

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Valdorion José da Cunha Klein Junior

**Fecundidade e fertilidade como parâmetros para quantificar  
a tolerância de *Aedes aegypti* ao vírus Dengue**

Florianópolis

2022

Valdorion José da Cunha Klein Junior

**Fecundidade e fertilidade como parâmetros para quantificar  
a tolerância de *Aedes aegypti* ao vírus Dengue**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Klein Junior, Valdorion José da Cunha  
Fecundidade e fertilidade como parâmetros para  
quantificar a tolerância de *Aedes aegypti* ao vírus dengue /  
Valdorion José da Cunha Klein Junior ; orientador, José  
Henrique Maia Campos Oliveira, 2022.  
36 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,  
2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Infecção viral. 3. Imunidade.  
4. Mosquitos vetores. 5. Arbovirus. I. Oliveira, José  
Henrique Maia Campos . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Valdorion José da Cunha Klein Junior

**Fecundidade e fertilidade como parâmetros para quantificar  
a tolerância de *Aedes aegypti* ao vírus Dengue**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de  
Licenciado em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de  
Ciências Biológicas

Florianópolis, 03 de março de 2022.

**Banca Examinadora:**

Prof. José Henrique Maia Campos de Oliveira, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Carlos Peres Silva, Dr.  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

Octávio Augusto Talyuli da Cunha, Me.  
Avaliador  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

## AGRADECIMENTOS

Aos mosquitos pelas vidas cedidas.

Ao meu orientador Zé por me receber no laboratório em 2019 e investir seu tempo, conhecimento, paciência, experiência e confiança em mim. Obrigado pelas discussões científicas que tivemos, por ter sido sempre crítico comigo e também por fazer parte do meu amadurecimento profissional. Você tem construído uma visão de ciência em mim da qual tenho orgulho. Um dia espero ser 1% do cientista que você é. Agradeço pelos conselhos, pela sua disposição em me ouvir e se mostrar aberto a conversar temáticas que vão além da ciência, sempre é um prazer e aprendizado conversar contigo independente do assunto.

Ao pessoal do “Lab Zé” por todas as discussões, trocas de conhecimento, por terem cedido tempo e ajuda nos experimentos e atividades no laboratório. Vocês também são parte desta monografia, sem o esforço de vocês eu não teria construído este trabalho! Mariana, você me acompanha desde meu início no laboratório, agradeço por nossa caminhada juntos, aprendo muito contigo! Obrigado também pelos “puxões de orelha” e pela enorme paciência que tu tens comigo, sei que é difícil algumas vezes! Você me deu conselhos e apoio independente da situação e dos momentos que vivi no ano de 2021. Além disso, sou agradecido por você ser uma colega de trabalho e minha amiga, pode contar sempre comigo!

Ao Laboratório de Imunobiologia (LIDI) por se mostrar aberto e reconhecer nosso pequeno grupo como pertencente ao LIDI também, pelo espaço, materiais e equipamentos concedidos. Agradeço aos doadores e doadoras que deram seu sangue para manutenção da colônia e experimentos. Também ao pessoal dos testes de COVID que trouxeram segurança e mais tranquilidade ao ambiente de trabalho. Obrigado LIDI pelas conversas científicas e as descontraídas, com certeza foram importantíssimas para minha formação profissional e tentar seguir firme.

À minha família por me ajudar a me manter em Florianópolis, pelo incentivo, preocupação, amor e afeto por mim. Sou grato e feliz por me verem como biólogo/cientista/professor e acreditarem nas minhas decisões.

Sem nomes, aos meus amigos e amigas que me deram suporte tantas vezes e ajudaram no processo de construção do TCC, mesmo que de forma indireta. Agradeço minha namorada Roberta pelo companheirismo e apoio imensurável! Você

foi incrível comigo o tempo todo. A elaboração do trabalho com certeza se tornou mais leve por você estar presente na minha vida.

À UFSC pelo espaço e as agências de fomento à pesquisa CNPq e Instituto Serrapilheira pelo financiamento.

## RESUMO

*Aedes aegypti* são mosquitos cosmopolitas e vetores de arbovírus que causam problemas de saúde pública com fortes efeitos sociais e econômicos a nível global. Investigações que facilitam a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação mosquito-vírus são interessantes, pois possibilitam bloquear a competência vetorial do mosquito, interferir na capacidade vetorial, e assim, impedir a transmissão de arboviroses. A resposta de tolerância é um tipo de defesa do organismo capaz de lidar, limitar e reparar os impactos negativos provocados pela infecção. Porém, ainda é pouco compreendido os mecanismos que fazem mosquitos vetores serem capazes de tolerar a infecção viral e qual a relação da mesma com aspectos reprodutivos. Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de tolerância viral de *Ae. aegypti* infectados com Dengue Sorotipo 4 caracterizando parâmetros reprodutivos do inseto. Foi avaliado o impacto da infecção na fecundidade (pela contagem de ovos) e fertilidade (pela eclosão dos ovos) em mosquitos infectados com uma cepa de laboratório e uma cepa clínica. Os resultados sugerem que não existe impacto nas fêmeas infectadas pela cepa de laboratório para a fecundidade e fertilidade. No entanto, foi observado impacto na fertilidade de fêmeas de *Ae. aegypti* quando infectadas pela dose máxima da cepa clínica, sugerindo que genótipos virais distintos podem influenciar a resposta de tolerância de mosquitos vetores.

**Palavras-chave:** Infecção Viral. Arbovírus. Mosquitos Vetores. Imunidade.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* are cosmopolitan mosquitoes and arbovirus vectors that causes public health problems with strong social and economic impacts globally. The understanding of the mechanisms involved in the mosquito-virus interaction are important, because it enables to block the vector competence of the mosquito, interfering with the vectorial capacity, thus, preventing the transmission of arboviruses. The tolerance response is a type of body defense capable of dealing, limiting and repairing the negative impacts caused by the infection. However, the mechanisms that make vector mosquitoes able to tolerate the viral infection and what is the relationship with reproductive aspects are still poorly understood. In this work, we aim to improve parameters to evaluate the viral tolerance profile of *Ae. aegypti* infected with Dengue Serotype 4. We characterized impact of infection on fecundity (by egg counting) and fertility (by egg hatching) in mosquitoes infected with a laboratory viral strain and a clinical strain. The results suggest that there is no impact on females infected by the laboratory strain on fecundity and fertility. However, was observed impact on the fertility of *Ae. aegypti* infected by the maximum dose of the clinical strain, suggesting that different viral genotypes may influence the tolerance response of vector mosquitoes.

**Keywords:** Viral Infection. Arboviruses. Vector Mosquitoes. Immunity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida. ....	14
Figura 2 - Dinâmica de infecção viral em <i>Aedes</i> spp. ....	15
Figura 3 - Fecundidade de <i>Aedes aegypti</i> 5 dias após infecção com cepa de laboratório e cepa clínica. ....	24
Figura 4 - Fecundidade entre fêmeas que colocaram ovos nas fitas (5 dias após alimentação) e ovos diretamente contabilizados nos ovários (66h após alimentação). .....	25
Figura 5 - Fertilidade de <i>Aedes aegypti</i> 5 dias após infecção com cepa de laboratório e amostra clínica. ....	27
Figura 6 - Exemplo modelo básico de Curva de Tolerância. ....	28
Figura 7 - Curvas de tolerância. ....	29

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATP – Trifosfato de Adenosina

CHIKV – Vírus Chikungunya

DENV-1 – Vírus Dengue Sorotipo 1

DENV-2 – Vírus Dengue Sorotipo 2

DENV-3 – Vírus Dengue Sorotipo 3

DENV-4 – Vírus Dengue Sorotipo 4

DENV 4-LRV/13422 – Vírus Dengue Sorotipo 4 Cepa Clínica

DENV-4 TVP-360 – Vírus Dengue Sorotipo 4 Cepa de Laboratório

EIP – Período de Incubação Extrínseca

IMD – Via da Imunodeficiência

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Salina Tamponada com Fosfato

RNAi – Ácido Ribonucleico Interferente

siRNA – Pequeno Ácido Ribonucleico Interferente

vDNA– DNA viral

ZIKV – Vírus Zika



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	<i>Aedes aegypti</i> .....	13
1.2	ARBOVÍRUS .....	14
1.3	DENGUE .....	15
1.4	IMUNIDADE DE <i>Aedes</i> spp. ....	16
1.5	O BALANÇO ENTRE A IMUNIDADE E A REPRODUÇÃO.....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1	CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS.....	18
3.2	INFECÇÃO DOS MOSQUITOS .....	19
3.3	FECUNDIDADE E FERTILIDADE .....	20
3.4	DISSECAÇÃO DOS OVÁRIOS .....	20
3.5	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL .....	20
3.6	CURVA DE TOLERÂNCIA .....	21
3.7	ESTATÍSTICA .....	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Aedes aegypti*.

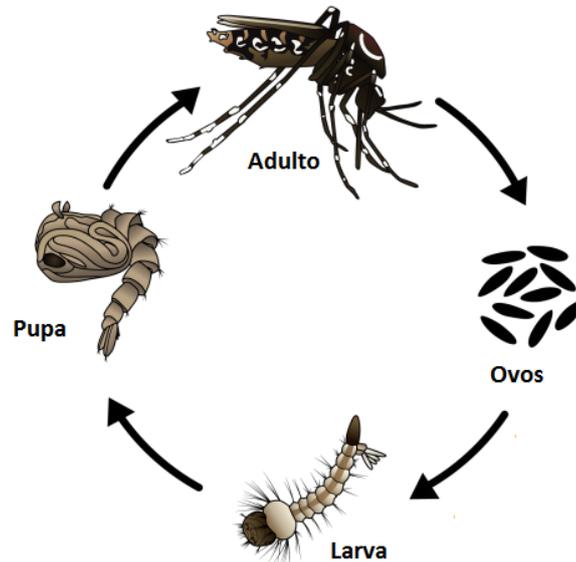
*Aedes aegypti* é uma espécie de mosquito (Diptera: Culicidae) descrita primeiramente no continente africano. Nos dias atuais, sua distribuição se dá globalmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. A disseminação do mosquito pelo planeta foi favorecida por ações e migrações antrópicas. Fatores abióticos (clima e tempo), características e hábitos antropofílicos do mosquito, como a preferência pelo período diurno, criadouros artificiais, sangue humano, não emitir som audível e possuir alta habilidade em escapar da vítima sob ameaça durante o repasto sanguíneo, culminam em alta dispersão do inseto, principalmente em áreas com grande concentração de seres humanos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

O ciclo de vida de *Ae. aegypti* é considerado rápido e com duas fases distintas (*Figura 1*). Uma das fases do ciclo de vida é a imatura, que corresponde aos estágios aquáticos (ovos, larvas e pupas). A outra fase do ciclo corresponde quando o inseto adquire maturidade sexual e é representada pelo indivíduo adulto alado (mosquito). É no estágio adulto que fêmeas utilizam da hematofagia (repasto sanguíneo) em animais vertebrados a fim de obter recursos nutricionais para maturação e desenvolvimento dos ovos (BRUCE, 2004).

No repasto sanguíneo, mosquitos secretam saliva pois facilita a ingestão de sangue, a mesma contém compostos que estimulam a vasodilatação no vertebrado e atividade anticoagulante (BRUCE, 2004). A saliva de *Ae. aegypti* é alvo de muitos estudos de interesse biotecnológico, já que a mesma é uma solução com diversas proteínas ativas na modulação da dor, coagulação e vasodilatação (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2003). Além disso, é através da saliva que insetos infectados inoculam e transmitem arbovírus para hospedeiros humanos durante a picada.

Figura 1 - Ciclo de vida.

Um ovo demora entre 7 e 10 dias para virar um mosquito adulto



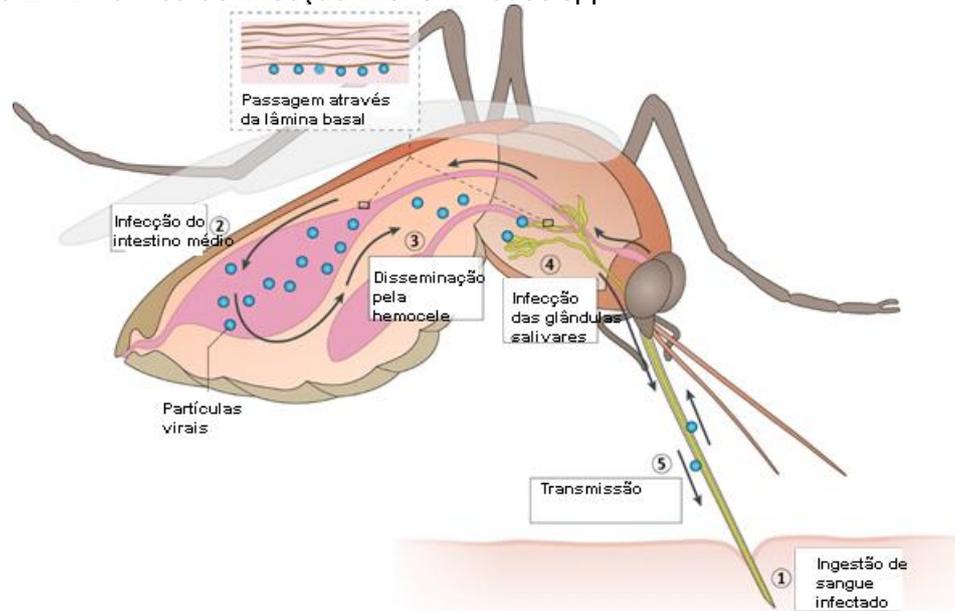
Legenda: Esquema representativo do ciclo de vida de mosquitos *Aedes* spp e seus respectivos estágios de vida. Ovos, larvas e pupas correspondem a estágios pertencentes ao ambiente aquático. O estágio adulto é representado pelo mosquito e é uma fase alada. A eclosão dos ovos se dá a partir de 24 horas. Do estágio de larva para pupa leva aproximadamente 7 dias. As pupas emergem como indivíduos adultos em até 2 dias. Por fim, fêmeas adultas inseminadas por machos adultos e que comeram sangue estão prontas para postura de ovos em ambiente aquático. Fonte: Adaptado de Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

## 1.2 ARBOVÍRUS

Arbovírus (*Arthropod-borne virus*) são vírus transmitidos por artrópodes, caracterizados pelo fato de parte do ciclo replicativo viral ocorrer nesses invertebrados (LOPES et al; 2014). Fêmeas de *Ae. aegypti* tornam-se infectadas durante o repasto sanguíneo ao picarem um hospedeiro humano já infectado por arbovírus. No mosquito, a infecção viral se dá primeiramente no intestino médio. Em seguida, as partículas virais se espalham através da hemolinfa para outros tecidos secundários, como traqueia, ovários, corpo gorduroso e glândulas salivares. Se partículas virais infecciosas chegarem às glândulas salivares (*Figura 2*), pode-se presumir que esses mosquitos terão potencial de infectar um hospedeiro durante uma nova picada (FRANZ et al; 2015, HARDY et al; 1983). Mosquitos *Aedes* spp., principalmente *Ae. aegypti*, são amplamente conhecidos por serem vetores de arbovírus que provocam doenças em humanos, como a Febre Amarela, Zika, Chikungunya e Dengue. Essas arboviroses são responsáveis por epidemias emergentes e reemergentes no mundo, conhecidas por seus impactos socioeconômicos e na saúde pública, devido à alta

prevalência global, morbidades e mortalidades (NYARUABA; *et al*; 2019, LETA *et al*; 2017, MONATH e VASCONCELOS, 2015, SIKKA; *et al*, 2016, WEAVER e LECUIT, 2015).

Figura 2 - Dinâmica de infecção viral em *Aedes* spp.



Legenda: (1) Ingestão de sangue com vírus durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. (2) O sangue infectado é transportado para o intestino médio da fêmea a fim de ocorrer digestão do mesmo. (3) As partículas virais que conseguem infectar as células do intestino médio e ultrapassam a membrana basal podem disseminar pela hemocele para outras regiões do mosquito, como as glândulas salivares. (4) Infecção e replicação de vírus nas células das glândulas salivares. (5) Transmissão de vírus pela saliva excretada durante o repasto sanguíneo. Fonte: Adaptado de Weaver *et al*. (2021)

### 1.3 DENGUE

A dengue é uma arbovirose encontrada principalmente em países de clima tropical e subtropical e sua incidência global tem crescido rapidamente nos últimos anos (STANAWAY; *et al*, 2016). A infecção por vírus dengue se mostra predominante dentre os arbovírus, sua ocorrência mundial aumentou 30 vezes nos últimos 30 anos e mais de 3,9 bilhões de pessoas correm o risco de contraí-la (WHO, 2020). Estima-se que há 390 milhões de pessoas infectadas por ano, sendo 96 milhões com alguma manifestação clínica da doença e 40.000 mortes por ano (WHO, 2020, BHATT *et al*;

2013, WILDER-SMITH *et al*; 2017). Somente em 2016, houve mais de 2,38 milhões de casos no continente americano, sendo que o Brasil contribuiu com aproximadamente 1,5 milhões desses (WHO, 2021).

Não há tratamento antiviral ou vacina eficiente contra a doença e o combate ao mosquito vetor é reconhecido pela OMS como a mais eficiente estratégia anti-dengue disponível (WHO, 2021). Nesse sentido, é de fundamental importância compreender a relação mosquito-vírus para que o controle da doença seja alcançado.

#### 1.4 IMUNIDADE DE *Aedes* spp.

Mosquitos *Aedes* spp. possuem competência vetorial para os vírus que transmitem. Isto é, há prevalência de infecção nos insetos e os mesmos tem aptidão em transmitir os patógenos para hospedeiros (RÜCKERT e EBEL, 2018). Apesar disso, as partículas virais nos mosquitos enfrentam barreiras estruturais como o epitélio do intestino médio, a hemocele, matriz peritrófica e glândulas salivares (VIGLIETTA *et al*; 2021). Fatores imunometabólicos do intestino médio, a microbiota e componentes do sangue do hospedeiro, também podem ter papéis moduladores na permissividade de *Aedes* spp. à infecção viral (MA *et al*; 2021; SAMUEL, *et al*; 2018; YU *et al*; 2019).

A fase de replicação viral no inseto, ou seja, entre o mosquito infectar-se e se tornar infectivo, é chamada de Período de Incubação Extrínseca (EIP). No entanto, o EIP não passa despercebido pelo organismo destes animais, já que mosquitos *Aedes* spp. possuem mecanismos para lidar com a carga infecciosa e tolerar os impactos causados pelo vírus.

Quando um organismo está sob estado de infecção por algum patógeno, conceitua-se que o hospedeiro está sujeito a dois tipos de defesas imunológicas: os mecanismos de resistência e os de tolerância. No mosquito, a capacidade de partículas virais conseguirem se estabelecer e se replicarem é dependente, principalmente, do sistema de resistência do vetor. Ou seja, de vias imunológicas evolutivamente conservadas e mecanismos moleculares/celulares que atuam no controle da carga ou partícula infecciosa. Esses já são bastante estudados na literatura, como a via Toll, IMD, JAK-STAT, e RNAi (siRNA) (VIGLIETTA *et al*; 2021).

Diferente da estratégia de resistência, a atuação da tolerância não lida diretamente com a carga do patógeno. A tolerância é um conceito introduzido por botânicos que se refere a um tipo de defesa do organismo capaz de limitar e reparar os impactos negativos provocados pela infecção. Como por exemplo, tentar diminuir os custos adaptativos no hospedeiro causados por danos fisiológicos e estruturais disparados pela infecção e imunopatologia. (CALDWELL *et al*; 1958, MEDZHITOV *et al*; 2012, SOARES *et al*; 2014, SCHNEIDER e AYRES, 2008). Mosquitos *Aedes* spp. são tolerantes aos arbovírus, porém ainda é pouco compreendido os mecanismos responsáveis por promover tolerância durante a infecção viral e como essa capacidade varia nas diferentes populações (OLIVEIRA, 2020, DHARMARAJAN *et al*; 2019, LAMBRECHTS e SALEH, 2019).

A resposta de tolerância pode ser quantificada através de uma curva dose-resposta que correlaciona a carga do patógeno com o impacto que ela causa na saúde da população (AYRES e SCHNEIDER, 2012, MEDZHITOV *et al*; 2012, LOUIE *et al*; 2016). Porém, como medir e avaliar saúde em mosquitos vetores? Muitos dos trabalhos publicados focam no parâmetro “média de morte” a fim de relacionar o impacto da infecção na saúde de insetos. No entanto, pode ser uma medida limitada, principalmente quando analisada de maneira isolada. Uma vez que a infecção desencadeia diferentes impactos e respostas em insetos (KUTZER e ARMITAGE, 2016). Portanto, neste trabalho buscamos desenvolver e propor parâmetros alternativos para avaliar o perfil tolerância de *Aedes aegypti* infectados com DENV-4.

## 1.5 O BALANÇO ENTRE A IMUNIDADE E A REPRODUÇÃO.

Tanto a resposta imune quanto a reprodução de insetos demandam custos energéticos. Indivíduos sujeitos a infecções investem mais recursos energéticos a fim de combatê-la e, conseqüentemente, menos recursos energéticos para aspectos que envolvem a reprodução (SCHWENKE *et al*; 2016).

Para algumas espécies pertencentes às ordens Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Lepidoptera, os dados indicam que há um balanço entre imunidade e reprodução. A indução do sistema imune implica negativamente na fisiologia reprodutiva, onde há redução da produção de ovos e da viabilidade dos mesmos. E

os custos fisiológicos da reprodução levam à redução dos níveis basais e induzidos da imunidade (HURD, 2001; SCHWENKE *et al*; 2016).

Pouco se sabe da relação entre a imunidade de tolerância viral e a reprodução em *Ae. aegypti* infectados pelos seus agentes etiológicos, assim como os mecanismos envolvidos na regulação do balanço energético. Compreender essa relação pode permitir que ferramentas com potencial biotecnológico sejam desenvolvidas a fim de provocar impactos negativos na capacidade vetorial de mosquitos vetores. A capacidade vetorial é um conceito que busca quantificar a aptidão de um inseto ser vetor do patógeno. Ela é mensurada por uma equação que relaciona as principais condições que potencializam isso, como a competência vetorial, EIP, probabilidade de sobrevivência e capacidade de gerar prole (RÜCKERT e EBEL, 2018). Portanto, caracterizar e investigar a tolerância viral em *Aedes aegypti* infectado por Dengue poderá ajudar a frear os surtos da doença. Além disso, possibilitará construir um melhor entendimento na interação mosquito-vírus e sobre as diferentes maneiras de medir tolerância para mosquitos vetores.

## **2 OBJETIVO**

Avaliar o perfil de tolerância viral de *Ae. aegypti* infectados com DENV-4 caracterizando o impacto da infecção na fecundidade (oviposição) e fertilidade (viabilidade dos ovos).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS**

Utilizou-se mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem *Red Eye* (OLIVEIRA, 2017). Foram criados em uma sala especial no laboratório conforme as normas de biossegurança padronizadas pela comunidade nacional e internacional que trabalha com biologia de vetores (GERBERG, 1970). Os ovos, agregados a uma fita de papel filtro, são depositados em uma bandeja de plástico com água filtrada para a eclosão dos mesmos. Como larvas, adicionamos ração de cachorro na bandeja com água para se alimentarem, crescerem e desenvolverem pupas. Cada bandeja possui aproximadamente 150 a 250 larvas. A fase de desenvolvimento de larva para pupa

pode variar entre 7 a 10 dias. Na fase de pupa, são transferidos para recipientes menores para que caibam nas gaiolas, onde permanecerão até a fase adulta. Com a metamorfose emergirá um indivíduo alado (adulto) em 48 horas. Quando adultos são alimentados com solução aquosa 5% de sacarose, umedecida em algodão. As bandejas contendo as larvas, assim como as gaiolas são mantidas em estufas incubadoras com temperatura 28 °C, umidade 80% e controle de luminosidade 12 horas claro - 12 horas escuro.

### 3.2 INFECÇÃO DOS MOSQUITOS

Para a infecção utilizamos fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue humano. O sangue é retido em recipiente com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético. Foram utilizadas doses crescentes da linhagem do vírus DENV 4-TVP/360 (cepa de laboratório) e do DENV 4-LRV/13422 (cepa clínica). A cepa clínica foi isolada de um paciente no Paraná e nos foi cedida pela Fio Cruz – Paraná. O título do estoque viral de cada vírus é de  $9,5 \times 10^7$  PFU/mL e  $1,13 \times 10^7$  PFU/mL, respectivamente. O sangue é centrifugado a 2000g por 5 minutos, a temperatura 4 °C. O soro/plasma é removido e descartado e o sedimento de hemácias é lavado com solução PBS. Em seguida, a suspensão de hemácias é misturada na proporção 1:1 com o sobrenadante de células C6/36 infectadas com DENV-4. A essa suspensão, coloca-se o ATP que é um fagoestimulante na concentração de 1mM e pH 7. Com isso, a solução de dose máxima de vírus oferecida aos mosquitos fica aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  PFU/mL para a cepa de laboratório, e  $0,5 \times 10^7$  PFU/mL para a cepa clínica. Logo após, empregamos um alimentador artificial de vidro contendo a suspensão de sangue e vírus, aquecido por água a 37 °C durante uma hora. Utilizamos parafilme como membrana a ser picada pelos insetos. Encerrada a uma hora, os mosquitos totalmente engorgitados são separados em gaiolas individuais com solução aquosa 5% de sacarose e fitas de papel filtro (4cmx13cm) para postura de ovos. Sendo um mosquito por gaiola. Um outro grupo de mosquitos totalmente engorgitados são imediatamente separados e armazenados a -80°C para quantificação da carga viral.

### 3.3 FECUNDIDADE E FERTILIDADE

Cinco dias após alimentação infecciosa é feita a coleta das fitas de ovos. Essas são transportadas para recipientes individuais a fim de efetuar a eclosão natural 7 dias depois. A contagem dos ovos é feita visualmente utilizando um estereoscópio para o parâmetro fecundidade. Nos recipientes para a eclosão, além das fitas, depositamos 130mL de água filtrada e ração. Três dias após, contabilizamos manualmente o parâmetro fertilidade através do número de larvas dos ovos eclodidos.

### 3.4 DISSECAÇÃO DOS OVÁRIOS

Sabendo que fêmeas de *Ae. aegypti* depositam seus ovos em aproximadamente 72 horas, optou-se por dissecar os ovários das fêmeas 66 horas após a alimentação com sangue, a fim de quantificar os ovos presentes nas estruturas reprodutivas. A dissecação foi feita em etanol 50% com auxílio de pinças entomológicas nº 5 e estereoscópio.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL

Para quantificação da carga viral trabalhou-se com o ensaio de placa, basicamente é um procedimento que consiste em diluições seriadas de um vírus inoculado em monocamadas confluentes de uma cultura de células. As células que sofrem o efeito citopático induzido pelo vírus geram placas de lise visíveis a olho nu. Através da contagem dessas placas que se estima a carga viral presente nos mosquitos. As células manipuladas para o experimento são células aderentes linhagem Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano – ATCC®, CCL-81™). As células foram mantidas em garrafas de 75cm<sup>2</sup>, propagadas e cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12 1X, GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) suplementado com: 5% de soro fetal bovino (SFB, - GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e 1% de

penicilina/estreptomicina (P/S – GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A linhagem celular é incubada em estufa úmida à 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>.

Vinte e quatro horas antes do experimento as células são depositadas em monocamadas com confluência de 70% a 80% em 24 poços. Para isso, a garrafa de células é lavada uma vez com solução salina 0,9% estéril (Eurofarma), e as células aderentes são soltas através da adição de tripsina/EDTA 0,05% (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). As células permanecem incubadas com tripsina/EDTA em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 3 min. Após isso, são individualizadas através do jateamento vigoroso por pipetagem. Uma alíquota das células é diluída em reagente azul de tripan (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) para contagem em câmara de Neubauer. Depois da contagem, as células são diluídas em meio DMEM F12 completo, e distribuídas homogeneamente no valor  $5 \times 10^4$  células por poço. As placas permanecem incubadas por 24h, para total aderência da monocamada celular e para a confluência ideal para realização do ensaio de placa, como mencionado acima.

Os mosquitos infectados, até então armazenados em -80°C, são primeiramente limpos em álcool 70%, hipoclorito 1% e salina 0,9%. Em seguida, são transferidos para microtubos individuais contendo 200 µL DMEM F12 completo para serem homogeneizados por meio de pistilo e vórtex manual. Após macerado, é preciso separar a fase sólida da líquida, para isso, as amostras são centrifugadas na centrífuga Eppendorf 5810R à 3200 g por 5 min, à 4 °C. Em seguida, é feita a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) de 40µL do homogeneizado para cada 360 µL de meio. O homogeneizado é incubado por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso, o sobrenadante das células é descartado e insere-se 700 µL de meio semi sólido (DMEM F12 (2x) + CMC 1,6%). Cinco dias após infecção, a placa é retirada da incubadora e as células são fixadas por 30 min com 1 Volume (700 µL) de paraformaldeído 3%. Os poços são lavados e corados com cristal violeta 1%, após 30 minutos retira-se o excesso para visualização da formação e contagem das Unidades Formadoras de Placa (PFU).

### 3.6 CURVA DE TOLERÂNCIA

A curva de tolerância é um gráfico dose-resposta que relaciona a carga do patógeno com o impacto que ela causa na saúde da população (AYRES e SCHNEIDER, 2012, MEDZHITOV et al; 2012, LOUIE et al; 2016). Neste trabalho, dois parâmetros distintos serão utilizados para representar a estimativa da saúde do hospedeiro à infecção, são eles: Fecundidade e Fertilidade. Mosquitos são alimentados com sangue infectado com doses crescentes de Dengue-4 e separados em dois grupos. Um grupo é usado para o registro do impacto na infecção dos insetos. Outro grupo é usado para a quantificação da carga viral no inseto imediatamente após a infecção. A média da fecundidade e fertilidade de cada dose é usada no eixo Y e a carga viral é usada no eixo X da curva de tolerância.

### 3.7 ESTATÍSTICA

Os gráficos foram analisados e elaborados no *software* GraphPad Prism 8, utilizando teste Mann Whitney, teste de comparação múltipla Tukey e Dunnett's, ANOVA de uma via, conforme o desenho experimental. A análise estatística foi expressa da seguinte forma: \* $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

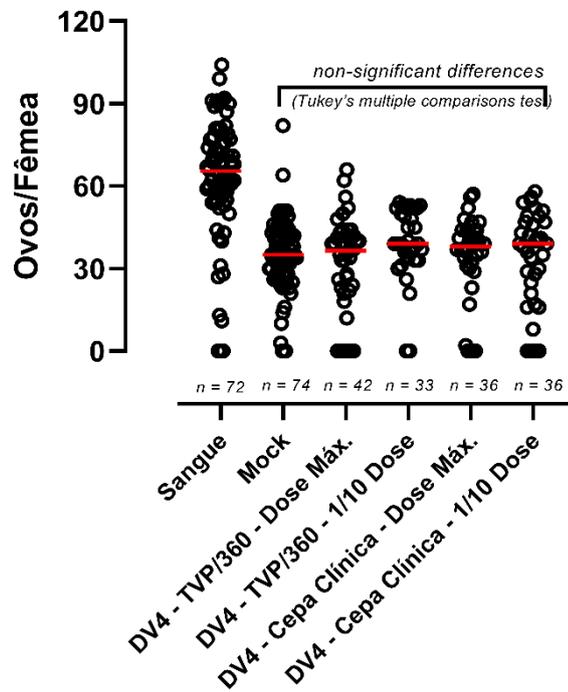
Os mecanismos envolvidos em manter a homeostasia provavelmente contribuem para a tolerância do hospedeiro durante a infecção. A ativação de tais mecanismos, ainda largamente desconhecidos, pode favorecer a redução dos impactos e custos adaptativos associados à infecção, já que buscam manter a função normal dos tecidos, independente da causa da desregulação (MEDZHITOV *et al*; 2012). Como por exemplo, o vDNA proveniente da infecção por arbovírus em *Ae. aegypti* favorece tolerância viral que acarreta na sobrevivência dos insetos (GOIC *et al*; 2016). No entanto, é pouco compreendido a relação entre tolerância viral e parâmetros de saúde de mosquitos *Aedes* spp., como a fecundidade (BUCKNER *et al*; 2013) e fertilidade.

Uma métrica frequentemente utilizada para analisar marcadores de saúde em mosquitos vetores é através de curvas de sobrevivência. Porém, a coleta do dado final muitas vezes pode durar meses, isso se não ocorrer nenhuma interferência ambiental que prejudique o experimento. Nesse sentido, parâmetros como fecundidade e fertilidade são interessantes, pois há praticidade na coleta dos dados e são experimentos de curta duração.

A fim de caracterizar a fecundidade e testar a hipótese que a infecção viral não prejudica a oviposição de *Ae. aegypti*. Buscou-se medir a quantidade de ovos depositados por fêmeas não infectadas e infectadas por uma cepa de laboratório (DENV-4 TVP-360) e uma cepa clínica isolada (DENV 4-LRV/13422). Quando analisamos a fecundidade entre os grupos de mosquitos infectados por DENV-4 e o controle Mock, é possível observar que a infecção, independente da concentração e da cepa, não causa impacto na quantidade de ovos colocados (*Figura 3*). A maior parte dos trabalhos publicados traz evidências que não existe impacto na infecção por DENV-1, DENV-2, CHIKV e ZIKV na primeira postura de ovos em *Ae. aegypti*. (MACIEL-DE-FREITAS *et al*; 2011, BUCKNER *et al*; 2013, SYLVESTRE *et al*; 2013, RUIZ-GUZMÁN *et al*; 2016, MOUTAILLER *et al*; 2013, GABURRO *et al*; 2018, RESCK *et al*; 2020, PADILHA *et al*; 2018, CHAVES *et al*; 2019, SILVEIRA *et al*; 2018). Apesar de já ter sido mostrado que existe redução da postura de ovos para *Ae. aegypti* infectados pelos quatro sorotipos de vírus dengue (SONI *et al*; 2020), assim também para outros arbovírus, como ZIKV e CHIKV (PADILHA *et al*; 2018, SIRISENA *et al*; 2018). Com isso, os dados apresentados na *Figura 1* reforçam que mosquitos *Aedes* spp. infectados por diferentes populações de arbovírus não possuem sua fecundidade afetada.

Ressalto que, como se trata de um experimento envolvendo a postura de ovos, era esperado a redução de ovos pelo Mock em relação ao Sangue (*Figura 3*), uma vez que, tanto para o preparo do Mock quanto do vírus, é feita a retirada de soro do sangue antes de alimentar os insetos, pois o soro proveniente do sangue pode modular a permissividade do vírus no mosquito. É nesta retirada de soro que componentes nutritivos para a maturação dos ovos podem acabar sendo descartados.

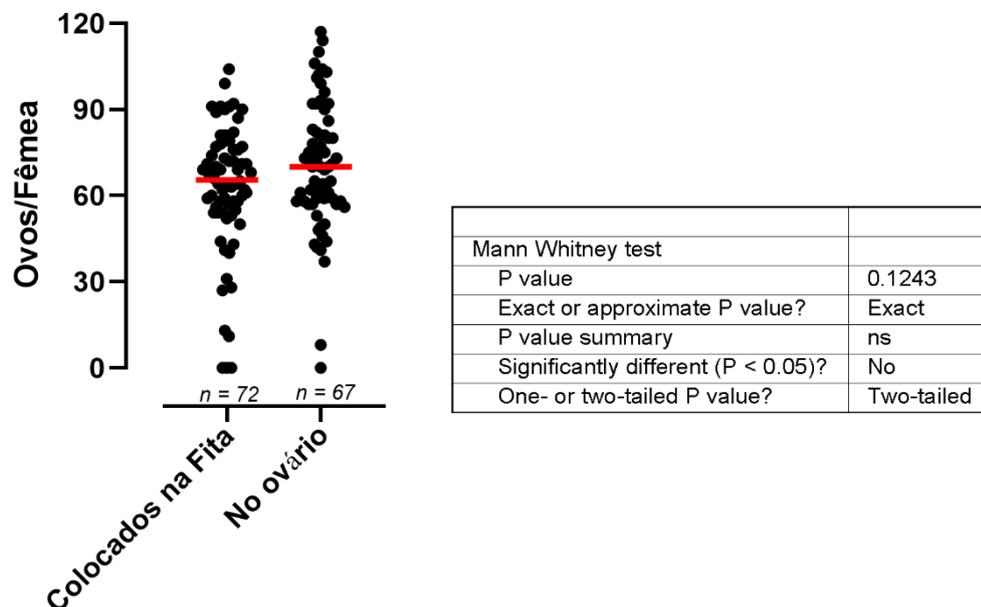
Figura 3 - Fecundidade de *Aedes aegypti* 5 dias após infecção com cepa de laboratório e cepa clínica.



Legenda: Sangue é o controle positivo e Mock o controle do vírus. Cada ponto representa a oviposição de um mosquito. A linha vermelha representa a média. As doses intermediárias representam diluição de 1/10 da Dose Máxima. Esse experimento foi realizado pelo menos três vezes de forma independente analisado por teste de comparação múltipla Tukey e ANOVA.

Visto que o método empregado para contabilização dos ovos da Figura 3 não é um cenário natural, mas sim uma condição de laboratório, tentamos validar o método utilizado buscando quantificar os ovos diretamente nos ovários antes de serem depositados. Observa-se que não há diferença significativa entre a quantidade de ovos colocados nas fitas e contabilizados nos ovários (*Figura 4*), demonstrando que o método de avaliação da fecundidade apresentado na Figura 3 não adiciona nenhum viés experimental entre a quantidade de ovos efetivamente produzida pelos mosquitos e a quantidade que medimos.

Figura 4 - Fecundidade entre fêmeas que colocaram ovos nas fitas (5 dias após alimentação) e ovos diretamente contabilizados nos ovários (66h após alimentação).



Legenda: Cada ponto representa a oviposição de um mosquito. Todos os mosquitos ficaram em jejum por 24 horas e comeram apenas sangue. A linha vermelha representa a média. Esse experimento foi realizado pelo menos três vezes de forma independente analisado por teste Mann Whitney.

Assim como a fecundidade, a fertilidade (viabilidade dos ovos) de insetos é fundamental para manutenção de uma população, já que a eclosão de ovos viáveis contribuirá para continuidade do ciclo de vida e decorrente propagação da espécie. Conforme análise empírica do nosso grupo, o tempo de eclosão dos ovos de *Ae. aegypti* se dá a partir de 24 horas em condição de laboratório. Nesse sentido, por ser um fator essencial para a biologia do mosquito, e ainda, prático e rápido do ponto de vista da coleta de dados, buscamos caracterizar a fertilidade a partir da hipótese que a infecção viral não prejudica a fertilidade de *Ae. aegypti*. Para isso, foi quantificada a eficiência da eclosão para cada fêmea através do cálculo da porcentagem de ovos eclodidos frente ao número total de ovos coletados na Figura 3, conforme os diferentes tratamentos.

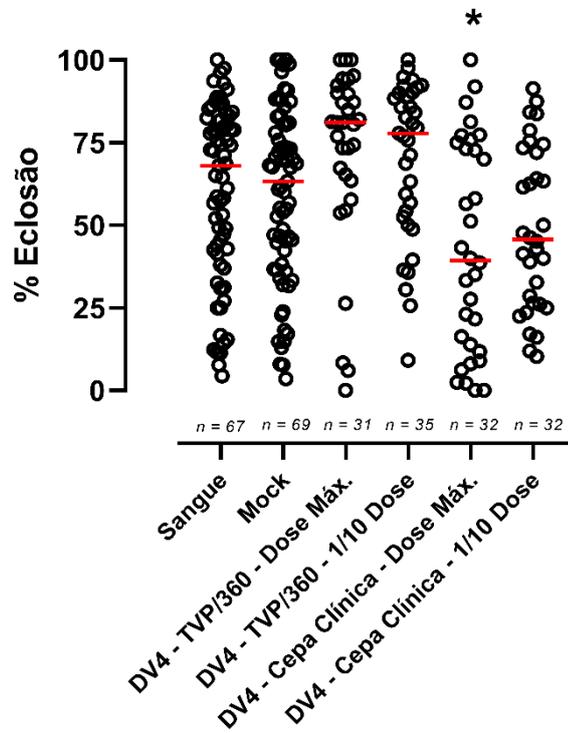
A Figura 5 mostra que não há impacto pela infecção da cepa de laboratório, independente da dose inoculada. Porém, o efeito da infecção viral pela dose máxima da cepa clínica afeta negativamente esse parâmetro, uma vez que há diferença significativa em relação ao Mock. Existem pouquíssimos trabalhos publicados relacionando fertilidade de *Ae. aegypti* e infecção por arbovírus. Por exemplo, já foi

relatado que quando infectadas por DENV-2 ou ZIKV não é visto impacto na fertilidade (MOUTAILLER *et al*; 2013, RESCK *et al*; 2020, PADILHA *et al*; 2018). Entretanto, em outros estudos para ZIKV, assim como para CHIKV, observa-se impacto nesse parâmetro de saúde (CHAVES *et al*; 2019, RESCK *et al*; 2020, SIRISENA *et al*; 2018).

É possível observar que apesar da infecção pela cepa laboratorial gerar impacto na fecundidade dos mosquitos (*Figura 3*), isto não é visto na fertilidade (*Figura 5*). O que pode indicar que a infecção gera custos distintos para as diferentes propriedades reprodutivas e mecanismos compensatórios. Infelizmente, não se tem informação na literatura das possíveis causas para essa relação.

Por existir uma grande lacuna no entendimento da fertilidade de mosquitos *Aedes* spp. infectados por diferentes arbovírus, o resultado encontrado neste trabalho se torna promissor e interessante, já que de alguma forma a cepa clínica modulou a tolerância dos mosquitos, visto que houve impacto negativo na saúde dos insetos (*Figura 5*). Desta maneira, o achado permitirá investigar os possíveis mecanismos envolvidos ou que estão desencadeando o fenótipo encontrado, e assim, facilitará a compreensão sobre tolerância viral em mosquitos *Aedes* spp. e a possibilidade de rompimento dessa tolerância.

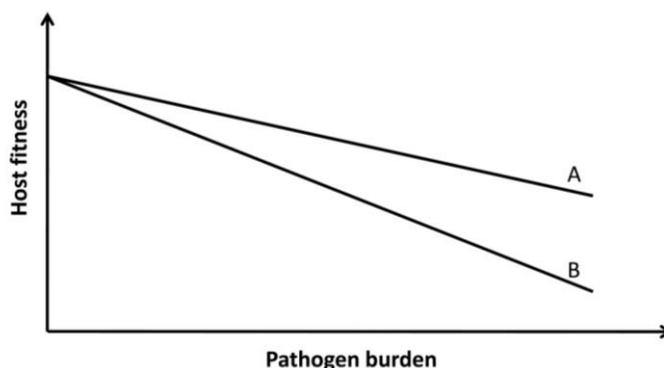
Figura 5 - Fertilidade de *Aedes aegypti* 5 dias após infecção com cepa de laboratório e amostra clínica.



Legenda: Sangue é o controle positivo e Mock o controle do vírus. Cada ponto representa a porcentagem de ovos viáveis por mosquito. A linha vermelha representa a média. As doses intermediárias representam diluição de 1/10 da Dose Máxima. Esse experimento foi realizado pelo menos três vezes de forma independente analisado por teste de comparação múltipla Dunnett's e ANOVA. \* $p < 0,05$  quando comparado ao Mock.

A infecção pode gerar mudanças que nem sempre resultam em algum tipo de impacto, e também, pode levar à melhor adaptação na saúde do hospedeiro, mesmo com a replicação do patógeno, tornando assim o organismo tolerante. O perfil de tolerância se dá por uma estimativa através do ângulo de inclinação de uma reta que correlaciona a carga do patógeno com a saúde da população (*Figura 6*).

Figura 6 - Exemplo modelo básico de curva de tolerância.



Legenda: A e B representam diferentes genótipos, ou seja, populações distintas. O eixo X é a carga do patógeno e o eixo Y representa o parâmetro saúde. Nesse caso, a população A é mais tolerante que a população B, visto que possui maior saúde na presença da mesma carga do patógeno. A figura foi extraída de Medzhitov *et al* (2012).

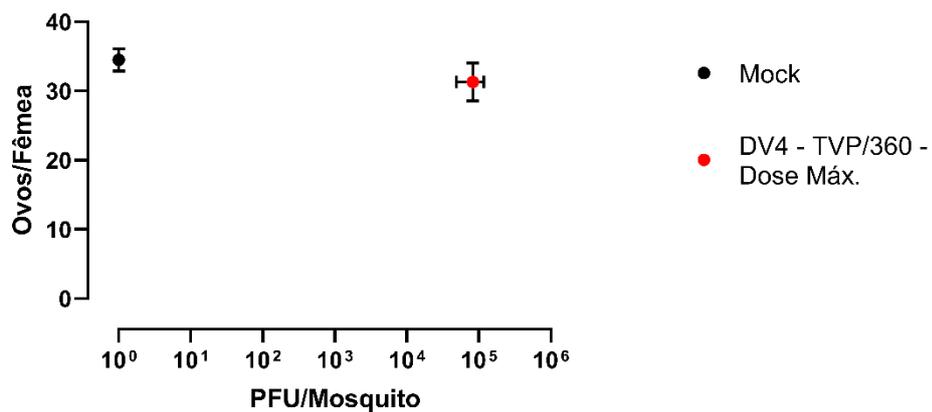
Como mencionado no decorrer do texto, este trabalho possui forte interesse em avaliar o perfil de tolerância de mosquitos *Ae. aegypti* infectados por DENV-4. Pois, investigar e aperfeiçoar um método que consiga caracterizar tolerância viral para diferentes aspectos da saúde de mosquitos vetores, como fecundidade e fertilidade, possibilitará compreender os mecanismos regulatórios e vias envolvidas no processo. Conseqüentemente, isso poderá servir como ferramenta biotecnológica a fim de interromper o ciclo de propagação de arboviroses. A identificação e inibição de vias celulares de tolerância resultará em perda de adaptabilidade (*fitness*) do vetor e redução do número de picadas infecciosas, impactando negativamente a transmissão de arboviroses. Esperamos que no futuro, nossos estudos possam revelar alvos de bloqueio de tolerância e funcionar como estratégia alternativa no controle da transmissão de Dengue, e até mesmo para outras arboviroses como Zika, Chikungunya e Febre Amarela.

Na Figura 7, é possível observar que *Ae. aegypti* apresenta perfil de tolerância para a cepa de laboratório de DENV-4 para os dois parâmetros analisados, uma vez que se for traçar uma reta imaginária entre os dois pontos, a inclinação da mesma será mínima ou não haverá. Para uma curva de tolerância correlacionando DENV-1 e fecundidade em *Aedes* spp. foi visto que existe uma correlação positiva entre título viral no corpo todo do mosquito e oviposição (BUCKNER *et al*; 2013). Infelizmente, as quantificações da carga viral para a dose intermediária da cepa de laboratório e para a cepa a clínica não foram possíveis de serem geradas por problemas técnicos que já estão sendo sanados. Isso fez com que não conseguíssemos adicionar na Figura 7 o

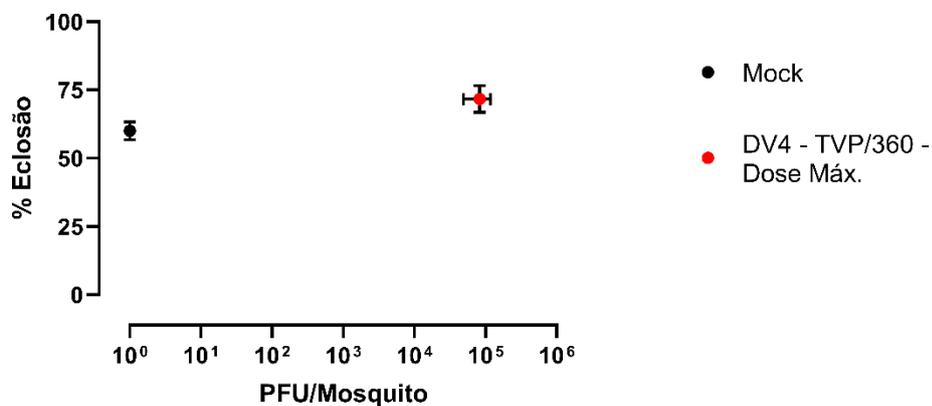
perfil de tolerância dos mosquitos infectados com a cepa clínica. Porém, fica claro que haverá impacto negativo na tolerância dos mosquitos infectados com essa cepa, usando a fertilidade como parâmetro, uma vez que a Figura 5 demonstra redução da porcentagem de eclosão dos ovos.

Figura 7 - Curvas de tolerância.

**A**



**B**



Legenda: (A) Curva de tolerância para o parâmetro Fecundidade. (B) Curva de tolerância para o parâmetro Fertilidade. Para o eixo Y os desvios são representados pelo erro padrão da média. Para o eixo X são representados pelo desvio padrão. Esse experimento foi realizado pelo menos três vezes de forma independente.

A infecção afeta potencialmente muitos processos fisiológicos, e por conta disso, a tolerância não se restringe a uma única via de proteção, mas vários mecanismos que ajudam a reduzir a vulnerabilidade do hospedeiro a danos. O

controle de dano tecidual pode ser regulado pela neutralização de toxinas e outros fatores desencadeados pela infecção, como respostas adaptativas celulares e sistêmicas que limitam os efeitos deletérios associados a diferentes formas de estresse e danos provocados pelos próprios patógenos (MEDZHITOV *et al*; 2012).

Nesse sentido, a presença do vírus dengue pode ativar mecanismos que restauram a homeostasia e função tecidual dos mosquitos, não causando impacto na saúde dos insetos infectados (*Figura 3, Figura 5, Figura 7*). Além disso, o sistema de defesa ou, a relação mosquito-vírus se mostra bem estabelecidos do ponto de vista do equilíbrio evolutivo, pois quando mosquitos *Ae. aegypti* são infectados com outro tipo de patógeno não viral, observa-se impacto na fecundidade (GLEAVE *et al*; 2016; SCHWENKE *et al*; 2016).

## 5 CONCLUSÃO

Foi possível notar que fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas pela cepa de laboratório de DENV-4 não sofrem impacto negativo na fecundidade e fertilidade. Além disso, a infecção nos mosquitos pela dose máxima de uma outra população de vírus (cepa clínica) afetou a fertilidade dos mosquitos.

Investigar como mosquitos toleram a infecção por arbovírus abre possibilidades para identificação de alvos terapêuticos que induzirão queda na fecundidade, fertilidade e homeostasia do inseto durante a infecção. Ou seja, estudos como este poderão contribuir para inibir a tolerância do vetor, competência vetorial e capacidade vetorial, assim, diminuindo a transmissão de arboviroses.



## REFERÊNCIAS

AYRES, J. S; SCHNEIDER, D. S. Tolerance of Infections. **Annual Review of Immunology**. v. 30, p. 271-294. 2012.

BHATT, S; GETHING, P. W; BRADY, O. J; et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**. v. 496, p. 504-507. 2013.

BRUCE, F. E. Mosquitoes, The Culicidae. *In*: MARCQUARDT, W, C. **Biology of Disease Vectors**. Academic Press. p. 95-111. 2004.

BUCKNER, E. A.; ALTO, B. W.; LOUNIBOS, L. P. Vertical transmission of Key West Dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 6, p. 1291–1297, nov. 2013.

CALDWELL, R. M; SHAFER, J. F; COMPTON, L. E; PATTERSON, F. L. Tolerance to cereal leaf rusts. **Science**. v. 128, p. 714-715. 1958.

CHAVES, B. A; *et al.* Vertical Transmission of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) in Amazonian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Delays Egg Hatching and Larval Development of Progeny. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 6, p. 1739–1744, 28 out. 2019.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquitos de importância sanitária do Brasil. **FIOCRIZ**.1994.

DHARMARAJAN, G; WALKER, K. D; LEHMANN, T. Variation in Tolerance to Parasites Affects Vectorial Capacity of Natural Asian Tiger Mosquito Populations. **Current Biology**. v. 29, n. 22, p. 3946- 3952, 18 nov. 2019.

FRANZ, A.W.E; *et al.* Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**. v. 7, p. 3741-3767. 2015.

GABURRO, J; *et al.* Dengue virus infection changes *Aedes aegypti* oviposition olfactory preferences. **Scientific Reports**. v. 8, n. 1, p. 1–11, 4 set. 2018.

GLEAVE, K; *et al.* Filial infection influences mosquito behaviour and fecundity. **Scientific Reports**. v. 6, n. 1, p. 1–8, 31 out. 2016.

GOIC, B; STAPLEFORD, K; FRANGEUL, L; *et al.* Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. **Nature Communications**. v. 7, n. 12410. 2016.

HARDY, J.L; HOUK, E. J; KRAMER, L D; REEVES, W C. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. **Annual Review of Entomology**. v. 28, p. 229-262. 1983.

HURD, H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? **Trends in**

**Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 363–368, 1 ago. 2001.

KUTZER, M. A. M; ARMITAGE, S. A. O. Maximisin Fitness in the Face of Parasites: A Review of Host Tolerance. **Zoology**. v. 119, p. 282-289. 2016.

LAMBRECHTS, L; SALEH, M. C. Manipulating Mosquito Tolerance for Arbovirus Control. **Cell Host & Microbe**. v. 26, n. 3, p. 309-313. 2019.

LETA, S; *et al.* Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Disease**. v. 67, p. 25-35, 28 nov. 2017.

LOUIE, A. *et al.* How Many Parameters Does It Take to Describe Disease Tolerance? **PLoS Biology**. v. 14, n. 4, 2016.

LOPES, N; NOZAWA, C; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 5, n. 3, p.55-64. 2014.

MA, E; *et al.* Interaction of Viruses with the Insect Intestine. **Annual Review of Virology**. v. 8, n. 1, 29 set. 2021.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; KOELLA, J. C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 105, n. 8, p. 452–458, 2011.

MEDZHITOV, R. SCHNEIDER, D. S; SOARES, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**. v. 335. n. 6071, p. 936-941. 2012.

MONATH, T, P; VASCONCELOS, P.F. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**. v. 64. p. 160-173. 2015.

MOUTAILLER, S. *et al.* Differential mortalities of dengue-infected *Aedes aegypti*: preliminary results. <http://dx.doi.org/10.1080/00379271.2010.10697675>, v. 46, n. 3–4, p. 359–366, 2013.

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

OLIVEIRA, J. H. M; BAHIA, A. C; VALE, P. F. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **Developmental & Comparative Immunology**. v. 103, n. 103514. 2020.

OLIVEIRA, J. H. M; TALYULI, O. A. C; GONÇALVES, R. L. S; *et al.* Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection

prevalence of dengue but not Zika. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 4. 2017.

PADILHA, K. P; *et al.* Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 10, p. e180290, 23 ago. 2018.

RESCK, M. E. B; *et al.* Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age. **Scientific Reports**. v. 10, n. 1, p. 1–9, 12 ago. 2020.

RIBEIRO, J. M. C; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annual Review of Entomology**. v.48, p. 73-88. 2003.

RÜCKERT, C.; EBEL, G. D. How do virus-mosquito interactions lead to viral emergence? **Trends in parasitology**, v. 34, n. 4, p. 310, 1 abr. 2018.

RUIZ-GUZMÁN, G; *et al.* Costs and benefits of vertical and horizontal transmission of dengue virus. **Journal of Experimental Biology**. v. 219, n. 22, p. 3665–3669, 15 nov. 2016.

SAMUEL, G. H.; ADELMAN, Z. N.; MYLES, K. M. Antiviral Immunity and Virus-Mediated Antagonism in Disease Vector Mosquitoes. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 447–461, 1 maio 2018.

SCHNEIDER, D. S; AYRES, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nature Reviews Immunology**. v. 8, n. 11, p. 889–895, nov. 2008.

SCHWENKE, R. A.; LAZZARO, B. P.; WOLFNER, M. F. Reproduction–Immunity Trade-Offs in Insects. **Annual Review of Entomology**. v. 61, p. 239–256, 16 mar. 2016.

SIKKA, V.; *et al.* The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). **Journal of Global Infectious Diseases**. v. 8, p, 3-15. 2016.

SILVEIRA, I. D; *et al.* Zika Virus Infection Produces a Reduction on *Aedes aegypti* Lifespan but No Effects on Mosquito Fecundity and Oviposition Success. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 3011, 18 dez. 2018.

SIMMS, E. L. Defining tolerance as a norm of reaction. **Evolutionary Ecology**. v. 14, p.563-570. 2000.

SIRISENA, P. D. N. N; KUMAR, A; SUNIL, S. Evaluation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) life table attributes upon chikungunya virus replication reveals impact on egg-laying pathways. **Journal of Medical Entomology**. v. 55, n. 6, p. 1580–1587, 2018.

SOARES, M. P. GOZZELINO, R. WEIS, S. Tissue damage control in disease tolerance. **Trends in Immunology**. v. 35, p. 483- 494. 2014.

SONI, M; *et al.* Experimental study of dengue virus infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A comparative analysis on susceptibility, virus transmission and reproductive success. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 175, p. 107445, 1 set. 2020.

STANAWAY, J.D; *et al.* The global burden of dengue: An analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 16, p. 712-723. 2016.

SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Age-Dependent Effects of Oral Infection with Dengue Virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feeding Behavior, Survival, Oviposition Success and Fecundity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 29 mar. 2013.

VIGLIETTA, M. *et al.* Vector Specificity of Arbovirus Transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 0, p. 3446, 9 dez. 2021.

WEAVER, S.C; FORRESTER, N.L; LIU, J. *et al.* Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. **Nature Reviews Microbiology**. v. 19, p. 184–195. 2021.

WEAVER, S.C; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **New England Journal of Medicine**. v. 372, p. 1231-1239. 2015.

WHO - World Health Organization. **Dengue and severe dengue**. Geneva: World Health Organization, 2021.

WHO - World Health Organization. **Vector-borne diseases**. Geneva: World Health Organization, 2020.

WILDER-SMITH, A; GLUBER, D. J; WEAVER, S. C; MONATH, T. P; HEYMANN, D. L; SCOTT, T. W. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 17, p. 101-106. 2017.

YU, X; *et al.* Progress towards Understanding the Mosquito-Borne Virus Life Cycle. **Trends in Parasitology**. v. 35, n. 12, p. 1009–1017, 2019.

