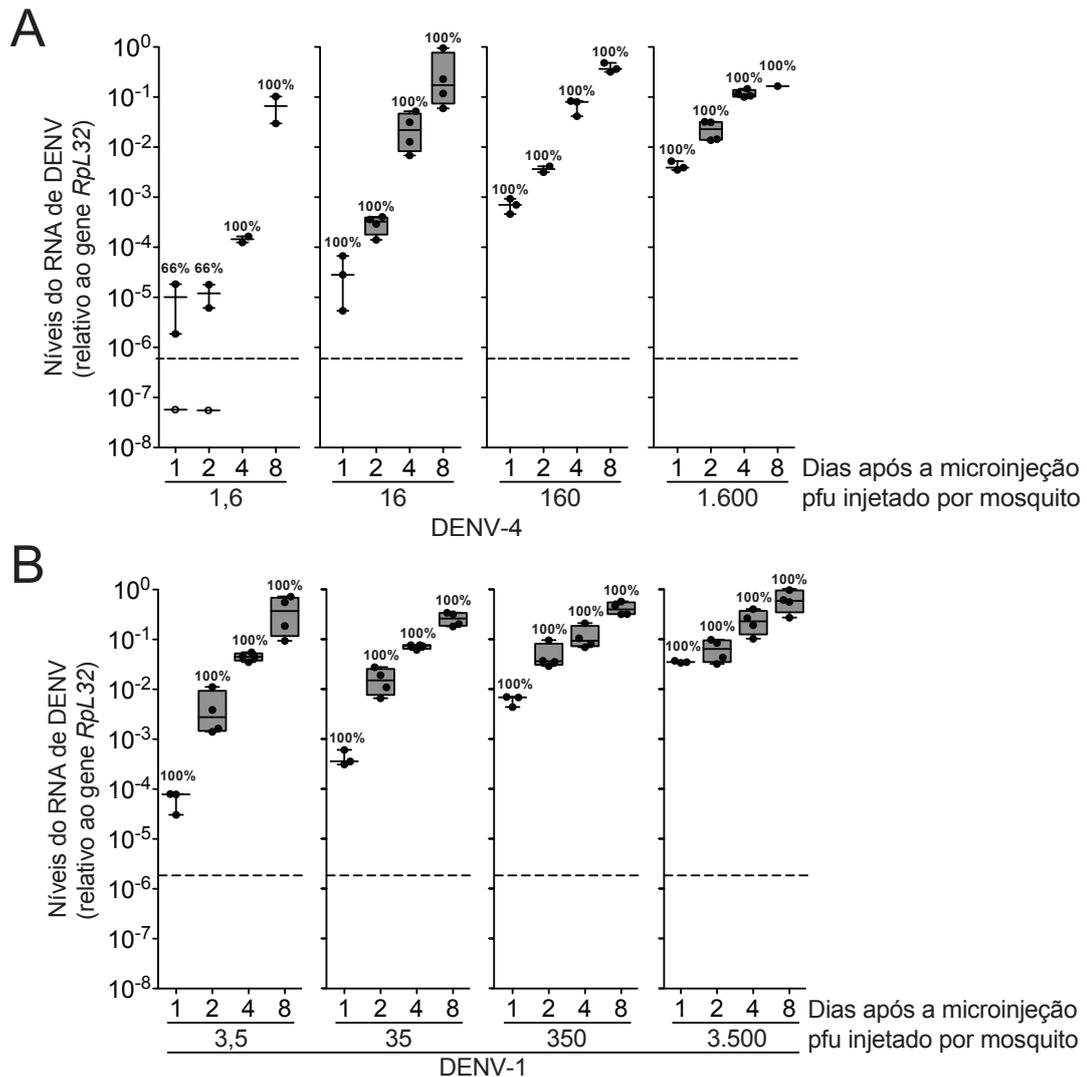


Figura 11 – A quantidade de vírus injetado não interfere na infecção em mosquitos *Ae. aegypti*. O gráfico mostra a relação entre a carga viral e a expressão do gene constitutivo *RpL32* medidas por RT-qPCR. Em A e B, mosquitos BR foram injetados com diferentes doses de DENV-4 e DENV-1, respectivamente, nas quantidades indicadas nos gráficos. Os mosquitos foram coletados individualmente nos tempos indicados. Os valores acima dos grupos representam a prevalência da infecção, as caixas preenchidas representam detecção viral e linha pontilhada representa o limite de detecção da técnica. As barras horizontais representam a mediana, os intervalos interquartis, e os valores máximo e mínimo observados para cada grupo de mosquitos.

A carga viral nos mosquitos injetados foi proporcional a quantidade injetada nos tempos precoces de 1 e 2 dias. No tempo de 4 dpi as doses de 1.600, 160 e 16 pfu para o DENV-4 já apresentam carga viral média semelhante, enquanto que somente no 8° dpi há equiparação do crescimento viral entre todas as diferentes doses. De maneira semelhante, o crescimento do DENV-1 equipara-se em todas as doses após o 4° dpi,

alcançando níveis similares com 8 dpi. Este comportamento sugere que há um limite onde ocorre saturação da carga viral suportada em um mosquito.

Comparando a dose infectiva por microinjeção e alimentação, nós vimos que doses tão baixas quanto 1,6 pfu de DENV-4 ou 3,5 pfu de DENV-1 por microinjeção foram suficientes para que o mosquito seja infectado, enquanto que na alimentação a dose mínima necessária para que o vírus ultrapasse as barreiras do intestino e infecte produtivamente o mosquito foi 2.500 pfu para o DENV-4, enquanto que para o DENV-1 não pudemos determinar a dose mínima necessária, já que com o título viral máximo que obtivemos não houve infecção produtiva. Assim, a dose infectiva para o DENV-4 por alimentação é pelo menos 1.500 vezes maior comparada à microinjeção.

Na infecção por microinjeção o vírus não necessita ultrapassar as barreiras do intestino para que ocorra uma infecção produtiva, diferentemente da rota natural de infecção do mosquito *Ae. aegypti* com o DENV. Sendo assim, o modelo de infecção por alimentação fornece indícios para entender a atuação das barreiras do intestino à infecção e disseminação, ao passo que a microinjeção pode ser utilizada como modelo para estudo da disseminação sistêmica do DENV no mosquito *Ae. aegypti*. A comparação entre nossos dois modelos sugere que a barreira do intestino é o maior desafio a infecção produtiva do mosquito pelo DENV.

4.3. Caracterização celular e molecular da cinética de infecção pelo DENV-4 no mosquito *Ae. aegypti*

Considerando que somente o DENV-4 foi capaz de causar uma infecção produtiva a partir da rota natural de infecção no mosquito, nós utilizamos este vírus para estabelecer nosso modelo de infecção e estudar a interação do DENV com o hospedeiro invertebrado.

Assim, com o intuito de avaliar os tempos precoces à infecção, onde o vírus está entrando em contato com o epitélio do intestino, e também avaliar tempos tardios, onde o

vírus está disseminando para os diversos órgãos do mosquito, nós realizamos uma infecção por alimentação em mosquitos BR, e coletamos mosquitos individuais 0, 3, 14, e 24 h após a alimentação, considerados aqui tempos precoces, e 2, 4, 8 e 14 dias após a alimentação, considerados tempos tardios (Figura 12).

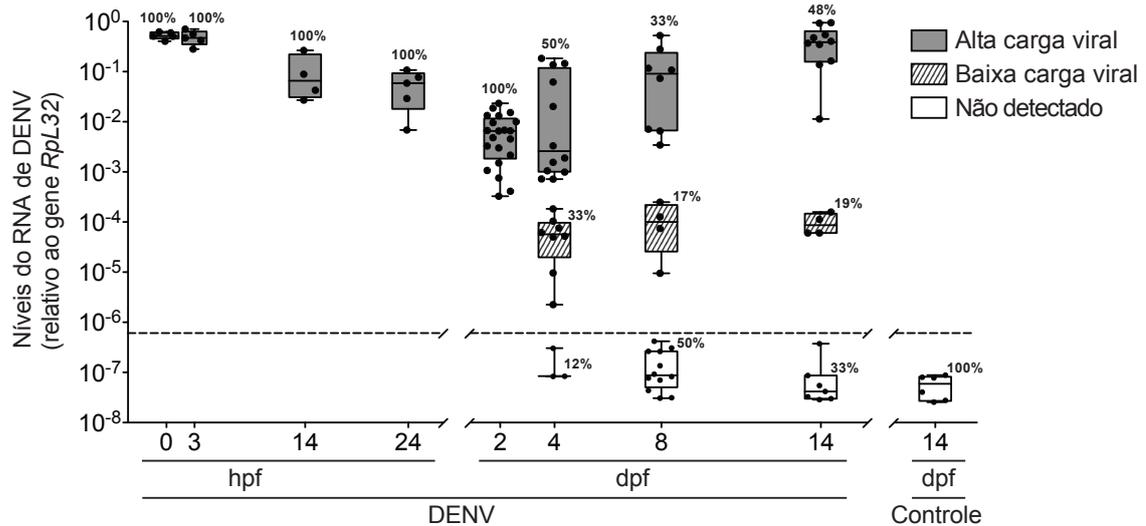


Figura 12 – Cinética da infecção pelo DENV em mosquitos *Ae. aegypti*. Os gráficos mostram a relação entre a carga viral e a expressão do gene constitutivo *Rpl32* medidas por RT-qPCR. Mosquitos BR alimentaram-se com aproximadamente 25,000 pfu de DENV-4 a partir de sangue humano contaminado. Grupos controle foram alimentados com sangue sem o vírus. Os mosquitos foram coletados e testados individualmente nos tempos indicados nos gráficos. Os valores em porcentagem mostram a fração de indivíduos representados em cada grupo, as caixas preenchidas representam detecção viral e as caixas vazadas representam grupos abaixo do limite de detecção (linha pontilhada). As barras horizontais representam a mediana, os intervalos interquartis, e os valores máximo e mínimo observados para cada grupo de mosquitos.

A Figura 12 mostra a cinética de infecção pelo DENV em mosquitos BR, após estes terem ingerido uma quantidade de aproximadamente 25,000 pfu do vírus a partir de sangue humano contaminado. Esta concentração foi utilizada para trabalharmos com um excesso de vírus capaz de saturar a capacidade de infecção de mosquitos como observado na Figura 10. Podemos observar que 100% dos mosquitos testados até o tempo de 2 dias (48 h) após a alimentação apresentaram alta carga viral, apesar desta decair a partir de 3 h após a alimentação, e seguir esta tendência até o tempo de 2 dias

(48 h). Esta detecção pode ser associada com o inóculo inicial ainda sendo digerido pelo mosquito, da mesma maneira como observado no tempo de 2 dpf nos mosquitos alimentados com diferentes doses de DENV-4 (Figura 10A).

Para verificar a cinética da digestão do sangue ingerido pelo mosquito e correlacionar com o decaimento da carga viral observado nos tempos iniciais da infecção pelo DENV, nós quantificamos por RT-qPCR os níveis de mRNA da actina humana e titulamos macerados de mosquitos. Nossos resultados de RT-qPCR mostraram correlação de Pearson positiva da carga viral detectada pela quantificação da actina humana ($r = 0,83$, $n = 19$, $p < 0,0001$, $r^2 = 0,69$) para os tempos até 2 dpf. Nossos dados corroboram dados publicados anteriormente, que utilizando condições de umidade, temperatura, e ciclo claro/escuro semelhantes ao utilizados em nossos experimentos, observaram que após 38 h os mosquitos digerem aproximadamente 50% do sangue, finalizando a digestão após aproximadamente 48 a 72 h (O'gower 1956, Downe, Goring et al. 1963, Edman 1970).

É importante destacar que a titulação para determinação de partículas infectivas do DENV nos tempos de 0, 3 e 14 h mostraram decaimento de aproximadamente 100 vezes entre 0 e 14 h, semelhante à queda no sinal do RT-qPCR (Figura 13). Isto sugere que a detecção do RNA viral por RT-qPCR correlaciona com a presença de partículas infectivas do vírus. Entretanto, nas análises por RT-qPCR anteriores ao tempo de 4 dpf não é ainda possível diferenciar o sinal proveniente do inóculo presente no sangue da replicação ativa em células do intestino. Portanto, o RT-qPCR não nos permite identificar mosquitos que estão realmente infectados nos tempos anteriores a 4 dpf.

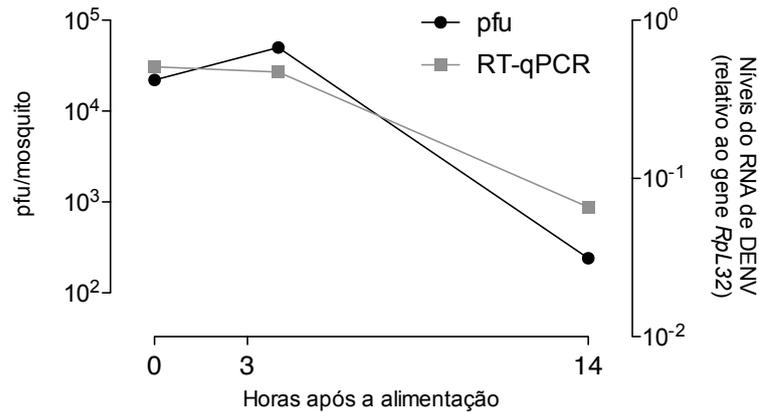


Figura 13 – Correlação da quantificação da carga do DENV quantificado por RT-qPCR e por unidades formadoras de placa nos tempos iniciais à infecção. A figura mostra a detecção da carga viral quantificada por unidades formadoras de placa por mosquito, ou a mediana da detecção de um grupo de mosquitos por RT-qPCR. Os mosquitos foram alimentados com aproximadamente 25.000 pfu de DENV-4.

Nossos resultados sugerem que, a partir de 4 dpf, é possível observar 3 grupos de mosquitos de acordo com a carga viral (Figura 12). Nós observamos um grupo com alta carga viral, um grupo com baixa carga viral, e um grupo negativo no teste, tendo carga viral abaixo no limite de detecção. Numericamente, o grupo com alta carga viral possui a quantificação relativa de DENV superior à menor detecção do inóculo detectado no bolo alimentar com 2 dpf, indicando replicação viral. O grupo com baixa carga viral apresenta quantificação abaixo do menor sinal detectado com 2 dpf e acima do limite de detecção, e os grupos não detectados possuem carga viral abaixo do limite de detecção. A prevalência da infecção nos grupos com carga viral detectada é semelhante entre grupos com mesma classificação, sendo de 50% com 4 dpf, 33% com 8 dpf, e 48% com 14 dpf nos grupos com alta carga viral, enquanto nos grupos com baixa carga viral temos prevalências de 33, 17 e 19% para os tempos de 4, 8 e 14 dpf, respectivamente. Interessantemente, a prevalência do grupo abaixo do limite de detecção apresenta a maior variabilidade, tendo com 4 dpf a prevalência de 12%, prevalência de 50% com 8 dpf, e 33% de prevalência com 14 dpf. O grupo de mosquitos alimentados com sangue sem o vírus serve como referência para o limite de detecção da técnica.

Nós hipotetizamos que o grupo com alta carga viral é formado por mosquitos susceptíveis à infecção. Comparando a carga viral neste grupo nos diferentes dias após a infecção, nós podemos inferir que há crescimento do vírus, sendo a carga viral relativa com 8 dpf aproximadamente 35 vezes maior do que 4 dpf, e quase 5 vezes maior com 14 dpf em relação a 8 dpf. Nos grupos com baixa carga viral, não parece haver crescimento do vírus, já que a carga viral média com 8 dpf foi aproximadamente 1,7 vezes maior que com 4 dpf, e a carga viral média com 14 dpf aproximadamente 1,2 vezes menor que 8 dpf. Estes mosquitos que apresentam baixa carga viral podem estar associados com um fenótipo de controle da infecção, na qual os mosquitos se infectam, mas o vírus não é capaz de ultrapassar a barreira de disseminação do intestino.

Nossos dados sugerem que, mesmo dentro de uma população de mosquitos, existem indivíduos susceptíveis e refratários/resistentes à infecção pelo DENV. Uma vez que estas diferenças não são observadas após a injeção do vírus, as variações provavelmente estão ligadas às barreiras de infecção e disseminação do intestino. Variações naturais nas barreiras do intestino foram observadas anteriormente em populações de mosquitos. Bennett, Beaty et al. (2005) utilizaram retro-cruzamentos entre populações distintas de mosquitos *Ae. aegypti* para selecionar linhagens com diferentes susceptibilidades à infecção do intestino pelo DENV, com alta ou baixa capacidade de disseminação para outros tecidos. Utilizando um sistema de alimentação artificial e diferentes isolados de DENV dos 4 sorotipos, foram observadas variadas prevalências de infecção tanto entre diferentes genótipos de um mesmo sorotipo, quanto entre os diferentes sorotipos testados.

Nosso resultados sugerem que características genéticas de cada vírus, juntamente com a contribuição genética dos mosquitos, interferem na capacidade vetorial de cada população de *Ae. aegypti*.

4.3.1. Marcadores da replicação viral nos mosquitos infectados com DENV

Para determinar se a detecção viral observada nos grupos correlaciona-se com a replicação do DENV, nós testamos mosquitos com alta carga viral, baixa carga viral, e carga viral indeterminada, lançando mão da técnica de RT-PCR fita específico, já que o RT-qPCR não é capaz de distinguir entre os genomas replicativo (senso negativo) e mensageiro (senso positivo). Apesar de uma variedade de PCRs quantitativos fita específica já terem sido reportados para o DENV (Wang, Sung et al. 2002, Anderson and Rico-Hesse 2006, Richardson, Molina-Cruz et al. 2006), as metodologias como foram aplicadas carecem de controles específicos, gerando dúvidas na sua interpretação. Para garantir a especificidade de nossa detecção fita específica, nós adaptamos a metodologia de Plaskon, Adelman et al. (2009) que, para o *O'nyong-nyong virus* (ONNV) e para o *Chikungunya virus* (CHIKV), utilizou iniciadores específicos para o genoma senso positivo ou negativo, acrescidos de uma sequência específica que é fundamental para a especificidade da reação.

A Figura 14 mostra a detecção do RNA genômico do DENV (fita +), seu intermediário de replicação (fita -), e o gene constitutivo *RpL32* em pools de RNA total obtidos a partir de amostras de mosquitos individuais correspondentes aos grupos previamente selecionados pela carga viral (Figura 12).

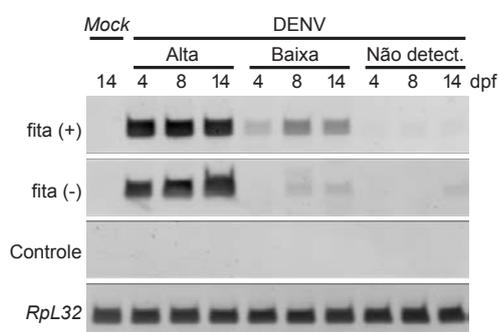


Figura 14 – Detecção fita específica do DENV em mosquitos infectados por alimentação. As figuras mostram a detecção utilizando iniciadores específicos para cada fita do DENV, ou a detecção do gene constitutivo *RpL32*. As amostras foram testadas a partir de *pools* de RNA de mosquitos BR alimentados com aproximadamente 25,000 pfu de DENV-4. Grupos controle foram alimentados com sangue não contaminado.

Nos tempos de 4, 8 e 14 dpf a digestão do sangue já foi completamente finalizada e a detecção da fita negativa do DENV é associada à replicação viral (Figura 12A). No grupo com alta carga viral é observada detecção da fita negativa quando comparado aos outros grupos, sugerindo que há replicação viral. No grupo com baixa carga viral, há também detecção da replicação mas somente com 8 e 14 dias após a alimentação, sugerindo que neste grupo poder haver alguma replicação viral residual. No grupo com carga viral não detectada por RT-qPCR mostra o mesmo resultado negativo com o RT-PCR fita específico, sugerindo que neste grupo os níveis de RNA viral estão abaixo do limite de detecção.

4.3.2. Caracterização da infecção DENV-4 em intestinos de mosquitos *Ae. aegypti* por microscopia de fluorescência

Após a ingestão do DENV-4 pela alimentação, o intestino é o primeiro tecido a se tornar infectado. Segundo Salazar, Richardson et al. (2007) a infecção pelo DENV-2 inicia-se através de pequenos focos, que aumentam radialmente através do contágio de células adjacentes, e atinge o órgão inteiro ou grande parte dele após 7-10 dias. Para verificar a dinâmica da infecção pelo DENV após a alimentação com sangue contaminado, nós dissecamos intestinos de mosquitos BR e os testamos por ensaio de imunofluorescência (IFA) ou RT-qPCR.

A Figura 15 mostra o padrão da infecção observada em intestinos de mosquitos nos tempos de 4 e 8 dpf. Com 4 dias os focos de infecção apresentam-se circulares (Figura 15A), ou radiais (Figura 15B), sugerindo que o vírus dissemina-se para as células adjacentes a partir de um ponto inicial de infecção. O padrão observado com 8 dias após a alimentação mostra a infecção difundida no epitélio do intestino. Em nenhum tempo testado o DENV parece não infectar as células da musculatura lisa do intestino do mosquito (Figura 15A), confirmando as observações de (Salazar, Richardson et al. 2007).

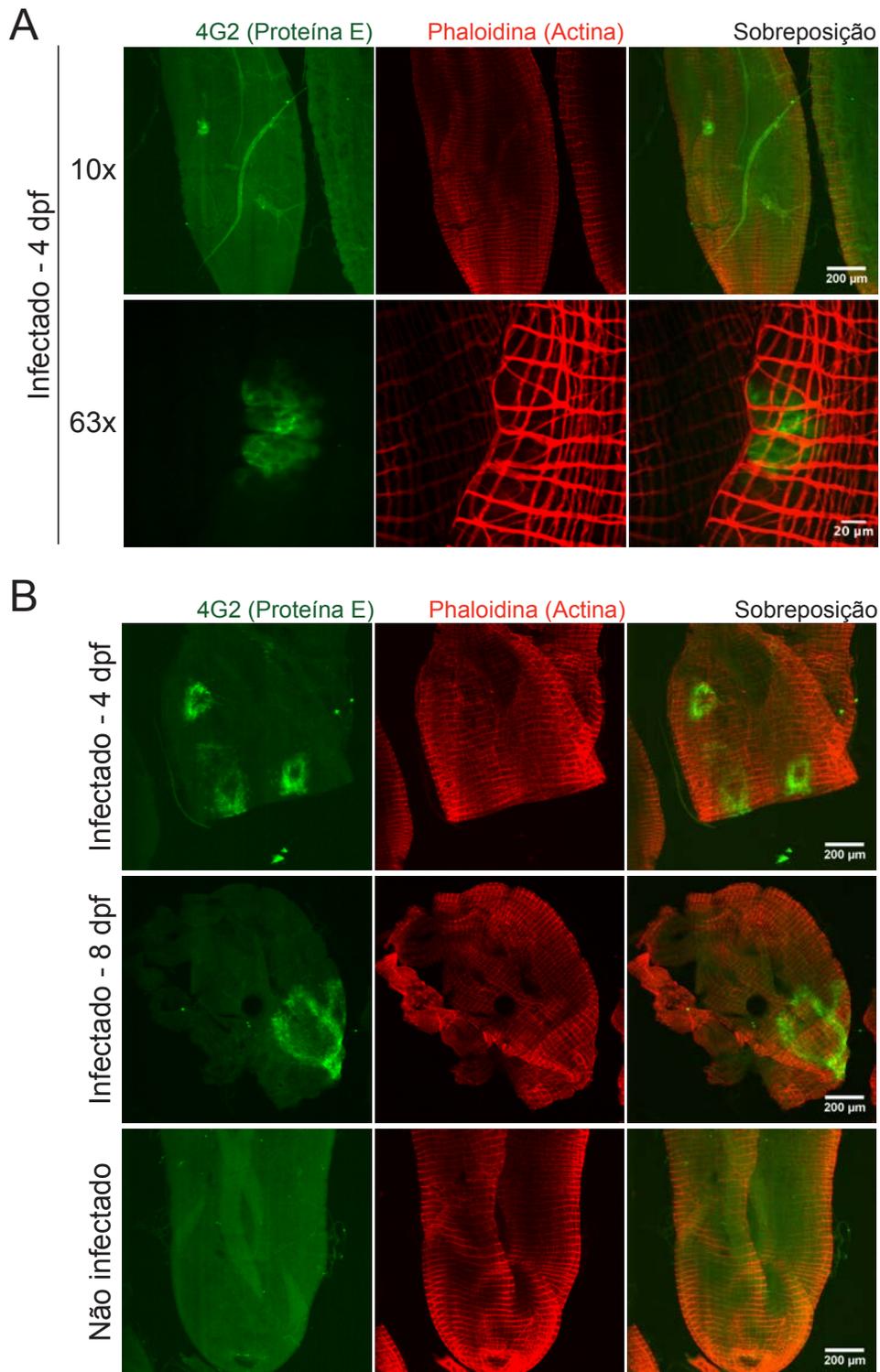


Figura 15 – Tropismo do DENV-4 no intestino do mosquito *Ae. aegypti*. Mosquitos BR alimentados com aproximadamente 25.000 pfu de DENV-4 a partir de sangue humano contaminado foram dissecados e seus intestinos testados para a presença do DENV por IFA com anticorpo 4G2. Intestinos representativos dos tempos de 4 e 8 dpi são mostrados (24 intestinos por tempo foram avaliados). O controle negativo corresponde ao mosquito alimentado sem o vírus. Com 4 dias observamos a presença de focos circulares de infecção, enquanto com 8 dias a infecção foi disseminada.

A carga viral medida por RT-qPCR no intestino dos mosquitos com 8 e 14 dpf mostra resultados semelhantes aos que observamos nos mosquitos inteiros (Figura 16A). A prevalência de infecção nos intestinos por RT-qPCR é semelhante à detectada em mosquitos inteiros Figura 16B. Em paralelo, a proporção dos intestinos testados por imunofluorescência que possuíam marcação característica da infecção viral (delimitação celular visível com vírus localizados próximos à membrana citoplasmática) corresponde somente à taxa dos grupos com alta carga viral. Nós hipotetizamos que o grupo com baixa carga viral medida por RT-qPCR pode estar associado com vírus que, apesar de terem infectado o epitélio, a produção de suas proteínas é ainda muito baixa no intestino.

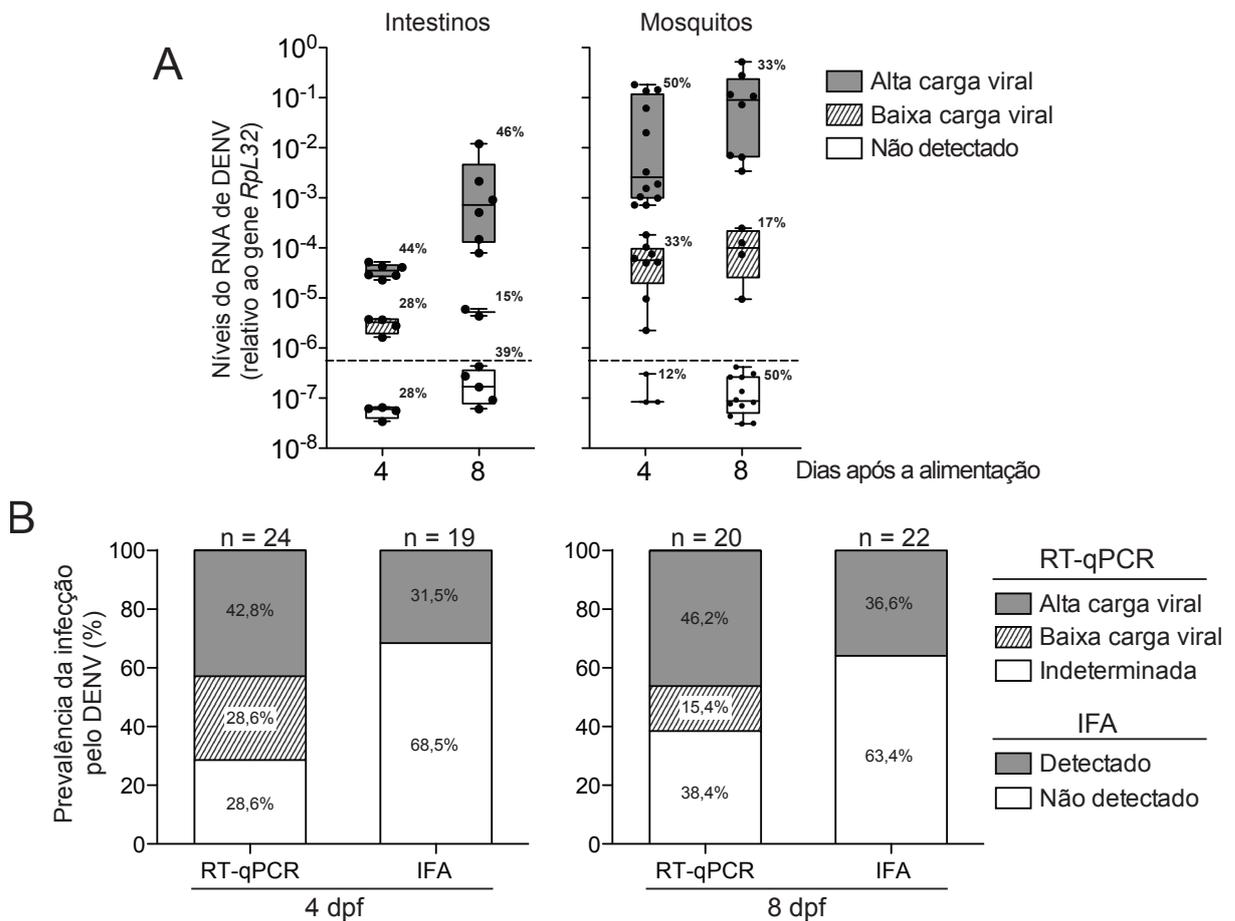


Figura 16 – Prevalência da infecção em intestinos de mosquitos infectados pelo DENV-4. Mosquitos BR alimentados com aproximadamente 25.000 pfu de DENV-4 a partir de sangue humano contaminado foram dissecados e seus intestinos testados para a presença do DENV por RT-qPCR ou IFA com anticorpo 4G2. Em A, a carga viral do DENV-4 detectada nos intestinos do mosquito. A prevalência da infecção medida por RT-qPCR corresponde ao experimento mostrado na **Figura 12**. A prevalência do grupo analisado por IFA corresponde ao grupo com alta carga viral quantificado por RT-qPCR.

O padrão de crescimento do vírus pode estar relacionado ao tropismo e/ou mecanismo de infecção do epitélio do intestino. Com este objetivo, nós analisamos a preferência da região do intestino infectada, e o número de focos observados em cada intestino com 4 dpf (Tabela 5). Nós observamos que o vírus parece ter preferência pela porção média e distal do intestino médio (representado na Figura 17 como *Midgut – medial portion* ou *distal portion*). Como já observado por Stephen and Higgs (2004), as infecções virais pelo *Japanese encephalitis virus* e pelo DENV-2 em mosquitos através da rota natural de infecção tendem a iniciar-se na porção distal do intestino (Doi 1970, Kuberski 1979). Nesta região as células têm proeminentes retículos endoplasmáticos e um elevado número de mitocôndrias (Hecker 1977), e é onde principalmente acontece a absorção de componentes do sangue. Apesar das evidências, ainda não está claro se a preferência de infecção é associada a uma subpopulação de células susceptíveis nesta região ou se é devido a algum aspecto fisiológico/físico do sangue entrando no intestino.

Tabela 5 – Número de focos de infecção por região do intestino com 4 dpf. Cada linha representa um mosquito infectado, e os números representam a quantidade de focos por região do intestino.

	Intestino anterior	Intestino médio		Intestino posterior	Total*	
		Porção anterior	porção média			Porção distal
	-	1	2	7	-	10
	-	-	3	1	-	4
	-	1	-	1	-	2
	-	-	2	-	-	2
	-	-	1	-	-	1
	-	-	1	-	-	1
Total	0	2	9	9	0	20

* Total de focos observados em 6 intestinos de 19 testados.

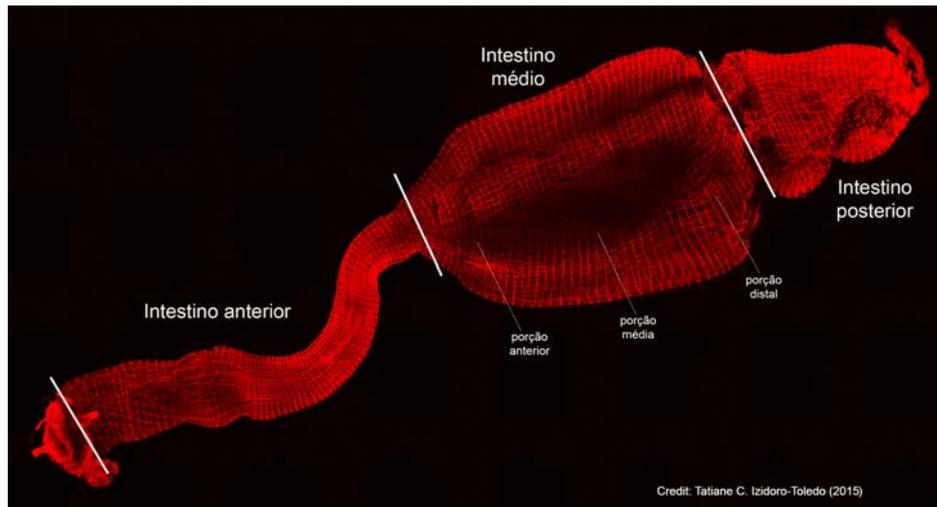


Figura 17 – Organização estrutural do intestino do mosquito *Ae. aegypti*. Em vermelho é mostrado o esqueleto de actina de um intestino. A marcação foi feita com Phalloidina-Rodamina. As linhas brancas delimitam as porções do intestino, ou indicam a subregião representada. Crédito da foto: Dra. Tatiane C. Izidoro-Toledo (2015).

É também importante destacar que a maior parte dos intestinos apresentam um ou 2 focos de infecção, sugerindo que a infecção dos mosquitos é em sua maioria iniciada por um único ou poucos clones virais, assim como observado para outros vírus (Weaver, Scott et al. 1988, Girard, Klingler et al. 2004, Smith, Adams et al. 2008). Além disso, o tamanho dos focos com 4 dias de infecção nos mosquitos com mais de um foco, mostra que estes possuem tamanhos semelhantes. O tamanho e número de células em um foco da infecção também se assemelha ao que observamos em células C6/36 após 4 dias de infecção com o mesmo vírus (dados não mostrados) sugerindo que a taxa de replicação e disseminação viral em cultura é similar ao observado no epitélio do intestino do mosquito *in vivo*. Se considerarmos que a taxa de replicação do DENV no intestino é similar entre os diferentes focos e que há a disseminação radial do DENV no epitélio, a circunferência similar observada para os diferentes focos sugere que a infecção foi sincronizada, ou seja, ocorreu apenas em uma janela temporal pequena. É importante destacar que a janela de infecção provavelmente não é determinada pela inativação do vírus uma vez ingerido pois nós detectamos pouca perda de partículas infectivas no inoculo viral com até 14 horas após a alimentação (Figura 13).

A formação da matriz peritrófica após o repasto sanguíneo pelo mosquito pode ser um fator limitante para a infecção viral neste organismo. Após 4 horas a matriz peritrófica já é detectada, e os vírions possivelmente não atravessariam a matriz dado seu tamanho (Houk, Obie et al. 1979, Edwards and Jacobs-Lorena 2000). Entretanto, Kato, Mueller et al. (2008) mostraram que, ao silenciar um gene cuja função é indispensável na biogênese da matriz peritrófica, não há aumento na disseminação nem na prevalência da infecção. Após 4 horas da alimentação com sangue inicia-se a hemólise e a coagulação do sangue ingerido (Revisado por Gooding R, 1972), e os vírus presos no sangue coagulado possivelmente não conseguirão entrar em contato com o epitélio do intestino. Assim, outros fatores como a própria coagulação do sangue além da matriz peritrófica podem restringir a formação de novos focos de infecção no intestino após algumas horas depois do repasto sanguíneo.

4.4. Influência da via de RNAi na infecção de mosquitos *Ae. aegypti* pelo DENV

4.4.1 Efeito da via de siRNA na susceptibilidade dos mosquitos *Ae. aegypti* ao DENV

No mosquito *Ae. aegypti*, as infecções por arbovírus são confrontadas por diversas vias imunes inatas, dentre as quais destaca-se a via de imunidade antiviral baseada em RNA de interferência – RNAi (Franz, Sanchez-Vargas et al. 2006, Campbell, Keene et al. 2008, Cirimotich, Scott et al. 2009, Sanchez-Vargas, Scott et al. 2009, Khoo, Doty et al. 2013, McFarlane, Arias-Goeta et al. 2014). A fim de avaliar a contribuição desta via contra o DENV nós fizemos o silenciamento transiente do gene que codifica a proteína AGO2 (Figura 18), componente principal do complexo de silenciamento RISC, fundamental para o funcionamento da maquinaria de siRNA (Okamura, Ishizuka et al. 2004).

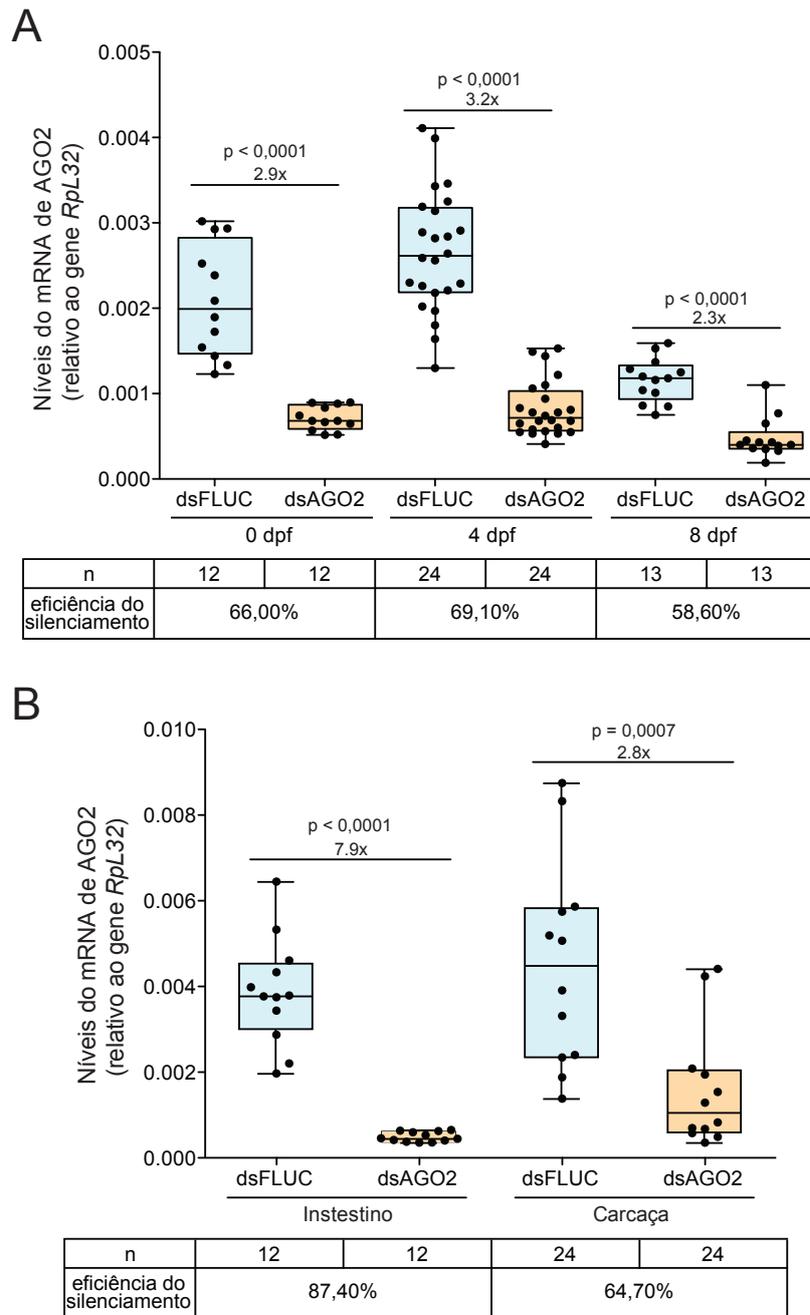


Figura 18 – Silenciamento transiente do gene AGO2 em mosquitos *Ae. aegypti*. Os gráficos mostram a relação entre a expressão do gene AGO2 em relação ao gene constitutivo *RpL32* medidas por RT-qPCR. Mosquitos RED foram injetados com 500 ng de RNA (dsAGO2 ou dsFLUC), e, em **A**, testados individualmente nos tempos indicados ou, em **B**, intestinos foram testados individualmente no momento da alimentação. Os valores em porcentagem mostram a fração de indivíduos representados em cada grupo, as caixas preenchidas representam detecção viral e as caixas vazadas representam grupos abaixo do limite de detecção (linha pontilhada). As barras horizontais representam a mediana, os intervalos interquartis, e os valores máximo e mínimo observados para cada grupo de mosquitos. Os valores de p foram calculados comparando os grupos dsFLUC e dsAGO2 utilizando ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey.

A Figura 18 mostra o fenótipo observado quando injetamos um RNA de dupla fita complementar à sequência do gene AGO2 (dsAGO2) em mosquitos RED alimentados com sangue humano contaminado com DENV-4. Estes mosquitos apresentam susceptibilidade ao DENV semelhante aos mosquitos BR (veja Tabela 4), e foram utilizados neste experimento por questões de manuseio técnico para a alimentação. Imediatamente antes da alimentação (0 dpf - Figura 18A), observamos uma diminuição de 2,9x na expressão de AGO2 no mosquito, refletindo uma eficiência de 66% no silenciamento. Este efeito manteve-se ao longo dos tempos testados, tendo eficiência de 69,1% com 4 dpf e 58,6% com 8 dpf. Em ambos os tempos o silenciamento de AGO2 foi estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) quando comparado com o controle (dsFLUC).

Nossos resultados sugerem que a principal barreira à infecção pelo DENV está no intestino do mosquito. Para verificarmos se o silenciamento de AGO2 é eficiente neste órgão, nós quantificamos a expressão deste gene em intestinos e carcaças dissecados imediatamente antes da alimentação (Figura 18B). Interessantemente, o silenciamento de AGO2 no intestino foi maior que o silenciamento na carcaça do mosquito, tendo 87,4% de eficiência no intestino comparado com 64,7% na carcaça. A eficiência do silenciamento na carcaça foi semelhante ao silenciamento visto no inseto inteiro no tempo de 0 dpf. Este resultado nos sugere que a via de RNAi induzida pela injeção de dsRNA é ativada no intestino.

Tendo visto o efeito do silenciamento do gene AGO2 tanto no mosquito quanto no intestino, nós avaliamos a cinética de crescimento viral (Figura 19) para determinar a influência maquinaria de RNAi na defesa contra o DENV-4 nos mosquitos *Ae. aegypti*. Com 4 dpf, o silenciamento de AGO2 resultou num aumento médio de 24,8x nos níveis do RNA do DENV no grupo com alta carga viral, enquanto que no grupo com baixa carga viral houve um aumento médio de 9,1x. Já com 8 dpf, o aumento na carga viral observada no grupo dsAGO2 torna-se menos proeminente, sendo de 5,7x. Não houve diferença significativa na detecção de DENV nos grupos com baixa carga viral neste tempo. Nossos resultados corroboram o observado por outros grupos que mostraram

aumento de aproximadamente 4 vezes na carga viral do DENV-2 quando feito o silenciamento de AGO2 em mosquitos (Sánchez-Vargas, Scott et al. 2009).

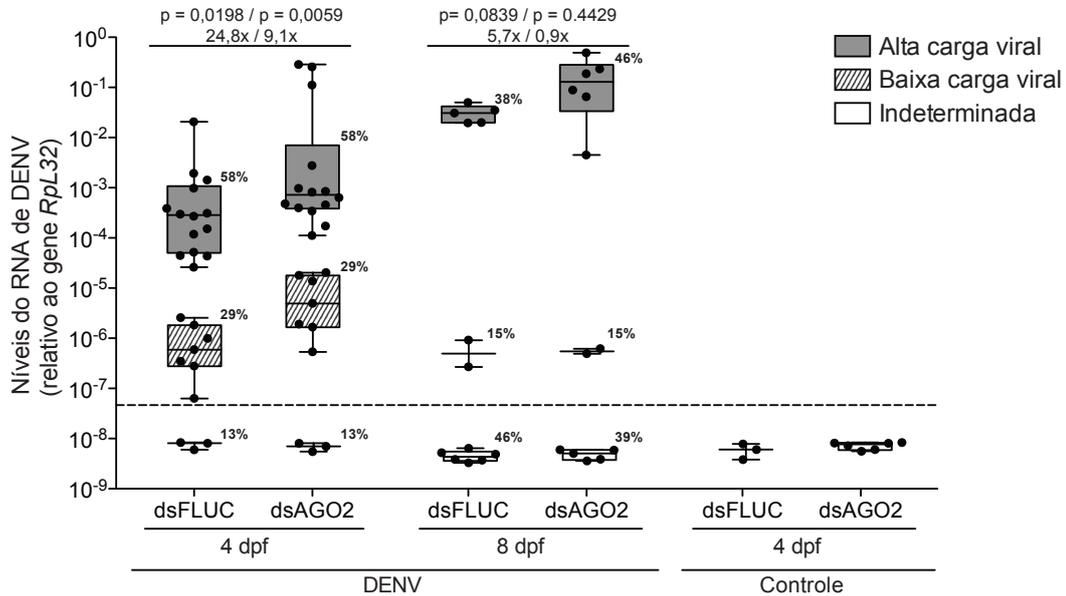


Figura 19 – Cinética de crescimento do DENV em mosquitos deficientes para a via de siRNA. Os gráficos mostram a relação entre a carga viral e a expressão do gene constitutivo *RpL32* medidas por RT-qPCR. Os mosquitos RED foram alimentado com aproximadamente 25,000 pfu de DENV-4 a partir de sangue humano contaminado. Os mosquitos foram coletados e testados individualmente nos tempos indicados. Os valores em porcentagem mostram a fração de indivíduos representados em cada grupo, as caixas preenchidas representam detecção viral e as caixas vazadas representam grupos abaixo do limite de detecção (linha pontilhada). As barras horizontais representam a mediana, os intervalos interquartis, e os valores máximo e mínimo observados para cada grupo de mosquitos. Os valores de p foram calculados comparando os subgrupos dsFLUC e dsAGO2 utilizando ANOVA *one-way* a partir dos dados log-transformados.

Apesar do aumento acentuado na carga viral observada nos mosquitos cuja via de siRNA está comprometida (Figura 19), a prevalência da infecção não é alterada nos grupos de mosquitos quando comparados ao seus controles de cada tempo. Isto nos sugere que a via de RNAi não é importante para prevenir a infecção, mas sim para controlar o crescimento viral uma vez que o mosquito foi infectado. Outros autores testaram se a via de RNAi poderia ter um papel crucial na infecção do intestino em *Ae. aegypti* utilizando uma linhagem transgênica expressando um inibidor da via de siRNAs neste tecido (Khoo, Doty et al. 2013). Similar aos nossos achados com mosquitos inteiros, não houve diferença na prevalência de intestinos/carcaças infectados com

DENV-2 após 7 e 14 dias de infecção, observando somente que, nos intestinos de 7 dias há um aumento médio da carga viral de aproximadamente 10 vezes. Estas observações sugerem que a via de RNAi tem um papel no controle da multiplicação viral no mosquito, porém não interfere na susceptibilidade à infecção que depende da barreira do intestino.

4.4.2 - Análise do repertório de pequenos RNAs de origem viral durante a infecção pelo DENV no mosquito *Ae. aegypti*

Os pequenos RNAs representam o produto da clivagem de RNAs precursores pela maquinaria de RNA de interferência e podem se originar tanto a partir de RNAs do hospedeiro, como mRNAs, quanto RNAs virais. O perfil dos pequenos RNAs gerados durante a infecção por arbovírus em mosquitos *Ae. aegypti* é indicativo da ativação da resposta de RNAi como observado por outros autores (Myles, Wiley et al. 2008, Hess, Prasad et al. 2011, Adelman, Anderson et al. 2012, Morazzani, Wiley et al. 2012).

Os siRNAs, produtos da via de siRNAs, são gerados a partir da clivagem de longos precursores de fita dupla de RNA, que podem ser de origem viral, grampos de RNA, ou pares anti-senso. Nesta via, a assinatura de sua ativação é dada pela detecção dos pequenos RNAs com tamanho de 21nt (vsiRNA), produtos da clivagem processiva de Dcr-2, que se estendem por toda a extensão do vírus (revisado por de Faria, Olmo et al. 2013).

Para avaliar o perfil dos pequenos RNAs gerados durante a infecção pelo DENV no mosquito *Ae. aegypti*, e avaliar se a via de siRNAs é ativa nos diferentes grupos de mosquitos observados na Figura 12, nós sequenciamos a fração de baixo peso molecular dos RNAs correspondentes à cada grupo de carga viral durante a cinética de infecção pelo DENV. As bibliotecas foram preparadas em *pools* de RNA ou do RNA de mosquitos individuais. A Tabela 6 resume as bibliotecas, sequenciadas na plataforma Illumina®. Em média foram sequenciados aproximadamente 18 milhões de clones por biblioteca, sendo que, após as etapas de pré-processamento, em torno de 87% das sequências mapearam

contra o genoma do mosquito *Ae. aegypti*. Curiosamente, apenas 0.15% do total de sequências processadas são correspondentes ao genoma do DENV na biblioteca com o maior número de sequências virais.

Tabela 6 – Resumo das bibliotecas de pequenos RNAs.

Condição	# indiví- duos*	# total de sequências	# map. AaegL3.3**	# map. DENV-4**	
			15-42 nt	21 nt	total
Controle 4 dpf	6	10.792.990	8.071.446	0	3
Controle 8 dpf	6	14.444.922	10.822.348	0	0
Controle 14 dpf	6	10.418.318	8.006.054	0	2
Não detectado 4 dpf	3	7.171.358	5.689.807	0	25
Não detectado 8 dpf	11	18.834.504	14.491.197	0	104
Não detectado 14 dpf	8	16.892.298	13.071.183	0	424
Baixa carga viral 4 dpf	8	11.101.469	9.427.128	2	67
Baixa carga viral 8 dpf	4	16.702.736	14.113.442	10	324
Baixa carga viral 14 dpf	4	17.333.444	12.859.115	28	524
Alta carga viral 4 dpf	10	19.832.499	15.521.382	174	801
Alta carga viral 8 dpf	7	16.061.982	10.822.348	1.685	2.161
Alta carga viral 14 dpf	9	16.968.885	13.201.025	15.574	19.345
Injetado 1 dpi	1	12.932.966	10.313.293	16	302
Injetado 2 dpi	1	14.855.152	11.702.805	179	592
Injetado 4 dpi	1	9.009.876	6.952.683	1.092	1.621
Injetado 8 dpi	1	16.094.609	12.811.842	4.706	6.209

* Número de amostras de RNA de mosquitos utilizadas para o *pool* de sequenciamento.

** Os mapeamentos foram feitos permitindo-se 1 nucleotídeo discordante por sequência.

Os resultados da distribuição de tamanho dos pequenos RNAs derivados do DENV nos grupos de mosquitos infectados que possuem alta carga viral mostra a maior abundância dos pequenos RNAs de tamanho 21 nt tanto na fita positiva quanto na fita negativa (Figura 20A), sinal característico da clivagem e processamento de intermediários da replicação do genoma viral. Durante a cinética da infecção, este grupo mostra o acúmulo crescente do número de sequências detectadas, que correlaciona-se com o crescimento viral observado nos tempos de 4, 8 e 14 dpf por RT-qPCR. Além disso, o perfil de tamanho das sequências deste grupo ainda sugere que há pouca degradação viral nestas amostras, sendo a maior parte das sequências correspondentes à produtos do processamento enzimático pela Dcr-2.

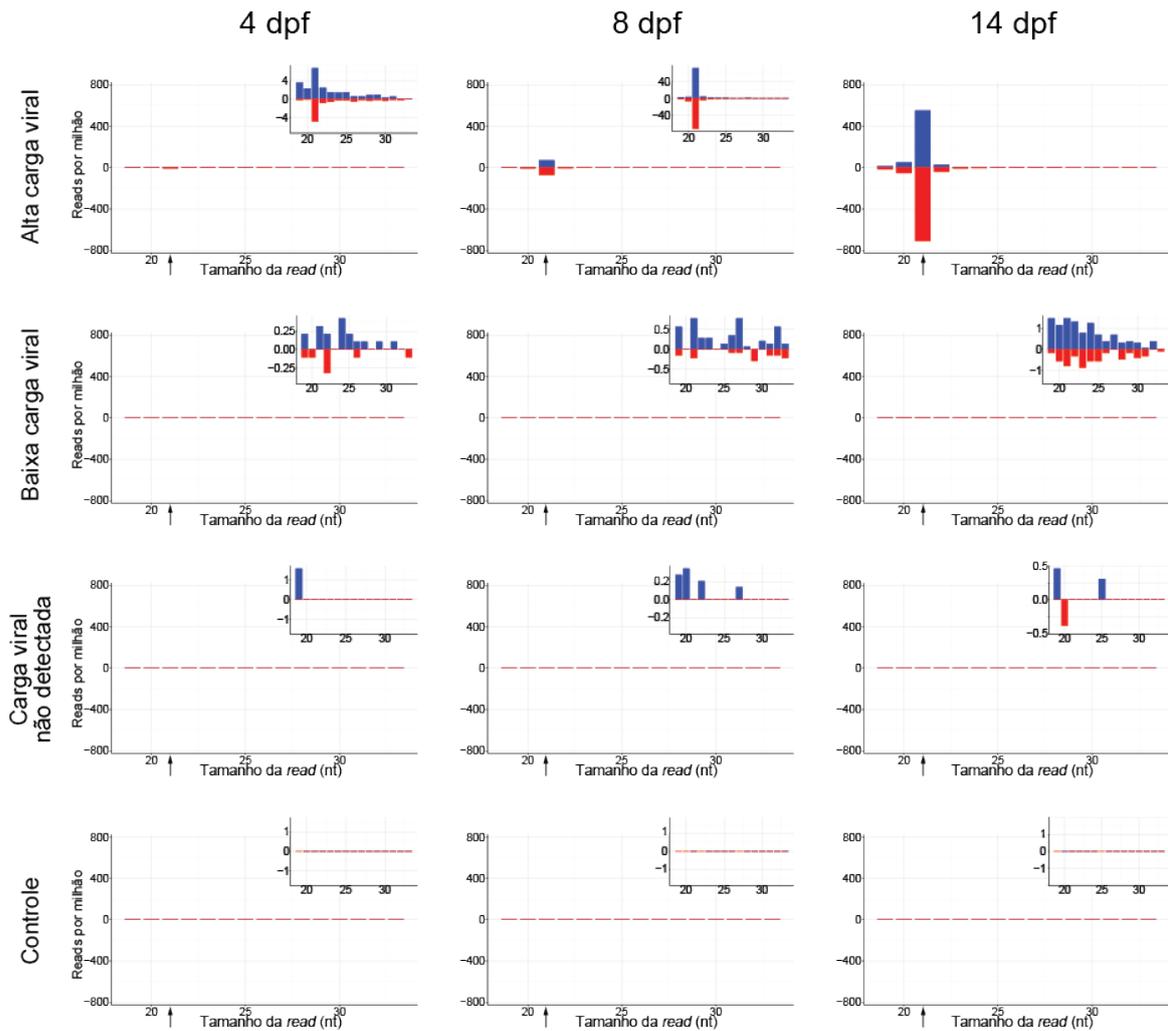


Figura 20 – Distribuição de tamanho das seqüências de pequenos RNAs que mapeiam no genoma do DENV-4. As barras representam a frequência relativa da contagem de seqüências mapeadas no genoma do DENV-4. Em azul as seqüências mapeadas no senso positivo, e em vermelho no senso negativo. As seqüências foram mapeadas utilizando o software Bowtie, permitindo-se 1 base discordante por seqüência. Cada painel representa o sequenciamento de um *pool* de RNAs de mosquitos BR com carga viral alta, baixa, ou não detectada. Os mosquitos controle foram alimentados com sangue humano não contaminado. Os painéis menores são um aumento em escala dos painéis adjacentes. As setas indicam as seqüências de 21 nt, produto canônico da via de siRNA.

É possível que a via de siRNAs controle os níveis da infecção no grupo de mosquitos que possuem baixa carga viral ou mesmo ajude a eliminar a infecção em alguns mosquitos uma vez que a prevalência de mosquitos onde o vírus não é mais detectado aumenta entre 4 e 8 dias após a alimentação. Interessantemente, os grupos com baixa carga viral ou carga viral indeterminada não possuem acúmulo de pequenos RNAs de 21 nt contra o DENV em nenhum dos tempos testados (Figura 20B e C). Nestes

grupos houve apenas a detecção de sequências do DENV com tamanho entre 15 e 35 nt, que é característica da degradação viral por nucleases do hospedeiro. Considerando que os siRNAs são estáveis uma vez que são gerados a partir do genoma do DENV, nossos resultados sugerem que eles nunca foram produzidos nos grupos onde o vírus não foi detectado ou com baixa carga viral. Assim, apesar da via de RNAi ser descrita como uma potente via de imunidade antiviral contra vírus de RNA em mosquitos, nossos resultados sugerem que esta via não exerce papel fundamental na prevenção da infecção do mosquito pelo DENV, exercendo apenas o controle na multiplicação e disseminação da infecção. Neste contexto, a produção de siRNAs no grupo com alta carga viral correlaciona diretamente com os níveis do RNA viral determinado por RT-qPCR (Figura 21).

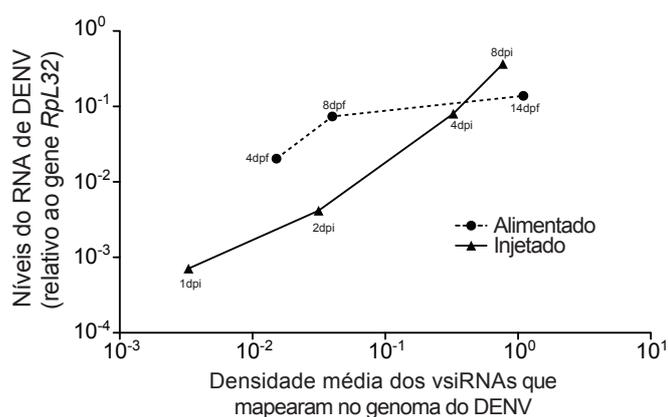


Figura 21 – Correlação do sinal de RT-qPCR pela densidade média dos vsRNAs de DENV. A figura mostra a relação entre a carga viral detectada pela densidade dos vsRNAs detectados para o DENV-4 nas bibliotecas de mosquitos BR alimentados ou injetados com o DENV-4. Cada ponto representa a média do sinal de RT-qPCR detectado no grupo de mosquitos sequenciados.

A profundidade de sequenciamento influencia diretamente na detecção de sequências raras numa amostra (revisado por Sims, Sudbery et al. 2014). Para verificarmos a influência desta variável na detecção de sequências do DENV, nós sequenciamos mosquitos individuais que foram infectados por microinjeção com 160 pfu de DENV-4, anteriormente mostrados na Figura 11. Esses mosquitos apresentam baixas

cargas virais relativas nos tempos iniciais após a microinjeção (1 dpi – entre 10^{-4} e 10^{-3} , 2 dpi – entre 10^{-3} e 10^{-2}), que são similares às cargas virais observadas nos mosquitos alimentados que possuem baixa carga viral (entre 10^{-5} e 10^{-3} – comparar Figura 12 e Figura 11). Para mostrar o acúmulo de sequências virais em cada biblioteca nós utilizamos o método estatístico A-C, que baseado na distribuição de Poisson calcula a probabilidade de duas contagens digitais num conjunto particular de sequências vir de populações similares (Tino 2009). Na cinética de infecção nos mosquitos injetados com o vírus (Figura 22) observamos a partir do 2° dpi o acúmulo significativo nas sequências de 21 nt de origem viral quando comparados aos grupos alimentados que possuem baixa carga viral ou carga não detectada com 4 dpi (maior valor de $p = 0,0023$). O acúmulo significativo de sequências virais já com 2 dpi nos sugere que a profundidade do sequenciamento não é um fator limitante em nossas análises.

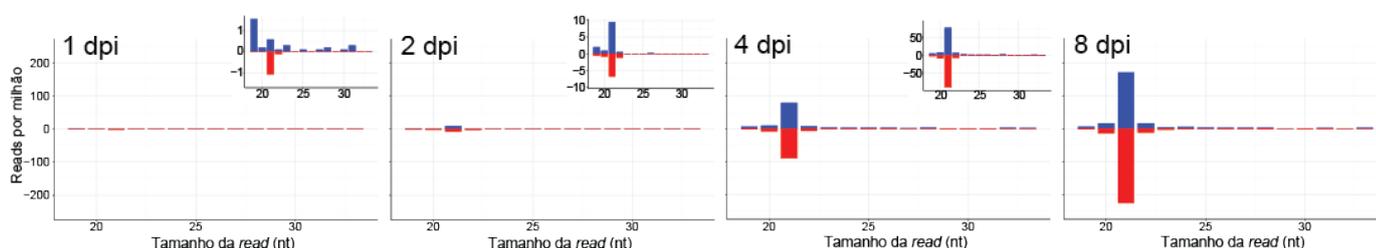


Figura 22 – Distribuição de tamanho das sequências de pequenos RNAs derivadas do DENV em mosquitos injetados. As barras representam a frequência relativa da contagem de sequências mapeadas no genoma do DENV-4. Em azul as sequências mapeadas no senso positivo, e em vermelho no senso negativo. Mosquitos BR foram infectados com 160 pfu de DENV-4 por microinjeção. As sequências foram mapeadas utilizando o software Bowtie, permitindo-se 1 base discordante por sequência. Cada painel representa o sequenciamento do RNA de um mosquito individual. Os painéis menores são um aumento em escala dos painéis adjacentes. As setas indicam as sequências de 21 nt, produto canônico da via de siRNA.

Os mosquitos alimentados com sangue contaminado com DENV mas que mostram baixa carga viral poderiam estar contendo um baixo nível de infecção no intestino que é detectada mas sem aumento durante toda a cinética de infecção. Entretanto, o perfil de distribuição dos pequenos RNAs mostra que há degradação

aleatória do RNA viral nos grupos de mosquitos com baixa carga viral ou carga viral não detectada (veja Figura 20 e Tabela 6), sugerindo que o vírus está presente nestas amostras, porém não é processado pela maquinaria de siRNAs do intestino do mosquito. A ausência do processamento pode ser explicada pela não ativação da via de vsiRNAs no intestino ou pelo fato do vírus não estar replicando e formando dsRNA ativamente que é necessário para a produção de vsiRNAs. Nós favorecemos esta última hipótese devido a correlação entre níveis do RNA viral e formação de siRNAs nos outros grupos.

A infecção em mosquitos através de um repasto sanguíneo acontece primeiramente no intestino, difundindo-se posteriormente para outros tecidos (Salazar, Richardson et al. 2007). As barreiras de infecção e escape do intestino são cruciais neste processo para evitar a disseminação do vírus para outros tecidos (Bennett, Olson et al. 2002, Black, Bennett et al. 2002). Os nossos dados mostram somente ativação da via de siRNAs nos mosquitos com alta carga viral onde provavelmente há disseminação da infecção. Nossas análises dos mosquitos microinjetados mostram que, quando o vírus é injetado sistemicamente, a via de siRNAs parece ser ativada mais rapidamente que durante a infecção por via oral. Recentemente, Carissimo, Pondeville et al. (2015) sugeriram que, no mosquito *Anopheles gambiae*, a resposta imune antiviral ao *O'nyong'nyong* vírus (ONNV) é compartimentalizada. Os autores sugerem que no 3° dia após a infecção oral, quando o vírus está restrito ao intestino, a via de vsiRNAs não exerce influência na replicação viral neste órgão. Estes dados corroboram nossa hipótese de que a via de vsiRNAs não é o principal mecanismo de controle para o estabelecimento da barreira de infecção do intestino.

Além da via dos vsiRNAs, outra via de RNAi, a via de piRNAs, também parece ser ativada durante a infecção viral no mosquito *Ae. aegypti* (Morazzani, Wiley et al. 2012, Vodovar, Bronkhorst et al. 2012, Aguiar, Olmo et al. 2015). O funcionamento desta via independe de Dcr-2 e AGO2, e os pequenos RNAs produto do seu processamento catalítico possuem de 24 a 29 nt em tamanho. Hess, Prasad et al. (2011) estudaram o repertório de pequenos RNAs em mosquitos *Ae. aegypti* expostos ao DENV-2, e segundo

suas análises, disseram ter encontrado pequenos RNAs possivelmente produtos da via de piRNAs, sugerindo um papel antiviral desta via durante a infecção pelo DENV neste organismo. Outros trabalhos mostraram a geração de sequências de 24-29 nt contra o CHIKV, o *Semliki Forest virus*, o *Phasi-Charoen Like virus* (PCLV) e também contra o SINV em linhagens de células ou no mosquito *Ae. aegypti* (Morazzani, Wiley et al. 2012, Vodovar, Bronkhorst et al. 2012, Schnettler, Donald et al. 2013, Aguiar, Olmo et al. 2015, Miesen, Girardi et al. 2015), porém o papel antiviral da via de piRNAs não foi completamente elucidado. Em nossas análises não observamos o enriquecimento de pequenos RNAs com tamanho ou características compatíveis com a produção de piRNAs em mosquitos infectados com o DENV-4 ou DENV-1 (Figura 20 e Figura 22 e dados não mostrados). Nós também reanalisamos os dados publicados anteriormente por Hess (2011) e, em contraste com o reportado pelo grupo, nós não observamos presença de piRNAs. Assim, a ausência de piRNAs sugere que esta via parece não ser ativada durante a infecção de mosquitos *Ae. aegypti* pelo DENV.

4.5. Análise da resposta transcricional do mosquito *Ae. aegypti* à infecção pelo DENV no intestino

Como a via de vsRNAs parece não afetar a prevalência da infecção dos mosquitos *Ae. aegypti* pelo DENV, outras vias devem ser importantes para estabelecer a barreira de infecção do intestino. Os mosquitos que apresentam alta carga viral 4 dias após a alimentação comparados ao grupo onde o vírus não foi detectado, possivelmente representam variações naturais na população que separam indivíduos resistentes ou susceptíveis a infecção. Em suporte a esta hipótese, o percentual de mosquitos em cada grupo é dependente do vírus e da população de mosquitos. Assim, para caracterizar vias potencialmente envolvidas na barreira de infecção, nós geramos o transcriptoma dos mosquitos com alta carga viral e comparamos com o grupo onde o vírus não foi detectado. As bibliotecas de transcriptoma foram construídas a partir do RNA de *pools* de

mosquitos inteiros ou intestinos no 4° dia após a alimentação, dos grupos onde o vírus não foi detectado e com alta carga viral de DENV-4. Os *pools* de mosquitos foram sequenciados em duas réplicas biológicas enquanto os *pools* de intestinos foram sequenciados a partir de amostras de um único experimento. Nossa estratégia foi traçada com o intuito de analisar o início da infecção pelo DENV, e identificar de forma abrangente os possíveis processos/vias envolvidas com a susceptibilidade ou resistência à infecção por este vírus no mosquito *Ae. aegypti*.

Nossas bibliotecas de transcriptoma foram sequenciadas na plataforma Illumina® e os resultados estão resumidos na Tabela 7. Para a detecção dos transcritos do mosquito *Ae. aegypti* nós utilizamos o genoma de referência disponível no banco de dados Vectorbase.org, em sua versão AaegL3.3. A abundância dos mRNAs em cada biblioteca foi estimada com base no número de sequências mapeadas em cada gene de referência utilizando o *pipeline* TopHat (Trapnell, Pachter et al. 2009, Kim, Pertea et al. 2013) e Cufflinks (Trapnell, Roberts et al. 2012), permitindo-se até 3 bases discordantes a cada sequência mapeada.

Tabela 7 – Resumo das bibliotecas de transcriptoma.

Condição		# indivíduos	# total de sequências	# mapeado AaegL3**
mosquitos BR* (réplica biológica 1)	Alta carga viral	12	39.438.184	33.512.605
	Não detectado	3	103.301.542	88.840.176
mosquitos BR* (réplica biológica 2)	Alta carga viral	6	77.253.090	59.869.346
	Não detectado	4	74.407.148	60.305.074
Intestinos*	Alta carga viral	6	56.572.694	42.197.467
	Não detectado	4	44.344.230	33.803.290

* Amostras de mosquitos alimentados com DENV-4 e coletados com 4 dpf.

** Os mapeamentos foram feitos permitindo-se 3 nucleotídeos discordantes por sequência.

A análise em larga escala da expressão gênica através de RNA-seq é uma poderosa ferramenta para se responder uma pergunta biológica dado sua amplitude e

abrangência. Entretanto, ainda há grande dificuldade de se extrair respostas de maneira clara e coerente a partir destes dados (Goeman and Buhlmann 2007). Uma abordagem de análise baseia-se na caracterização individual dos genes que apresentam maior diferença de expressão entre amostras, entretanto esta metodologia é redutivista e não permite a avaliação abrangente das alterações nos padrões de expressão gênica em decorrência da pergunta biológica proposta. Somado a isso, pequenas mudanças interligadas na expressão de genes de uma mesma via podem resultar em grandes efeitos biológicos, o que não seria detectado pela análise de genes únicos. Assim, em nosso trabalho nós optamos por utilizar a análise global de enriquecimento de vias com a ferramenta GSEA – *Gene Set Enrichment Analysis* (Subramanian, Tamayo et al. 2005). Esta ferramenta compara a expressão de genes entre duas condições, gerando uma lista com o ranking dos principais genes modificados em cada condição. Conjuntos de genes associados com diferentes vias são comparados dentro deste ranking, analisando se há enriquecimento destes em uma ou outra condição. Para obtenção dos conjuntos de genes a serem utilizados, nós optamos por utilizar a referência de *Drosophila melanogaster* (versão de abril de 2015) realizando a conversão dos GeneIDs de *Ae. aegypti* utilizando o ortólogo direto com maior similaridade entre estes organismos.

Através da análise de enriquecimento de conjuntos de genes, mostrado na **Figura 23**, podemos observar processos biológicos que parecem ser afetados nos grupos de mosquitos e intestinos com alta carga viral comparados aos com carga viral não detectada. No gráfico, a significância do enriquecimento de cada processo é dada como uma função logarítmica inversa, sendo o tamanho da barra diretamente relacionado à significância do processo. Além da comparação entre os mosquitos infectados aos com carga viral não detectada, nós também podemos compartimentalizar os processos enriquecidos nos dois grupos. Ao analisamos os dados, nós consideramos que processos enriquecidos no intestino que também são enriquecidos no mosquito inteiro sugerem o órgão é a fonte do enriquecimento. Já os processos enriquecidos no mosquito inteiro mas não no intestino, devem representar uma resposta sistêmica que não está presente no

intestino. Interessantemente, os processos de fosforilação oxidativa e metabolismo de ATP estão modulados nos intestinos não infectados de maneira similar aos mosquitos e intestinos infectados sugerindo que não estão relacionados à infecção diretamente.

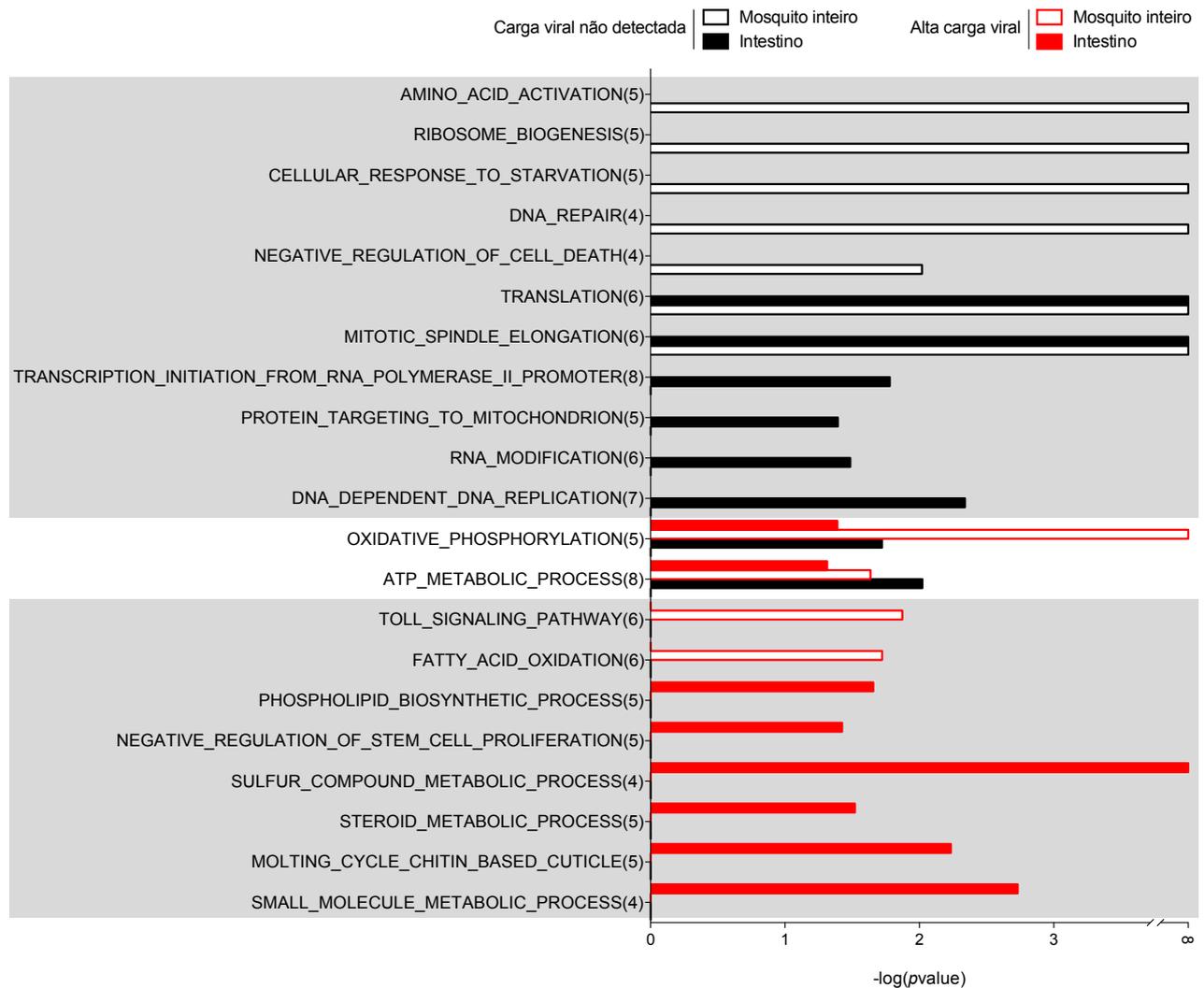


Figura 23 – Vias ou processos biológicos modulados durante a infecção pelo DENV-4 em mosquitos *Ae. aegypti*. As barras mostram o enriquecimento de cada via/processo metabólico no transcriptoma de mosquitos ou intestinos infectados com DENV-4. Os mosquitos foram alimentados com 25,000 pfu de DENV-4 e coletados após 4 dpf. A significância de cada processo é dada como uma função logarítmica inversa, sendo o tamanho da barra diretamente relacionado à significância do processo.

Nossos dados mostram que mosquitos susceptíveis à infecção pelo DENV com altas cargas virais apresentam sistemicamente o enriquecimento de processos biológicos envolvidos com catabolismo de lipídeos e ativação da via Toll de imunidade inata (**Figura 23** – barras vermelhas vazadas). A resposta nos intestinos referentes ao grupo com alta carga viral (**Figura 23** – barras vermelhas cheias) mostra enriquecimento de processos relacionados com a biossíntese de lipídeos, síntese de moléculas orgânicas precursoras, metabolismo de quitina e regulação negativa da proliferação celular. Juntos estes resultados sugerem que o intestino destes mosquitos está metabolicamente ativo mas sem proliferação celular, enquanto sistemicamente, estes mosquitos ativaram a via de Toll da imunidade inata e aumentaram o catabolismo de lipídeos talvez para suprir energia necessária à reposta imune e à demanda metabólica do intestino. A replicação do DENV e outros vírus é altamente dependente de lipídeos celulares incluindo as etapas de formação do envelope viral, a fusão com a membrana celular para entrada da partícula na célula e o remodelamento da membranas para formação das fábricas virais dentro da célula infectada (revisado por Heaton and Randall 2010, Stapleford and Miller 2010, Lorizate and Krausslich 2011). Interessantemente, genes envolvidos na produção de fosfatidilcolina em *D. melanogaster* são cruciais para a replicação do *Flock House virus* (Castorena, Stapleford et al. 2010). Além disto, os vírus requerem que o metabolismo celular provenha energia e os blocos de construção necessários para sua replicação. Assim, nossos dados sugerem que a mobilização coordenada da produção de energia e o metabolismo de lipídeos favorecem a replicação do DENV no intestino. Já sistemicamente, os mosquitos que possuem alta carga viral mostram enriquecimento para a via de sinalização pela via Toll cujo papel antiviral já foi mostrado por outros grupos (Xi, Ramirez et al. 2008, Ramirez and Dimopoulos 2010). Isto sugere que a ativação da via de Toll acontece sistemicamente após a infecção disseminar do intestino, não estando esta via ativada no intestino infectado.

Os grupos de mosquitos negativos para a detecção do vírus (**Figura 23** – barras pretas vazadas) mostram um perfil diferente de processos biológicos sugerindo que

sistemicamente há ativação de aminoácidos, biogênese de ribossomos, regulação negativa da morte celular e resposta ao estresse de privação de nutrientes. Estes processos podem estar relacionados à resistência à infecção uma vez que os vírus de RNA são sensíveis a modificação nos processos de tradução e a privação de nutrientes (Eaton, Scala et al. 1964, Kinney, Huang et al. 2005, Xu, Hopkins et al. 2013, Fontaine, Sanchez et al. 2015). Entretanto, é difícil argumentar neste momento que esta resposta sistêmica está associada ao controle ou eliminação da infecção pelo DENV uma vez que a infecção neste mosquito não parece nem se estabelecer no intestino. Já nos intestinos dos mosquitos do mesmo grupo, podemos observar enriquecimento dos processos de endereçamento de proteínas à mitocôndria, tradução e transcrição associados a indicadores de divisão celular como a replicação do DNA e formação de fusos mitóticos. Assim, nossos resultados sugerem que os intestinos sem carga viral detectada apresentam multiplicação celular ativa, em contraste a regulação negativa do ciclo celular observada nos intestinos dos mosquitos infectados. Na literatura há diversos relatos da modulação do ciclo celular em diferentes estágios da replicação celular tanto por vírus de DNA quanto RNA (Hecker 1977, He, Xu et al. 2010, Jiang, Wang et al. 2013). Nossos resultados sugerem que a multiplicação celular, provavelmente ligada a renovação do epitélio e manutenção da integridade do intestino são associadas à resistência a infecção pelo DENV. A descoberta de fatores do hospedeiro durante a infecção viral no mosquito pode ajudar na identificação de mecanismos antivirais ou dar pistas sobre o ciclo de vida do DENV. Estes são pontos importantes que podem ajudar no desenvolvimento de estratégias para controle do DENV em mosquitos *Ae. aegypti* para que possamos explorá-las no combate à Dengue.

4.6. Modelo da infecção viral pelo DENV no mosquito *Ae. aegypti*

Com relação ao nosso modelo de infecção de mosquitos em laboratório, nossos resultados confirmam observações de outros laboratórios que mostram a barreira do intestino como o principal determinante do sucesso da infecção pelo DENV (Bennett, Olson et al. 2002, Black, Bennett et al. 2002, Schneider, Mori et al. 2007). Nossos resultados também mostram que a barreira do intestino é dependente do genótipo viral e da genética da população de mosquitos de acordo com dados de outros grupos (Lambrechts, Chevillon et al. 2009, Fansiri, Fontaine et al. 2013, Dickson, Sanchez-Vargas et al. 2014, Franz, Sanchez-Vargas et al. 2014). Nós observamos que a grande maioria dos intestinos apresentava poucos ou apenas um foco de infecção sugerindo que ela é iniciada por um ou poucos clones virais. Além disto, o tamanho do foco no epitélio intestinal é similar entre mosquitos diferentes e em um mesmo mosquito sugerindo que a janela para a infecção ocorre apenas em um período curto após o repasto sanguíneo que coincide temporalmente com a formação da matriz peritrófica que não permitiria a passagem de vírus (Edwards and Jacobs-Lorena 2000).

Nosso modelo de infecção permitiu caracterizar dentro de uma mesma população heterogênea de mosquitos indivíduos que são susceptíveis (que se infectam) ou resistentes (não se infectam) ao DENV, nas mesmas condições de repasto sanguíneo. O percentual de indivíduos em cada categoria de crescimento viral é dependente da população e não é alterado pelo aumento da dose viral, sugerindo que a resistência não é um fator aleatório. Com este modelo, nosso objetivo foi explorar as diferenças observadas entre indivíduos nos grupos infectados e não infectados para nos fornecer informações sobre o mecanismo de resistência natural à infecção. Nossas análises em larga escala da resposta dos mosquitos nos diferentes grupos mostraram que há ativação diferencial de vias biológicas tanto nos intestinos quanto sistemicamente quando comparamos indivíduos que não se infectaram frente aos infectados. No intestino,

mosquitos não infectados mostram regulação positiva de vias relacionadas à replicação celular enquanto os infectados são enriquecidos para genes relacionados à vias de metabolismo energético (Figura 24). No contexto da infecção, estas observações sugerem que os intestinos susceptíveis estão metabolicamente ativos mas suas células não estão se dividindo, enquanto os intestinos resistentes parecem estar em renovação através da divisão celular. Sistemicamente, os mosquitos infectados mostram resposta antiviral mediada por Toll e produção de siRNAs enquanto os mosquitos não infectados apresentam um resposta ao estresse de deprivação de nutrientes (Figura 24). Nos mosquitos infectados, a ativação das vias antivirais de Toll e siRNAs estão relacionadas ao controle da infecção após a disseminação conforme demonstrado por nós e outros grupos (Xi, Ramirez et al. 2008, Ramirez and Dimopoulos 2010, Hess, Prasad et al. 2011). É importante destacar que, nos mosquitos não infectados, as vias de Toll e siRNA não parecem estar relacionadas à barreira de infecção do intestino e não são ativadas sistemicamente pois não há disseminação da infecção. Ainda nos mosquitos não infectados, a resposta ao estresse ativada por deprivação de nutrientes observada sistemicamente poderia ser uma resposta à infecção mas seu mecanismo ainda não está claro.

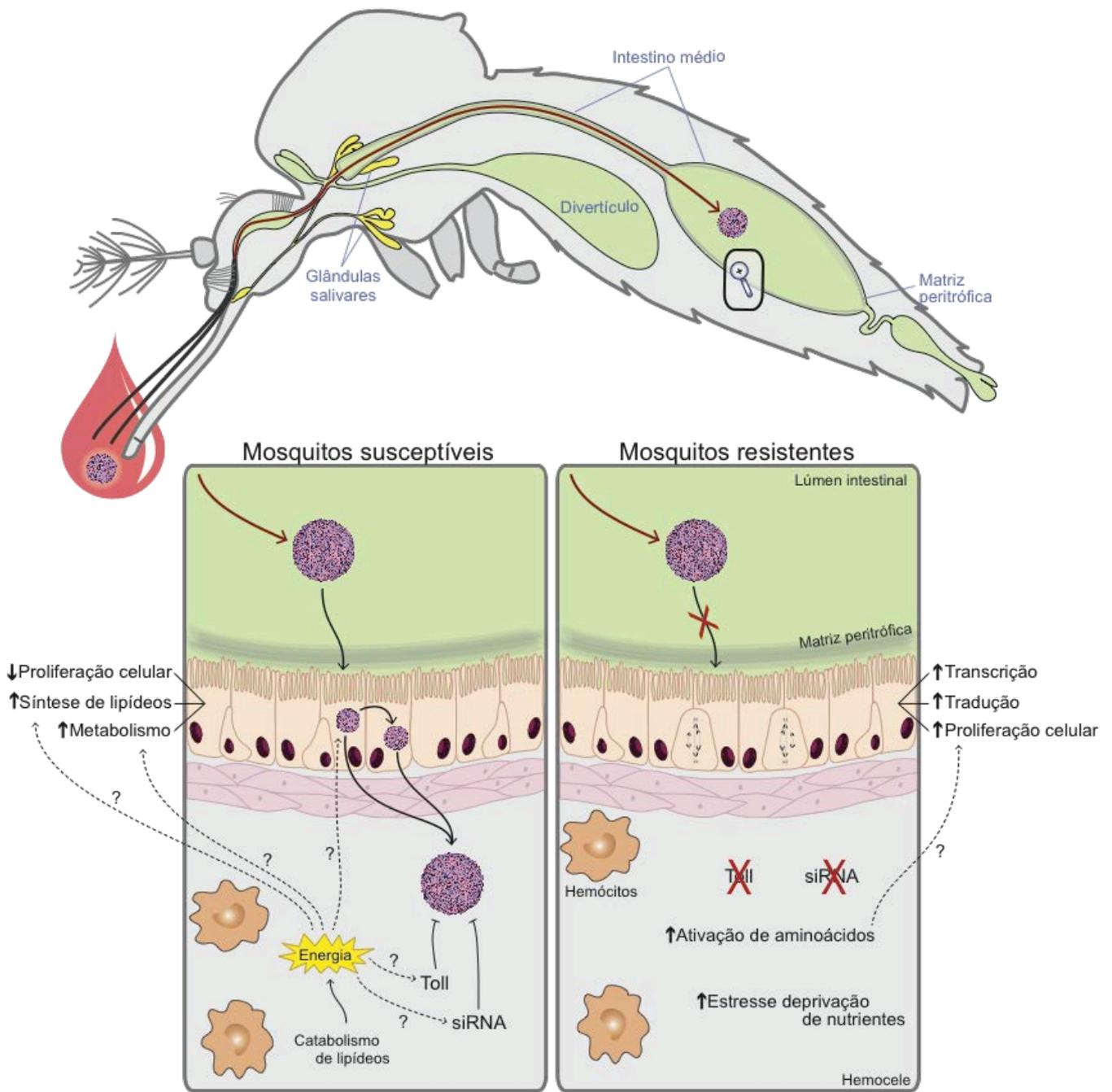


Figura 24 – Modelo da resposta à infecção pelo DENV no mosquito *Ae. aegypti*. Após o respatto sanguíneo num indivíduo infectado, o vírus entra em contato com o epitélio do intestino no mosquito. Qualquer interferência na infecção do intestino, ou na disseminação para tecidos adjacentes é considerado barreira de infecção e disseminação do intestino, respectivamente. Os processos biológicos compartimentalizados relacionados aos mosquitos que naturalmente se infectam ou não, estão indicados. As setas representam o possível fenótipo decorrente das alterações biológicas características de cada grupo de mosquitos.

Um ponto interessante a se discutir é a aparente ausência de ativação da via de siRNAs em mosquitos onde não há disseminação da infecção. Principalmente nos mosquitos com baixa carga viral, não está claro se siRNAs não chegam a ser produzidos ou se não foram detectados em nosso sequenciamento. O fato de termos detectado siRNAs mesmo em baixas concentrações quando o vírus é injetado sistemicamente sugere que não é um problema de detecção. Apesar de estudos anteriores terem mostrados que a pré-ativação da via é capaz de impedir o estabelecimento da infecção pelo DENV (Franz, Sanchez-Vargas et al. 2006, Franz, Sanchez-Vargas et al. 2014), o silenciamento de AGO2 no intestino corroborou os resultados obtidos para o SINV (Khoo, Doty et al. 2013), que ao expressar um inibidor da via no intestino não afetou a prevalência de mosquitos infectados, o que sugere a via de exógena de siRNA não ser necessária/suficiente para estabelecer a barreira de infecção do intestino. Assim, a grande questão é porque a via de siRNAs não seria ativada pela infecção no intestino. Uma explicação pode estar na especificidade da tradução das células do epitélio intestinal, que apresentam retículos endoplasmáticos rugosos compactados em formato de espiral e inativos até o momento da alimentação, onde distendem e desenovelam, ativando a tradução (Bertram and Bird 1961). Após a entrada do DENV nas células é necessária a tradução das proteínas virais, que formarão as ultraestruturas virais de replicação viral na superfície do retículo endoplasmático (Junjhon, Pennington et al. 2014), e marcarão o início da replicação do genoma viral. A formação destas fábricas de forma deficiente, ou a demora na tradução das proteínas virais pode interromper o ciclo de replicação do vírus, dado o reenovelamento do retículo após a digestão, o que deixaria o vírus latente e longe do reconhecimento da maquinaria de RNAi. Esta hipótese é suportada pela detecção de sequências de origem viral com tamanhos compatíveis com a degradação aleatória nos mosquitos com baixa carga viral ou carga viral não detectada ao longo dos tempos testados, sugerindo que o vírus está presente nestas amostras.

Nossos resultados mostram grande variabilidade na resposta e susceptibilidade à infecção pelo DENV em uma mesma população de mosquitos. A proporção de mosquitos resistentes a infecção é característica específica de cada população sugerindo a influência de fatores genéticos do vetor. Os genes ou vias cuja expressão são consistentemente correlacionadas com o fenótipo de resistência à infecção, têm potencial como biomarcadores da competência vetorial. Este controle em populações de campo permitiria a melhor implementação de estratégias de combate à transmissão de DENV pelo mosquito vetor. Além disso, o entendimento detalhado dos processos de resistência à infecção podem proporcionar oportunidades para desenho de estratégias de intervenção destinadas a reduzir a transmissão do DENV pelo mosquito *Ae. aegypti*.

Conclusões

5. Conclusões

1 – Fatores genéticos da população de mosquitos e do vírus são determinantes para o sucesso da infecção do intestino;

2 – A barreira de infecção do intestino não é dependente da via de siRNAs;

3 – A ativação da via de RNAi medida pela produção de siRNAs em mosquitos correlaciona com infecção ativa pelo DENV;

4 – Há ativação sistêmica da via Toll em mosquitos somente após a infecção do intestino e disseminação do DENV;

5 – A resistência ou susceptibilidade à infecção pelo DENV em diferentes indivíduos de uma população de mosquitos correlaciona com perfis transcricionais no intestino relacionados à divisão celular ou metabolismo ativo, respectivamente.

6. Perspectivas

Validar funcionalmente a participação das vias biológicas identificadas na resistência e susceptibilidade à infecção de mosquitos pelo DENV utilizando a técnica de silenciamento gênico ou inibição química.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

Adelman, Z. N., M. a. E. Anderson, M. Liu, L. Zhang and K. M. Myles (2012). "Sindbis virus induces the production of a novel class of endogenous siRNAs in *Aedes aegypti* mosquitoes." Insect molecular biology **21**: 357-368.

Agaisse, H. and N. Perrimon (2004). "The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses." Immunol Rev **198**: 72-82.

Aguiar, E. R., R. P. Olmo, S. Paro, F. V. Ferreira, I. J. de Faria, Y. M. Tadjro, F. P. Lobo, E. G. Kroon, C. Meignin, D. Gatherer, J. L. Imler and J. T. Marques (2015). "Sequence-independent characterization of viruses based on the pattern of viral small RNAs produced by the host." Nucleic Acids Res.

Allison, S. L., J. Schalich, K. Stiasny, C. W. Mandl, C. Kunz and F. X. Heinz (1995). "Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH." J Virol **69**(2): 695-700.

Anderson, J. R. and R. Rico-Hesse (2006). "*Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus." Am J Trop Med Hyg **75**(5): 886-892.

Beerntsen, B. T., A. A. James and B. M. Christensen (2000). "Genetics of mosquito vector competence." Microbiol Mol Biol Rev **64**(1): 115-137.

Bennett, K. E., B. J. Beaty and W. C. t. Black (2005). "Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape." J Med Entomol **42**(2): 110-119.

Bennett, K. E., K. E. Olson, L. Munoz Mde, I. Fernandez-Salas, J. A. Farfan-Ale, S. Higgs, W. C. t. Black and B. J. Beaty (2002). "Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States." Am J Trop Med Hyg **67**(1): 85-92.

Bertram, D. S. and R. G. Bird (1961). "Studies on mosquito-borne viruses in their vectors. I. The normal fine structure of the midgut epithelium of the adult female *Aedes aegypti* (L.) and the functional significance of its modification following a blood meal." Trans R Soc Trop Med Hyg **55**: 404-423.

Bhatt, S., P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, M. F. Myers, D. B. George, T. Jaenisch, G. R. Wint, C. P. Simmons, T. W. Scott, J. J. Farrar and S. I. Hay (2013). "The global distribution and burden of dengue." Nature **496**(7446): 504-507.

Black, W. C. and D. W. Severson (2005). Genetics of Vector Competence. Biology of Disease Vectors. W. H. Marquardt. London, Elsevier Academic Press.

Black, W. C. t., K. E. Bennett, N. Gorrochotegui-Escalante, C. V. Barillas-Mury, I. Fernandez-Salas, M. de Lourdes Munoz, J. A. Farfan-Ale, K. E. Olson and B. J. Beaty (2002). "Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*." Arch Med Res **33**(4): 379-388.

Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel (2014). "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." Bioinformatics **30**(15): 2114-2120.

Bosio, C. F., R. E. Fulton, M. L. Salasek, B. J. Beaty and W. C. t. Black (2000). "Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*." Genetics **156**(2): 687-698.

Braga, I. A. and D. Valle (2007). "*Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil." Epidemiologia e Serviços de Saúde **16**: 113-118.

Buchon, N., N. A. Broderick, M. Poidevin, S. Pradervand and B. Lemaitre (2009). "Drosophila intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation." Cell Host Microbe **5**(2): 200-211.

Burke, D. and T. Monath (2001). Flaviviruses. Fields virology. D. Knipe and P. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **1-2**: 1043–1125.

Campbell, C. L., K. M. Keene, D. E. Brackney, K. E. Olson, C. D. Blair, J. Wilusz and B. D. Foy (2008). "*Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection." BMC Microbiol **8**: 47.

Carissimo, G., E. Pondeville, M. McFarlane, I. Dietrich, C. Mitri, E. Bischoff, C. Antoniewski, C. Bourgouin, A. B. Failloux, A. Kohl and K. D. Vernick (2015). "Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(2): E176-185.

Castorena, K. M., K. A. Stapleford and D. J. Miller (2010). "Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured *Drosophila* cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication." BMC Genomics **11**: 183.

Chan, M. and M. A. Johansson (2012). "The incubation periods of Dengue viruses." PloS one **7**(11): e50972.

Christofferson, R. C. and C. N. Mores (2011). "Estimating the magnitude and direction of altered arbovirus transmission due to viral phenotype." PloS one **6**(1): e16298.

Christophers, S. R. (1960). *Aedes Aegypti* (L.) The Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure. London, Cambridge University Press.

Cirimotich, C. M., J. C. Scott, A. T. Phillips, B. J. Geiss and K. E. Olson (2009). "Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes." BMC Microbiol **9**: 49.

- Consoli, R. A. G. B. and R. Lourenço-de-Oliveira (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ.
- Das, S., L. Garver, J. R. Ramirez, Z. Xi and G. Dimopoulos (2007). "Protocol for dengue infections in mosquitoes (*A. aegypti*) and infection phenotype determination." J Vis Exp(5): 220.
- de Faria, I. J. D. S., R. P. Olmo, E. G. Silva and J. T. Marques (2013). "dsRNA Sensing During Viral Infection: Lessons from Plants, Worms, Insects, and Mammals." Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research **33**: 239-253.
- De Gregorio, E., P. T. Spellman, P. Tzou, G. M. Rubin and B. Lemaitre (2002). "The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*." The EMBO journal **21**: 2568-2579.
- Despres, P., M. P. Frenkiel and V. Deubel (1993). "Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure." Virology **196**(1): 209-219.
- Dickson, L. B., I. Sanchez-Vargas, M. Sylla, K. Fleming and W. C. t. Black (2014). "Vector competence in West African *Aedes aegypti* Is Flavivirus species and genotype dependent." PLoS Negl Trop Dis **8**(10): e3153.
- Ding, S.-W. (2010). "RNA-based antiviral immunity." Nature reviews. Immunology **10**: 632-644.
- Doi, R. (1970). "Studies on the mode of development of Japanese encephalitis virus in some groups of mosquitoes by the fluorescent antibody technique." Jpn J Exp Med **40**(2): 101-115.
- Dostert, C., E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J. a. Hoffmann and J.-L. Imler (2005). "The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *drosophila*." Nature immunology **6**: 946-953.
- Downe, A. E. R., N. L. Goring and A. S. West (1963). "The Influence of Size and Source of Blood Meals on Rate of Digestion of Vertebrate Serum Proteins in Mosquitoes (Diptera: Culicidae)." Journal of the Kansas Entomological Society **36**(4): 200-206.
- Dulbecco, R. (1952). "Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus." Proc Natl Acad Sci U S A **38**(8): 747-752.
- Eaton, M. D., A. R. Scala and I. E. Low (1964). "Amino Acid Imbalance and Incomplete Viral Replication." Arch Gesamte Virusforsch **14**: 583-598.
- Edman, J. D. (1970). "Rate of Digestion of Three Human Blood Fractions in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." Annals of the Entomological Society of America **63**(6): 1778-1779.

- Edwards, M. J. and M. Jacobs-Lorena (2000). "Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae." J Insect Physiol **46**(9): 1313-1320.
- Fansiri, T., A. Fontaine, L. Diancourt, V. Caro, B. Thaisomboonsuk, J. H. Richardson, R. G. Jarman, A. Ponlawat and L. Lambrechts (2013). "Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses." PLoS Genet **9**(8): e1003621.
- Ferrandon, D., J. L. Imler, C. Hetru and J. A. Hoffmann (2007). "The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections." Nat Rev Immunol **7**(11): 862-874.
- Fontaine, K. A., E. L. Sanchez, R. Camarda and M. Lagunoff (2015). "Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication." J Virol **89**(4): 2358-2366.
- Franco, O. (1976). "História da febre-amarela no Brasil." Rio de Janeiro: Divisão de Cooperação: 208p.
- Franz, A. W., I. Sanchez-Vargas, R. R. Raban, W. C. t. Black, A. A. James and K. E. Olson (2014). "Fitness impact and stability of a transgene conferring resistance to dengue-2 virus following introgression into a genetically diverse *Aedes aegypti* strain." PLoS Negl Trop Dis **8**(5): e2833.
- Franz, A. W. E., I. Sanchez-Vargas, Z. N. Adelman, C. D. Blair, B. J. Beaty, A. a. James and K. E. Olson (2006). "Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**: 4198-4203.
- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet **10**(2): 94-108.
- Girard, Y. A., K. A. Klingler and S. Higgs (2004). "West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*." Vector Borne Zoonotic Dis **4**(2): 109-122.
- Goeman, J. J. and P. Buhlmann (2007). "Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues." Bioinformatics **23**(8): 980-987.
- Gubler, D. J. (1998). "Dengue and dengue hemorrhagic fever." Clin Microbiol Rev **11**(3): 480-496.
- Gubler, D. J. (2006). "Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status." Novartis Found Symp **277**: 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253.
- Gubler, D. J., S. Nalim, R. Tan, H. Saipan and J. Sulianti Saroso (1979). "Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*." Am J Trop Med Hyg **28**(6): 1045-1052.

- Gunther, J., J. P. Martinez-Munoz, D. G. Perez-Ishiwara and J. Salas-Benito (2007). "Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico." *Intervirology* **50**(5): 347-352.
- Guzman, A. and R. E. Isturiz (2010). "Update on the global spread of dengue." *Int J Antimicrob Agents* **36 Suppl 1**: S40-42.
- Halstead, S. B. (1979). "In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody." *J Infect Dis* **140**(4): 527-533.
- Hammon, W. M., A. Rudnick and G. E. Sather (1960). "Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand." *Science* **131**(3407): 1102-1103.
- Hanley, K. A., T. P. Monath, S. C. Weaver, S. L. Rossi, R. L. Richman and N. Vasilakis (2013). "Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus." *Infect Genet Evol.*
- Hardy, J. L., E. J. Houk, L. D. Kramer and W. C. Reeves (1983). "Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses." *Annu Rev Entomol* **28**: 229-262.
- He, Y., K. Xu, B. Keiner, J. Zhou, V. Czudai, T. Li, Z. Chen, J. Liu, H. D. Klenk, Y. L. Shu and B. Sun (2010). "Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G0/G1 phase." *J Virol* **84**(24): 12832-12840.
- Heaton, N. S. and G. Randall (2010). "Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism." *Cell Host Microbe* **8**(5): 422-432.
- Hecker, H. (1977). "Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (insecta, diptera)." *Cell Tissue Res* **184**(3): 321-341.
- Hess, A. M., A. N. Prasad, A. Ptitsyn, G. D. Ebel, K. E. Olson, C. Barbacioru, C. Monighetti and C. L. Campbell (2011). "Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense." *BMC microbiology* **11**: 45.
- Hill, C. a., F. C. Kafatos, S. K. Stansfield and F. H. Collins (2005). "Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era." *Nature reviews. Microbiology* **3**: 262-268.
- Holmes, E. C. and S. S. Twiddy (2003). "The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus." *Infect Genet Evol* **3**(1): 19-28.
- Hotta, S. (1952). "Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus." *J Infect Dis* **90**(1): 1-9.
- Houk, E. J., F. Obie and J. L. Hardy (1979). "Peritrophic membrane formation and the midgut barrier to arboviral infection in the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett (Insecta, Diptera)." *Acta Trop* **36**(1): 39-45.

Houng, H. H., D. Hritz and N. Kanesa-thasan (2000). "Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence." J Virol Methods **86**(1): 1-11.

Houng, H. S., R. Chung-Ming Chen, D. W. Vaughn and N. Kanesa-thasan (2001). "Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences." J Virol Methods **95**(1-2): 19-32.

Jiang, W., Q. Wang, S. Chen, S. Gao, L. Song, P. Liu and W. Huang (2013). "Influenza A virus NS1 induces G0/G1 cell cycle arrest by inhibiting the expression and activity of RhoA protein." J Virol **87**(6): 3039-3052.

Junjhon, J., J. G. Pennington, T. J. Edwards, R. Perera, J. Lanman and R. J. Kuhn (2014). "Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells." J Virol **88**(9): 4687-4697.

Kato, N., C. R. Mueller, J. F. Fuchs, K. McElroy, V. Wessely, S. Higgs and B. M. Christensen (2008). "Evaluation of the function of a type I peritrophic matrix as a physical barrier for midgut epithelium invasion by mosquito-borne pathogens in *Aedes aegypti*." Vector Borne Zoonotic Dis **8**(5): 701-712.

Khoo, C. C., J. B. Doty, M. S. Heersink, K. E. Olson and A. W. Franz (2013). "Transgene-mediated suppression of the RNA interference pathway in *Aedes aegypti* interferes with gene silencing and enhances Sindbis virus and dengue virus type 2 replication." Insect Mol Biol **22**(1): 104-114.

Khoo, C. C., J. Piper, I. Sanchez-Vargas, K. E. Olson and A. W. Franz (2010). "The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*." BMC Microbiol **10**: 130.

Kim, D., G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley and S. L. Salzberg (2013). "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions." Genome Biol **14**(4): R36.

Kinney, R. M., C. Y. Huang, B. C. Rose, A. D. Kroeker, T. W. Dreher, P. L. Iversen and D. A. Stein (2005). "Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers." J Virol **79**(8): 5116-5128.

Kramer, L. D. and G. D. Ebel (2003). "Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes." Adv Virus Res **60**: 187-232.

Kuberski, T. (1979). "Fluorescent antibody studies on the development of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol **16**(4): 343-349.

Lambrechts, L., C. Chevillon, R. G. Albright, B. Thaisomboonsuk, J. H. Richardson, R. G. Jarman and T. W. Scott (2009). "Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors." BMC Evol Biol **9**: 160.

Langmead, B. and S. L. Salzberg (2012). "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." Nat Methods **9**(4): 357-359.

Lehane, M. J., S. Aksoy and E. Levashina (2004). "Immune responses and parasite transmission in blood-feeding insects." Trends in parasitology **20**: 433-439.

Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2003). "Molecular biology of flaviviruses." Adv Virus Res **59**: 23-61.

Lindenbach, B. D., H.-J. Thiel and C. M. Rice (2001). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Fields virology. D. Knipe and P. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **1-2**: 1102–1154.

Lorizate, M. and H. G. Krausslich (2011). "Role of lipids in virus replication." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(10): a004820.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011 %9 next generation sequencing; small RNA; microRNA; adapter removal %! Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **17**.

Martinez, N. E., F. Dzul-Manzanilla, C. Gutierrez-Castro, J. Ibarra-Lopez, W. Bibiano-Marin, L. Lopez-Damian, A. Martini-Jaimes, H. Huerta, A. Che-Mendoza, G. Ayora-Talavera and P. Manrique-Saide (2014). "Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico." J Am Mosq Control Assoc **30**(2): 143-146.

McFarlane, M., C. Arias-Goeta, E. Martin, Z. O'Hara, A. Lulla, L. Mousson, S. M. Rainey, S. Misbah, E. Schnettler, C. L. Donald, A. Merits, A. Kohl and A. B. Failloux (2014). "Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication." PLoS Negl Trop Dis **8**(7): e2994.

Merkling, S. H. and R. P. van Rij (2013). "Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito." J Insect Physiol **59**(2): 159-170.

Miesen, P., E. Girardi and R. P. van Rij (2015). "Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in *Aedes aegypti* mosquito cells." Nucleic Acids Res.

Miller, B. R. and C. J. Mitchell (1991). "Genetic selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*." Am J Trop Med Hyg **45**(4): 399-407.

Molina-Cruz, A., L. Gupta, J. Richardson, K. Bennett, W. t. Black and C. Barillas-Mury (2005). "Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*." Am J Trop Med Hyg **72**(5): 631-637.

Morazzani, E. M., M. R. Wiley, M. G. Murreddu, Z. N. Adelman and K. M. Myles (2012). "Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma." PLoS pathogens **8**: e1002470.

Moreira, L. a., I. Iturbe-Ormaetxe, J. a. Jeffery, G. Lu, A. T. Pyke, L. M. Hedges, B. C. Rocha, S. Hall-Mendelin, A. Day, M. Riegler, L. E. Hugo, K. N. Johnson, B. H. Kay, E. a. McGraw, A. F. van den Hurk, P. a. Ryan and S. L. O'Neill (2009). "A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium." Cell **139**: 1268-1278.

Morens, D. M., S. B. Halstead, P. M. Repik, R. Putvatana and N. Raybourne (1985). "Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization." J Clin Microbiol **22**(2): 250-254.

Mueller, S., V. Gausson, N. Vodovar, S. Deddouche, L. Troxler, J. Perot, S. Pfeffer, J. A. Hoffmann, M.-C. Saleh and J.-L. Imler (2010). "RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**: 19390-19395.

Myles, K. M., M. R. Wiley, E. M. Morazzani and Z. N. Adelman (2008). "Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 19938-19943.

Nguyen, N. M., D. Thi Hue Kien, T. V. Tuan, N. T. H. Quyen, C. N. B. Tran, L. Vo Thi, D. L. Thi, H. L. Nguyen, J. J. Farrar, E. C. Holmes, M. a. Rabaa, J. E. Bryant, T. T. Nguyen, H. T. C. Nguyen, L. T. H. Nguyen, M. P. Pham, H. T. Nguyen, T. T. H. Luong, B. Wills, C. V. V. Nguyen, M. Wolbers and C. P. Simmons (2013). "Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 1-6.

Nobre, A., D. Antezana and P. Tauil (1994). "Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **27**(supl III): 59-66.

Nogueira, R. M., M. P. Miagostovich, A. M. de Filippis, M. A. Pereira and H. G. Schatzmayr (2001). "Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(7): 925-926.

Nogueira, R. M., S. M. Zagner, I. S. Martins, E. Lampe, M. P. Miagostovich and H. G. Schatzmayr (1991). "Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **86**(2): 269.

O'gower, A. K. (1956). "The Rate of Digestion of, Human Blood by Certain Species of Mosquitoes." Australian Journal of Biological Sciences **9**(1): 125-129.

Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M. C. Siomi (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." Genes Dev **18**(14): 1655-1666.

Osanaí, C. H., A. P. Travassos da Rosa, A. T. Tang, R. S. do Amaral, A. D. Passos and P. L. Tauil (1983). "[Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **25**(1): 53-54.

Pfeffer, S., M. Zavolan, F. A. Grasser, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, B. John, A. J. Enright, D. Marks, C. Sander and T. Tuschl (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." *Science* **304**(5671): 734-736.

Plaskon, N. E., Z. N. Adelman and K. M. Myles (2009). "Accurate strand-specific quantification of viral RNA." *PLoS One* **4**(10): e7468.

Prasad, A. N., D. E. Brackney and G. D. Ebel (2013). "The role of innate immunity in conditioning mosquito susceptibility to West Nile virus." *Viruses* **5**(12): 3142-3170.

R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.

Ramirez, J. L. and G. Dimopoulos (2010). "The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes." *Developmental and comparative immunology* **34**: 625-629.

Ramirez, J. L., J. Souza-Neto, R. Torres Cosme, J. Rovira, A. Ortiz, J. M. Pascale and G. Dimopoulos (2012). "Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(3): e1561.

Richardson, J., A. Molina-Cruz, M. I. Salazar and W. t. Black (2006). "Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg* **74**(1): 132-141.

Salazar, M. I., J. H. Richardson, I. Sánchez-Vargas, K. E. Olson and B. J. Beaty (2007). "Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes." *BMC microbiology* **7**: 9.

Sanchez-Vargas, I., J. C. Scott, B. K. Poole-Smith, A. W. Franz, V. Barbosa-Solomieu, J. Wilusz, K. E. Olson and C. D. Blair (2009). "Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway." *PLoS Pathog* **5**(2): e1000299.

Sánchez-Vargas, I., J. C. Scott, B. K. Poole-Smith, A. W. E. Franz, V. Barbosa-Solomieu, J. Wilusz, K. E. Olson and C. D. Blair (2009). "Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway." *PLoS pathogens* **5**: e1000299.

Schatzmayr, H. G., R. M. Nogueira and A. P. Travassos da Rosa (1986). "An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **81**(2): 245-246.

Schneider, J. R., a. Mori, J. Romero-Severson, D. D. Chadee and D. W. Severson (2007). "Investigations of dengue-2 susceptibility and body size among *Aedes aegypti* populations." *Medical and veterinary entomology* **21**: 370-376.

Schnettler, E., C. L. Donald, S. Human, M. Watson, R. W. Siu, M. McFarlane, J. K. Fazakerley, A. Kohl and R. Fragkoudis (2013). "Knockdown of piRNA pathway proteins

results in enhanced Semliki Forest virus production in mosquito cells." *J Gen Virol* **94**(Pt 7): 1680-1689.

Shepard, D. S., L. Coudeville, Y. A. Halasa, B. Zambrano and G. H. Dayan (2011). "Economic impact of dengue illness in the Americas." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **84**: 200-207.

Sims, D., I. Sudbery, N. E. Iltott, A. Heger and C. P. Ponting (2014). "Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses." *Nat Rev Genet* **15**(2): 121-132.

Smith, D. L., K. E. Battle, S. I. Hay, C. M. Barker, T. W. Scott and F. E. McKenzie (2012). "Ross, macdonald, and a theory for the dynamics and control of mosquito-transmitted pathogens." *PLoS Pathog* **8**(4): e1002588.

Smith, D. R., A. P. Adams, J. L. Kenney, E. Wang and S. C. Weaver (2008). "Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: infection initiated by a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck." *Virology* **372**(1): 176-186.

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

Stapleford, K. A. and D. J. Miller (2010). "Role of cellular lipids in positive-sense RNA virus replication complex assembly and function." *Viruses* **2**(5): 1055-1068.

Stephen, H. and S. Higgs (2004). How do mosquito vectors live with their viruses? microbe–vector interactions in vector-borne diseases, Cambridge University Press.

Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15545-15550.

Tino, P. (2009). "Basic properties and information theory of Audic-Claverie statistic for analyzing cDNA arrays." *BMC Bioinformatics* **10**: 310.

Trapnell, C., L. Pachter and S. L. Salzberg (2009). "TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq." *Bioinformatics* **25**(9): 1105-1111.

Trapnell, C., A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim, D. R. Kelley, H. Pimentel, S. L. Salzberg, J. L. Rinn and L. Pachter (2012). "Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks." *Nat Protoc* **7**(3): 562-578.

Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." *Nucleic Acids Res* **40**(15): e115.

Vikram, K., B. N. Nagpal, V. Pande, A. Srivastava, R. Saxena, H. Singh, Anushrita, S. K. Gupta, N. R. Tuli, N. K. Yadav, T. Olivier, P. Richard and N. Valecha (2015). "Detection of dengue virus in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Delhi, India." J Vector Borne Dis **52**(2): 129-133.

Vodovar, N., A. W. Bronkhorst, K. W. van Cleef, P. Miesen, H. Blanc, R. P. van Rij and M. C. Saleh (2012). "Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells." PLoS One **7**(1): e30861.

Wang, E., H. Ni, R. Xu, A. D. Barrett, S. J. Watowich, D. J. Gubler and S. C. Weaver (2000). "Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses." J Virol **74**(7): 3227-3234.

Wang, W. K., T. L. Sung, Y. C. Tsai, C. L. Kao, S. M. Chang and C. C. King (2002). "Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay." J Clin Microbiol **40**(12): 4472-4478.

Waterhouse, R. M., E. V. Kriventseva, S. Meister, Z. Xi, K. S. Alvarez, L. C. Bartholomay, C. Barillas-Mury, G. Bian, S. Blandin, B. M. Christensen, Y. Dong, H. Jiang, M. R. Kanost, A. C. Koutsos, E. a. Levashina, J. Li, P. Ligoxygakis, R. M. Maccallum, G. F. Mayhew, A. Mendes, K. Michel, M. a. Osta, S. Paskewitz, S. W. Shin, D. Vlachou, L. Wang, W. Wei, L. Zheng, Z. Zou, D. W. Severson, A. S. Raikhel, F. C. Kafatos, G. Dimopoulos, E. M. Zdobnov and G. K. Christophides (2007). "Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes." Science (New York, N.Y.) **316**: 1738-1743.

Watts, D. M., D. S. Burke, B. A. Harrison, R. E. Whitmire and A. Nisalak (1987). "Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus." Am J Trop Med Hyg **36**(1): 143-152.

Weaver, S. C., T. W. Scott, L. H. Lorenz, K. Lerdthusnee and W. S. Romoser (1988). "Togavirus-associated pathologic changes in the midgut of a natural mosquito vector." J Virol **62**(6): 2083-2090.

Whitehead, S. S., J. E. Blaney, A. P. Durbin and B. R. Murphy (2007). "Prospects for a dengue virus vaccine." Nat Rev Microbiol **5**(7): 518-528.

WHO, W. H. O. (1985). "Arthropod-borne and Rodent-borne Viral Diseases. World Health Organization." Technical Report Series No. 719.

WHO, W. H. O. (2009). "DENGUE Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control." WHO.

WHO, W. H. O. (2012, November). "Dengue and severe dengue (Fact Sheet N. 117)." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.

Wu, Q., Y. Luo, R. Lu, N. Lau, E. C. Lai, W.-X. Li and S.-W. Ding (2010). "Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**: 1606-1611.

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

Xu, J., K. Hopkins, L. Sabin, A. Yasunaga, H. Subramanian, I. Lamborn, B. Gordesky-Gold and S. Cherry (2013). "ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(37): 15025-15030.

Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen and T. L. Madden (2012). "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." BMC Bioinformatics **13**: 134.

8. Anexos

Outros trabalhos desenvolvidos em colaboração durante o período do doutorado:

1- Monitoramento da circulação do DENV entre mosquitos de campo e pacientes humanos – trabalho em preparação;

2- Caracterização de vírus em insetos vetores no campo através dos sequenciamento em larga escala de RNAs – Trabalho publicado;

Aguiar, E. R., **R. P. Olmo**, S. Paro, F. V. Ferreira, I. J. de Faria, Y. M. Todjro, F. P. Lobo, E. G. Kroon, C. Meignin, D. Gatherer, J. L. Imler and J. T. Marques (2015). "Sequence-independent characterization of viruses based on the pattern of viral small RNAs produced by the host." Nucleic Acids Res.

3- Comparação de vias de pequenos RNAs e genes das vias de RNAi em insetos vetores *Lutzomyia longipalpis* e *Aedes aegypti* e o organismo modelo *Drosophila melanogaster* – trabalho em preparação;

Revisões da literatura escritos durante o doutorado:

1- Reconhecimento de dsRNA durante a infecção viral;

de Faria, I. J. D. S., **R. P. Olmo**, E. G. Silva and J. T. Marques (2013). "dsRNA Sensing During Viral Infection: Lessons from Plants, Worms, Insects, and Mammals." Journal of interferon & cytokine research **33**: 239-253.

2- Uso de pequenos RNAs como biomarcadores;

P.P. Vilela, A., E. R.G.R. Aguiar, F. V. Ferreira, L. S. Ribeiro, **R. P. Olmo** and J. T. Marques (2012). "Small Non-Coding RNAs as Biomarkers." Recent Patents on Biomarkers **2**: 119-130.