



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA JÚLIA BRITO COUTO

**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM
AMOSTRAS DE MOSQUITOS ALIMENTADOS
ARTIFICIALMENTE COM OS VÍRUS ZIKA E
CHIKUNGUNYA**

Recife
2024

MARIA JÚLIA BRITO COUTO

**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM
AMOSTRAS DE MOSQUITOS ALIMENTADOS
ARTIFICIALMENTE COM OS VÍRUS ZIKA E
CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Constância Ayres
Coorientador(a): Dra. Duschinka Guedes e
Dr. Marcelo Paiva

**Recife
2024**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Couto, Maria Júlia Brito .

Avaliação da transmissão vertical em amostras de mosquitos alimentados artificialmente com os vírus Zika e Chikungunya / Maria Júlia Brito Couto. - Recife, 2024.

70 p. : il., tab.

Orientador(a): Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientador(a): Duschinka Ribeiro Duarte Guedes

Coorientador(a): Marcelo Henrique Santos Paiva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Aedes aegypti. 2. Culex quinquefasciatus. 3. Arbovírus. 4. Transmissão transovariana. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira . (Orientação). II. Guedes, Duschinka Ribeiro Duarte . (Coorientação). IV. Paiva, Marcelo Henrique Santos . (Coorientação). V. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIA JÚLIA BRITO COUTO

**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM AMOSTRAS DE
MOSQUITOS ALIMENTADOS ARTIFICIALMENTE COM OS VÍRUS
ZIKA E CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 07/10/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dra. Heverly Suzany Gouveia de Menezes (1º Titular)
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa (2º Titular)
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Constância Ayres, pela oportunidade de desenvolver o projeto e suporte durante este período.

Agradeço à minha co-orientadora, Dra. Duschinka Guedes, por todo o apoio nesses anos de aprendizado, todo o suporte que recebi, além de todo conhecimento repassado, atenção, paciência e todo o auxílio prestado para o melhor desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço ao meu co-orientador, Dr. Marcelo Paiva, pelas contribuições e apoio durante o meu projeto.

Aos colegas de laboratório, agradeço a Maria Eduarda pelas risadas, companheirismo, conhecimentos repassados e todo suporte na bancada e infectório. A Larissa Krokovsky, agradeço por todos os conselhos, risadas e pelas técnicas compartilhadas comigo, foram essenciais para a elaboração deste projeto. Também agradeço a Cláudia Abreu, por todas as conversas e trocas de conhecimento na bancada e durante os longos períodos no infectório. Agradeço a Derciliano Cruz, por todas as conversas, suporte e momentos de descontração na bancada.

Agradeço aos meus pais, Núbia e Gerson, que lutaram muito diariamente, e estão sempre ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões mesmo em momentos difíceis e, acima de tudo, por me incentivarem a seguir meus sonhos. Agradeço também a minha irmã, Juanna, por torcer sempre por mim e estar sempre comigo, mesmo que me estresse na maioria das vezes, mas sempre me tira várias risadas.

Agradeço aos meus avós, Marli e Givaldo, agradeço por toda sabedoria, orações e todo amor para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço também a minha tia, Geisa, que mesmo em outro país, sempre me apoiou e me aconselhou nos meus sonhos.

As minhas amigas de Graduação, agradeço por todas as risadas e momentos estressantes durante todos esses anos de formação. Foi maravilhoso poder concluir este curso e ter tido vocês como companheiras diárias nessa jornada.

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição para o crescimento do trabalho.

Agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE, todo suporte físico e estrutural disponibilizado e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

E agradeço a Deus, que me concedeu a capacidade, a força para iniciar e concluir com excelência este ciclo.

COUTO, Maria Júlia. **Avaliação da transmissão vertical em amostras de mosquitos alimentados artificialmente com os vírus Zika e Chikungunya**. 2024. 70.Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

Existem mais de 150 arbovírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae* que provocam doenças em humanos. Dentre esses, três vírus são particularmente relevantes no Brasil: Chikungunya (CHIKV), da família *Togaviridae*, e os vírus Dengue (DENV) e Zika (ZIKV), que pertencem à família *Flaviviridae*. Esses arbovírus são geralmente transmitidos por mosquitos *Aedes spp.*, embora *Cx. quinquefasciatus* também possa permitir a sua multiplicação com a possibilidade de participação na transmissão de ZIKV. Para compreender o papel de uma espécie de mosquito como vetor desses vírus, é crucial entender a biologia do mosquito e a dinâmica de transmissão na população vetora. As principais formas de transmissão estudada são a horizontal, em que insetos infectados transmitem o vírus para hospedeiros suscetíveis ao realizarem o repasto sanguíneo, e a transmissão transovariana (TT) ou vertical (TV). Nesse último caso, as fêmeas infectadas transmitem o vírus para sua prole. A hipótese é que a TV seja responsável por manter os arbovírus circulando na natureza, mesmo em períodos inter-epidêmicos. Apesar da TV ser identificada para DENV, CHIKV e ZIKV os resultados ainda são conflitantes. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a transmissão vertical de CHIKV e ZIKV em populações de *Aedes aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* sob condições controladas em laboratório. Diante disso, foram realizadas alimentações artificiais com ambos os vírus acima descritos, utilizando os mosquitos *Ae. aegypti* oriundos da linhagem estabelecida em laboratório (RecLab) e *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab). Em média, foram utilizados 100 fêmeas e 50 machos para alimentação com o vírus. Para o grupo controle (alimentado sem vírus) foram separados 50 fêmeas e 15 machos. No 7º e 14º dia pós alimentação, foram coletados de 15 a 25 fêmeas do grupo teste para avaliação da taxa de infecção populacional. No experimento com ZIKV, as taxas de infecção no 7º e 14º dpi foram, respectivamente, de 62% e 60% para *Ae. aegypti*, e de 12% e 40% para *Cx. quinquefasciatus*. Já nos experimentos com CHIKV, a taxa de infecção em *Ae. aegypti* foi de 100% em ambos os dias, enquanto que em *Cx. quinquefasciatus* foi de 40% no 7º dpi e de 0% no 14º dpi. Em seguida, os adultos advindos da geração F1 foram avaliados para a presença do vírus por plaqueamento em células VERO e RT-qPCR a fim de determinar a taxa de transmissão vertical. Como resultado, considerando ZIKV em *Ae. aegypti* foram obtidos 25/58 *pools* positivos (MIR = 43,1%) e para *Cx. quinquefasciatus* 24/53 *pools* positivos (MIR = 45,2%). Já nos experimentos com CHIKV, 34/60 *pools* foram positivos em *Ae. aegypti* (MIR = 56,7%) e em *Cx. quinquefasciatus* todos os *pools* foram negativos (total de 20 *pools*). Nossos resultados sugerem que a TV do ZIKV pode ser um fenômeno comum em ambas as espécies estudadas. Com relação a CHIKV, os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram que a TV em *Ae. aegypti* pode ocorrer frequentemente. Em *Cx. quinquefasciatus*, não houve detecção viral na progênie F1, uma vez que esta espécie não é considerada vetor deste vírus. Portanto, esse tipo de transmissão pode ser um importante processo ecológico na manutenção de arboviroses na natureza, como demonstrado em condições controladas em laboratório.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Culex quinquefasciatus*; arbovírus; transmissão transovariana.

ABSTRACT

There are more than 150 arboviruses from the *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* and *Orthomyxoviridae* families that cause diseases in humans. Among these, three viruses are particularly relevant in Brazil: Chikungunya (CHIKV), from the *Togaviridae* family, and the Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses, which belong to the *Flaviviridae* family. These arboviruses are generally transmitted by *Aedes spp.* mosquitoes, although *Cx. quinquefasciatus* can also allow them to multiply, with the possibility of participating in the transmission of ZIKV. To understand the role of a mosquito species as a vector of these viruses, it is crucial to understand the biology of the mosquito and the transmission dynamics in the vector population. The main forms of transmission that have been studied are horizontal transmission, in which infected insects transmit the virus to susceptible hosts through blood transfusions, and transovarian (TT) or vertical transmission (VT). In the latter case, infected females transmit the virus to their offspring. The hypothesis is that VT is responsible for keeping arboviruses circulating in the wild, even during inter-epidemic periods. Although VT has been identified for DENV, CHIKV and ZIKV, the results are still conflicting. Therefore, the aim of this study is to evaluate the vertical transmission of CHIKV and ZIKV in populations of *Aedes aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* under controlled laboratory conditions. Therefore, artificial feedings with both viruses described above were carried out using *Ae. aegypti* mosquitoes from the laboratory-established strain (RecLab) and *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes (CqSLab). On average, 100 females and 50 males were used to feed the virus. For the control group (fed without virus), 50 females and 15 males were separated. On the 7th and 14th day after feeding, 15 to 25 females were collected from the test group to assess the population infection rate. In the ZIKV experiment, the infection rates on the 7th and 14th dpi were, respectively, 62% and 60% for *Ae. aegypti*, and 12% and 40% for *Cx. quinquefasciatus*. In the experiments with CHIKV, the infection rate in *Ae. aegypti* was 100% on both days, while in *Cx. quinquefasciatus* it was 40% on the 7th dpi and 0% on the 14th dpi. The adults from the F1 generation were then evaluated for the presence of the virus by plating on VERO cells and RT-qPCR in order to determine the vertical transmission rate. As a result, 25/58 positive pools were obtained for ZIKV in *Ae. aegypti* (MIR = 43.1%) and 24/53 positive pools for *Cx. quinquefasciatus* (MIR = 45.2%). In the experiments with CHIKV, 34/60 pools were positive in *Ae. aegypti* (MIR = 56.7%) and in *Cx. quinquefasciatus* all the pools were negative (total of 20 pools). Our results suggest that ZIKV VT may be a common phenomenon in both species studied. With regard to CHIKV, the results presented in this study showed that VT in *Ae. aegypti* can occur frequently. In *Cx. quinquefasciatus*, there was no viral detection in the F1 progeny, since this species is not considered a vector for this virus. Therefore, this type of transmission may be an important ecological process in the maintenance of arboviruses in nature, as demonstrated under controlled conditions in the laboratory.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Culex quinquefasciatus*; arbovirus; transovarian transmission.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da distribuição de arbovírus ao redor do mundo.	18
Figura 2	Gráfico da série histórica dos casos prováveis, sorotipos predominantes e óbitos por dengue, chikungunya e Zika – Brasil, 1986 a 2024	20
Figura 3	Mapa com a localização dos países/territórios que notificaram casos de Dengue desde março de 2023 e abril de 2024.	21
Figura 4	Mapa da distribuição global da infecção por ZIKV em humanos, incluindo grandes surtos anteriores a 2007 até 2018.	22
Figura 5	Mapa de distribuição espacial da microcefalia no Brasil, no período de junho de 2015 a março de 2016.	23
Figura 6	Organização do genoma de Flavivirus.	24
Figura 7	Organização do genoma de Alphavirus.	28
Figura 8	Mapa do mundo mostrando a disseminação das linhagens CHIKV e os mosquitos vetores dominantes <i>Aedes</i> .	29
Figura 9	Ilustração representando os sintomas provocados por CHIKV.	30
Figura 10	Esquema representando o ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> .	32
Figura 11	Fêmea do mosquito da espécie <i>Aedes aegypti</i> .	33
Figura 12	Fêmea do mosquito da espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> .	34
Figura 13	Três modos importantes de manutenção e amplificação de arbovírus envolvendo transmissão horizontal, vertical e venérea	37
Figura 14	Infecção e disseminação por arbovírus dentro de um mosquito.	38
Figura 15	Esquema da alimentação artificial via oral com ZIKV em populações de mosquitos.	43

Figura 16	Ilustração representando as alimentações artificiais de cada grupo analisado e suas respectivas coletas.	44
Figura 17	Gráfico da taxa de infecção populacional do ZIKV em <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> .	49
Figura 18	Captura da visualização ao microscópio invertido de diferentes poços de uma placa de cultura de 96 contendo células VERO inoculadas com amostras de mosquitos da espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> (F1) infectados com ZIKV.	50
Figura 19	Gráfico da taxa de infecção mínima para ZIKV detectado em amostras da geração F1 de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> de laboratório.	51
Figura 20	Gráfico da taxa de infecção populacional do CHIKV em <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> .	53
Figura 21	Captura da visualização ao microscópio invertido de diferentes poços de uma placa de cultura de 96 contendo células VERO inoculadas com amostras de mosquitos da espécie <i>Ae. aegypti</i> (F1) infectados com CHIKV.	54
Figura 22	Gráfico da taxa de infecção mínima para CHIKV detectado em amostra da geração F1 de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> de laboratório.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Descrição das amostras positivas e taxas de infecção para o vírus ZIKV oriundas da infecção artificial de <i>Ae. aegypti</i> (RecLab) e <i>Cx. quinquefasciatus</i> (CqSLab). Resultados referentes a espécie <i>Ae. aegypti</i> incluem os dados do 1º e 2º experimento.	48
Tabela 2-	Taxa de infecção mínima (<i>minimum infection rate</i> - MIR) de mosquitos das espécies <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> expostos ao vírus Zika (ZIKV).	50
Tabela 3-	Descrição das amostras positivas e taxas de infecção para CHIKV oriundas da infecção artificial de <i>Ae. aegypti</i> (RecLab) e <i>Cx. quinquefasciatus</i> (CqSLab). Resultados obtidos a partir de um único experimento para ambas as espécies.	52
Tabela 4-	Taxa de infecção mínima (<i>minimum infection rate</i> - MIR) de mosquitos das espécies <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> expostos ao vírus Chikungunya (CHIKV).	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl	Microlitro
6K	<i>Structural protein 6K</i> – Proteína estrutural 6k
BFV	<i>Barmah Forest virus</i> - vírus da Floresta de Barmah
C	Capsídeo
Cm	Centímetro
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i> – Vírus Chikungunya
Cq	<i>Cycle quantification</i> – Ciclo de quantificação
DENV	<i>Dengue virus</i> – Vírus Dengue
dpi	Dias pós-infecção
E	Envelope
EC	Efeito citopático
ECSA	<i>East/Central/South African genotype</i> - Genótipo Leste/Centro/Sul Africano
EEEV	<i>Eastern equine encephalitis virus</i> - vírus da encefalite equina oriental
E1	<i>Structural protein E1</i> - Proteína estrutural E1
E2	<i>Structural protein E2</i> - Proteína estrutural E2
E3	<i>Structural protein E3</i> - Proteína estrutural E3

GBS	Síndrome de Guillain Barré
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
JEV	<i>Japanese Encephalitis virus</i> - vírus da Encefalite Japonesa
kb	Kilobases
L1	Larva de primeiro estágio
L-15	Leibovitz
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
L4	Larva de quarto estágio
M	Molar
MAYV	<i>Mayaro virus</i> – vírus Mayaro
MEB	<i>Midgut Escape Barrier</i> - Barreira de escape do intestino médio
MEM	<i>Minimum Essential Media</i> – Meio mínimo essencial
MIB	<i>Midgut Infection Barrier</i> - Barreira de infecção do intestino médio
MIR	<i>Minimum Infection Rate</i> - Taxa de infecção mínima
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MVEV	<i>Murray Valley encephalitis virus</i> - vírus da encefalite de Murray Valley
NB2	Nível de Biossegurança 2
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – Multiplicidade de infecção
NSP1	<i>Non structural protein P1</i> – proteína não estrutural P1
NSP2	<i>Non structural protein P2</i> – proteína não estrutural P2
NSP3	<i>Non structural protein P3</i> – proteína não estrutural P3
NSP4	<i>Non structural protein P4</i> – proteína não estrutural P4
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONNV	<i>O'nyong-nyong virus</i> – vírus O'nyong-nyong
OROV	<i>Oropouche virus</i> - vírus Oropouche
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> –Reação em cadeia da polimerase
PF	Polinésia Francesa
PFU	<i>Plaque forming unit</i> - Unidades formadoras de placa
PIE	Período de Incubação Extrínseco
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto

RT-PCR	<i>Reverse transcription Polymerase Chain Reaction</i> –Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
RT-qPCR	<i>Reverse transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> - <i>Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa</i>
RVFV	<i>Rift Valley fever virus</i> - vírus da febre do vale Rift
SE	Semana Epidemiológica
SEB	<i>Salivary Gland Escape Barrier</i> - Barreira de escape de glândula salivar
SIB	<i>Salivary Gland Infection Barrier</i> - Barreira de infecção da glândula salivar
SCZ	Síndrome congênita do vírus Zika
WEEV	<i>Western equine encephalitis virus</i> - vírus da encefalite equina ocidental
WNV	<i>West Nile virus</i> – vírus do Oeste do Nilo
YFV	<i>Yellow Fever virus</i> – vírus da Febre Amarela
ZIKV	<i>Zika virus</i> – vírus Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	ARBOVÍRUS EMERGENTES E REEMERGENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA	18
2.1.1	Vírus Zika (ZIKV)	21
2.1.1.1	Epidemiologia	21
2.1.1.2	Estrutura do vírus	24
2.1.1.3	Origem filogenética	24
2.1.1.4	Patogênese e manifestações clínicas	25
2.1.2	Vírus Chikungunya (CHIKV)	26
2.1.2.1	Epidemiologia	26
2.1.2.2	Estrutura do vírus	27
2.1.2.3	Origem filogenética	28
2.1.2.4	Patogênese e manifestações clínicas	29
2.2	MOSQUITOS VETORES: ASPECTOS BIOLÓGICOS	31
2.2.1	<i>Aedes aegypti</i>	32
2.2.2	<i>Culex quinquefasciatus</i>	34
2.3	MECANISMO DE TRANSMISSÃO DE ARBOVÍRUS	35
2.3.1	Transmissão horizontal	37
2.3.2	Transmissão venérea	38
2.3.3	Transmissão vertical	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	METODOLOGIA	41
4.1	PROPAGAÇÃO DOS VÍRUS EM CÉLULAS VERO	41
4.2	AMOSTRAGEM DOS MOSQUITOS PARA INFECÇÃO ARTIFICIAL EM LABORATÓRIO	41
4.3	INFECÇÃO ORAL DOS MOSQUITOS PARA AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM LABORATÓRIO	42

4.4	TITULAÇÃO POR ENSAIO DE PLACA	44
4.5	ISOLAMENTO VIRAL	45
4.6	EXTRAÇÃO DE RNA E RT-qPCR	46
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	47
5	RESULTADOS	48
5.1	TAXA DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DE ZIKV EM <i>Aedes aegypti</i> (RECLAB) E <i>Culex quinquefasciatus</i> (CQSLAB)	48
5.2	TAXA DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DE CHIKV EM <i>Aedes aegypti</i> (RECLAB) E <i>Culex quinquefasciatus</i> (CQSLAB)	51
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

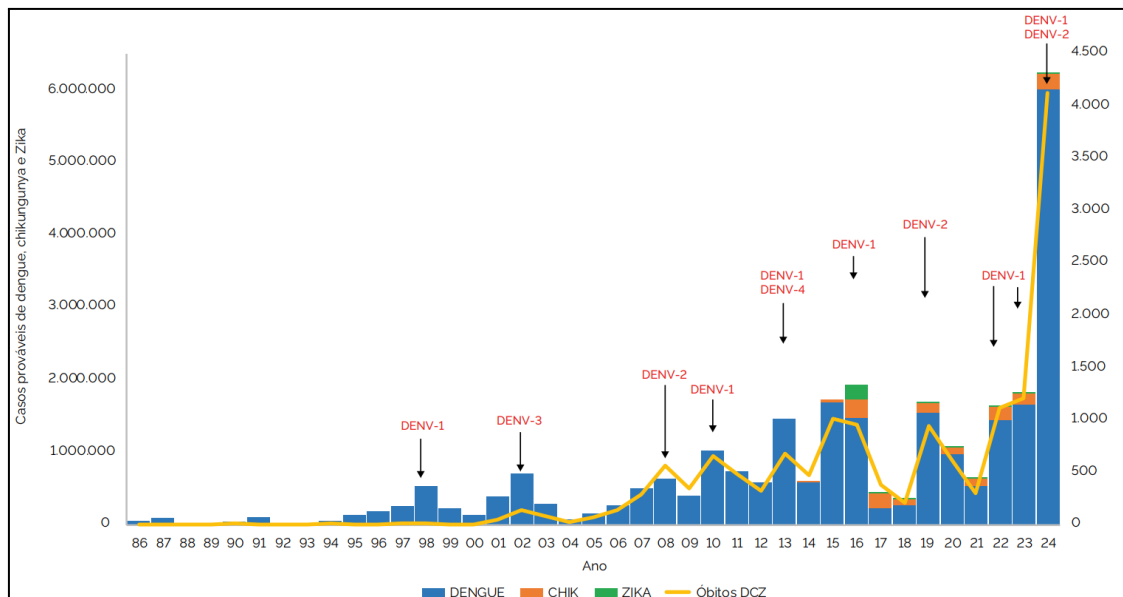
1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, infecções causadas por arbovírus têm sido motivo de preocupação por gestores da saúde pública de vários países. Mais de 150 arbovírus pertencentes às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, e *Orthomyxoviridae* estão associados a doenças em humanos (Lopes; Nozawa; Linhares, 2014). Dentre essas famílias, é possível destacar *Togaviridae* (vírus Chikungunya - CHIKV) e *Flaviviridae* (vírus Zika - ZIKV e Dengue - DENV). Esses três vírus circulam simultaneamente em diversas regiões, incluindo o Brasil, sendo DENV considerado o principal arbovírus reemergente em regiões tropicais e subtropicais (Carvalho; Souza, 2016). DENV é o agente patogênico causador de uma das mais importantes doenças virais transmitidas por mosquitos em humanos, o que fez com que a Organização Mundial da Saúde o nomeie como uma das dez principais ameaças à saúde global em 2019. Com as infecções globais aumentando nas últimas décadas, a dengue afeta mais de 80 países com uma estimativa de cerca de 100 a 400 milhões de casos relatados todos os anos (World Health Organization, 2024). No Brasil, a fragilidade dos programas de controle de dengue contribuíram para a introdução e disseminação de novos arbovírus no país, como CHIKV em 2014 e ZIKV em 2015 (Fernández-Salas *et al.*, 2015; Zanluca *et al.*, 2015). É importante apontar que, além das falhas nos programas de controle da doença, outros fatores podem também ter contribuído para a introdução e co-circulação viral, tais como: alterações climáticas propícias à dispersão de vetores, condições socioeconômicas, urbanização descontrolada, entre outros (Carvalho; Souza, 2016). O boletim epidemiológico da Secretaria Estadual de Saúde correspondente ao período de dezembro de 2023 a setembro de 2024 divulgou 29.815 casos prováveis de dengue em Pernambuco. O estado também registrou 4.758 casos prováveis de chikungunya, sendo 1.404 deles já confirmados. Considerando a Zika, foram contabilizados 254 casos prováveis em Pernambuco (Brasil, 2024). Já nas semanas epidemiológicas (SE) 1 a 23 de 2024, foram notificados 8.519 casos prováveis de Zika no Brasil, com coeficiente de incidência 4,2 casos/100 mil habitantes. Em relação à Dengue, também no mesmo período, foram identificados 4.269 casos de óbito e 6.215.201 casos prováveis. Para CHIKV, foram identificados 233.225 casos prováveis no país (“Boletim Epidemiológico - Volume 55 - no 11 — Ministério da Saúde”, 2024). Sendo assim, a falta de uma vacina para ZIKV e CHIKV comercialmente disponível para a população em geral, além de medicamentos licenciados para terapia específica, faz com que o controle vetorial seja a principal forma de combate a estes arbovírus (Lopes; Nozawa; Linhares, 2014).

Para um controle vetorial eficiente faz-se necessário a compreensão *a priori* de alguns aspectos da biologia do vetor tais como, fecundidade, fertilidade, longevidade, duração do ciclo gonadotrófico, custo biológico da infecção em espécies vetoras e ciclo de transmissão viral do mosquito vetor. Dentre os mecanismos de transmissão vetorial de arbovírus, destacam-se a transmissão horizontal (homem-vetor-homem) e a transmissão vertical ou transovariana (TV), que juntas são consideradas essenciais para a sobrevivência de patógenos virais em seus habitats (Costa *et al.*, 2018; Higgs; Beaty, 2005). Na transmissão vertical, as fêmeas infectadas podem transmitir o vírus para a progênie e, desta maneira, parte da prole já nasce infectada. A hipótese é que este mecanismo seja responsável pela manutenção dos vírus na natureza, mesmo durante os períodos inter-epidêmicos ou em situações ambientais adversas (Agarwal *et al.*, 2014). Este mecanismo possibilita que o vírus permaneça em uma localidade específica quando, por exemplo, a maioria dos potenciais hospedeiros vertebrados está imune (Thangamani *et al.*, 2016; Smartt *et al.*, 2017). Este mecanismo já é bem descrito para DENV em estudos experimentais ou em ciclos naturais através da coleta de mosquitos infectados em campo (Cecílio, 2015; Dzul-Manzanilla *et al.*, 2016; Ferreira-de-Lima *et al.*, 2020; Guedes *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2014; Vilela *et al.*, 2010). Para CHIKV, TV também já foi avaliada tanto em estudos de campo no Kenya (Heath *et al.*, 2020), na Índia (Jain *et al.*, 2016) e no Brasil (Granger Neto *et al.*, 2022) para *Ae. aegypti*, quanto em experimentos de laboratório para *Ae. aegypti* (Agarwal *et al.*, 2014; Chompoosri *et al.*, 2016) e para *Ae. albopictus* (Chompoosri *et al.*, 2016; Honório *et al.*, 2019). Para ZIKV, estudos experimentais demonstraram sua capacidade de transmissão vertical nas espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Ciota *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2016; Zimler; Alto, 2023), além da espécie *Culex quinquefasciatus* (Phumee *et al.*, 2019), com resultados estatísticos variados, uma vez que as populações de mosquitos e as linhagens virais variam de acordo com a região. Sendo assim, este projeto teve como objetivo estudar a transmissão vertical de CHIKV e ZIKV em populações de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* alimentadas com os vírus de forma artificial. Essa proposta é de extrema relevância, pois possibilita a compreensão de como esse mecanismo de transmissão pode ser responsável por manter os vírus circulando na natureza, mesmo durante os períodos interepidêmicos para que possamos ser eficientes na redução do grande impacto provocado por eles.

No contexto epidemiológico brasileiro, os arbovírus de maior circulação são DENV, CHIKV e OROV, enquanto ZIKV apresenta uma circulação menos frequente, ainda que existam outros com potencial de disseminação no País (Donalisio; Freitas; Zuben, 2017; Ribeiro; Fernandes, 2024). Sendo assim, foi entre os anos de 2015 - 2016 que o país sofreu com a tríplice epidemia de DENV, ZIKV e CHIKV, sendo importante relatar que muitos casos de Zika foram notificados muitas vezes de forma errônea, devido a frequência de casos de Dengue ocorrendo desde 2013 (Brito; Cordeiro, 2016). Diante disso, o acompanhamento epidemiológico realizado durante os anos seguintes detectaram que em 2016, foram registrados no Brasil quase 1,5 milhões de casos prováveis de Dengue, aproximadamente 272 mil casos prováveis de febre Chikungunya e cerca de 215 mil de Zika. Já em 2017, foram notificados mais de 252 mil casos prováveis de dengue, 185.737 da febre Chikungunya e 17.452 de febre pelo vírus Zika no país. Enquanto que em 2018, número de casos de dengue variou pouco em relação ao ano anterior (265.934), com diminuição significativa dos casos prováveis de chikungunya (87.687) e Zika (8.680) no Brasil (Brasil, 2017; Brasil, 2018; Brasil, 2019). Em 2024, da SE 1 a 39, a região Sudeste obteve o maior número de casos prováveis para Dengue, com 4.097.651, e a segunda maior região foi a Sul, com 1.198.964 casos e a terceira foi a Centro-Oeste com 656.897 casos prováveis (Situação Epidemiológica Dengue SE 1 a 39, 2024). Nesse contexto, o Brasil vem enfrentando epidemias de dengue conforme pode ser observado na série histórica da Figura 2 associadas à alternância do sorotipo predominante.

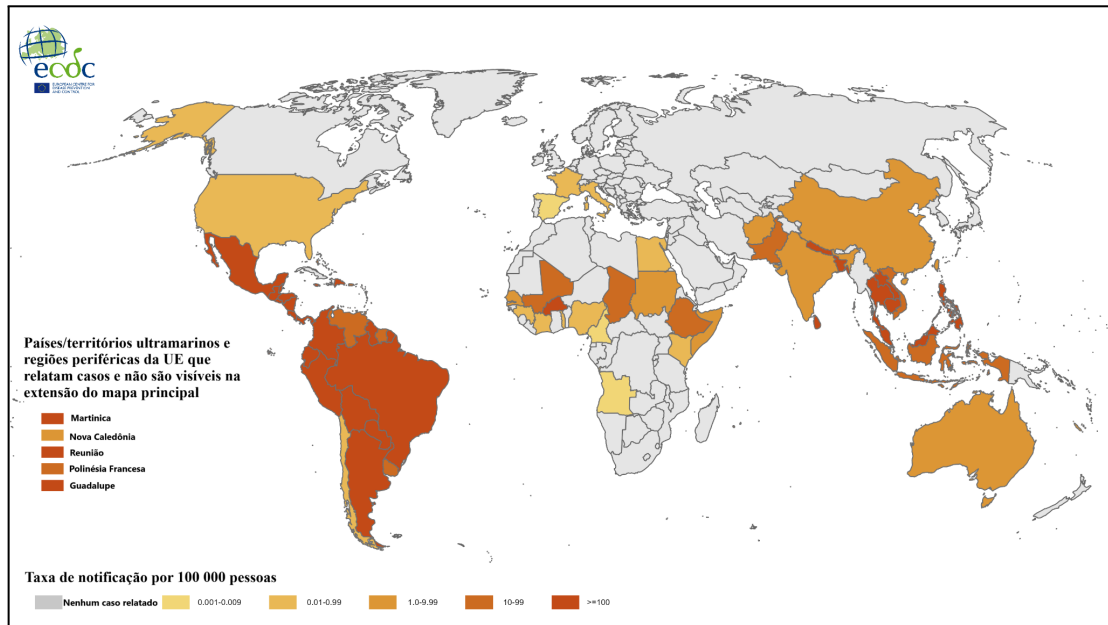
Figura 2: Gráfico da série histórica dos casos prováveis, sorotipos predominantes e óbitos por dengue, chikungunya e Zika – Brasil, 1986 à 2024.



Fonte: Brasil, 2024.

Assim, a constante circulação dos arbovírus, as prováveis consequências da disseminação desses vírus e os riscos à saúde mundial devido a sua expansão geográfica, desperta interesse em conhecer as características de seus vetores (Paixão; Teixeira; Rodrigues, 2018). A junção de fatores que levam ao surgimento e surto de vários arbovírus são fundamentais para compreender o risco associado a epidemias e como ele pode ser mitigado. Nesse contexto, muitos arbovírus são ignorados, mesmo com seu amplo potencial de expansão. Além disso, tendem a se espalhar conforme as características do ambiente, aquecimento global, urbanização, globalização descontrolada e alterações da genética viral que favorecem a proliferação desses vetores (Powers *et al.*, 2000; Weaver; Reisen, 2010; Franklins *et al.*, 2019). Diante das mudanças climáticas foi reportado por alguns estudos a expansão da dengue em países do Hemisfério Norte e Europa (Figura 3). Devido ao aquecimento global, responsável por elevar as temperaturas em regiões onde o clima é majoritariamente frio, tornando o ambiente propício para acelerar o ciclo de desenvolvimento do mosquito, assim aumentando a quantidade populacional e o número de pessoas infectadas (Semenza; Rocklöv; Ebi, 2022; European Centre For Disease Prevention and Control, 2024).

Figura 3: Mapa com a localização dos países/territórios que notificaram casos de Dengue desde março de 2023 e abril de 2024.



Fonte: ECDC, (2024) - Traduzido pela autora.

2.1.1 Vírus Zika (ZIKV)

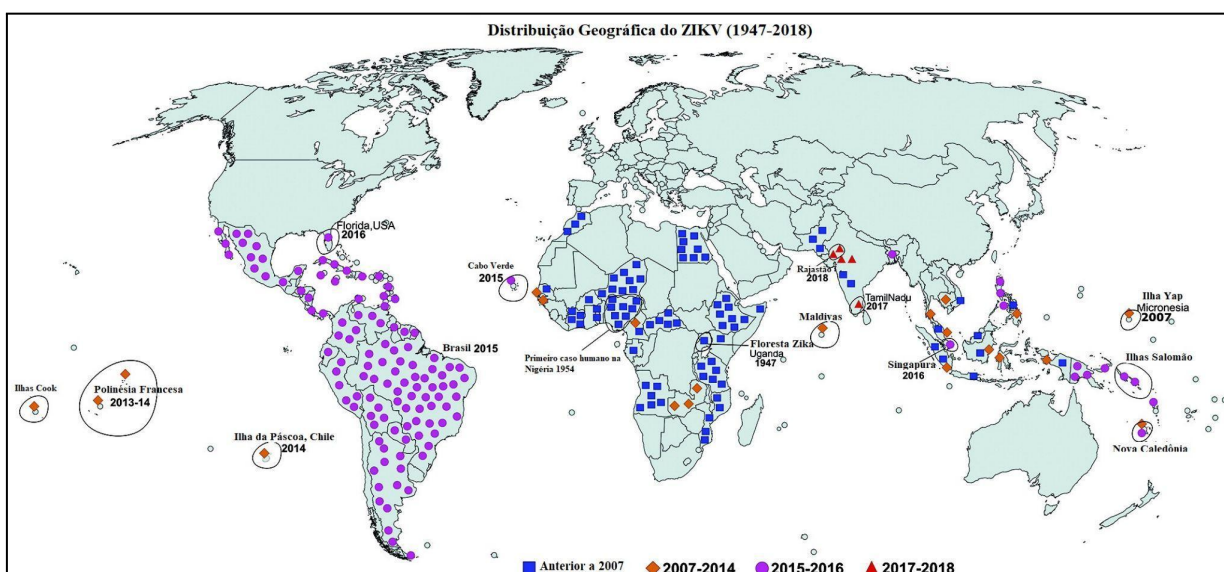
A infecção causada por ZIKV teve seu pico epidêmico no mundo entre os anos de 2015 e 2016, com registros de 37.011 e 216.207 casos suspeitos da infecção no Brasil, respectivamente (Brasil, 2021). Desta maneira, a doença passou a ser uma grave preocupação em diferentes partes do mundo e tornou-se uma emergência de saúde pública de importância internacional, em razão das complicações neurológicas graves como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e em casos de gestantes podendo provocar Síndrome congênita do vírus Zika (SCZ) (Pielnaa *et al.*, 2020).

2.1.1.1 Epidemiologia

ZIKV foi detectado pela primeira vez, em 1947, durante um estudo do vírus da Febre amarela (YFV) na floresta Zika, a partir de uma amostra de sangue de um macaco rhesus (*Macaca mulatta*), nas regiões africanas, especificamente em Kampala, Uganda. Em 1948, foi encontrado nos mosquitos *Ae. africanus*, também no mesmo local onde houve o primeiro isolamento (Chan *et al.*, 2016; Dick; Kitchen; Haddow, 1952). Em 1953, foi isolado do soro de um humano na Nigéria, apresentando dor de cabeça e febre (Macnamara, 1954).

Durante as décadas seguintes, ZIKV permaneceu restrito aos continentes da África e Ásia, causando surtos eventualmente (Figura 4). Porém, em 2007, foi relatado na Ilha de Yap, Estados Federados da Micronésia, no oeste do Oceano pacífico o primeiro grande surto, ocasionando uma infecção em aproximadamente 75% da população total da região (Duffy *et al.*, 2009). Posteriormente a este episódio, ZIKV foi identificado como potencial arbovírus emergente em todo o mundo. Em 2013-2014, o vírus conseguiu atingir e se difundir no Oceano pacífico e causou um surto na Polinésia Francesa (PF), resultando em uma epidemia com 19.000 casos suspeitos e 284 casos confirmados da doença. Estima-se que 11% da população total da região apresentaram os sintomas (Cao-Lormeau *et al.*, 2014; Musso; Gubler, 2016). Os primeiros casos da doença nas Américas ocorreram em fevereiro de 2014 na Ilha de Páscoa que talvez tivessem relação com o surto na Micronésia e na PF, o qual foi registrado 50 casos confirmados (Musso; Gubler, 2016).

Figura 4: Mapa da distribuição global da infecção por ZIKV em humanos, incluindo grandes surtos anteriores a 2007 até 2018.



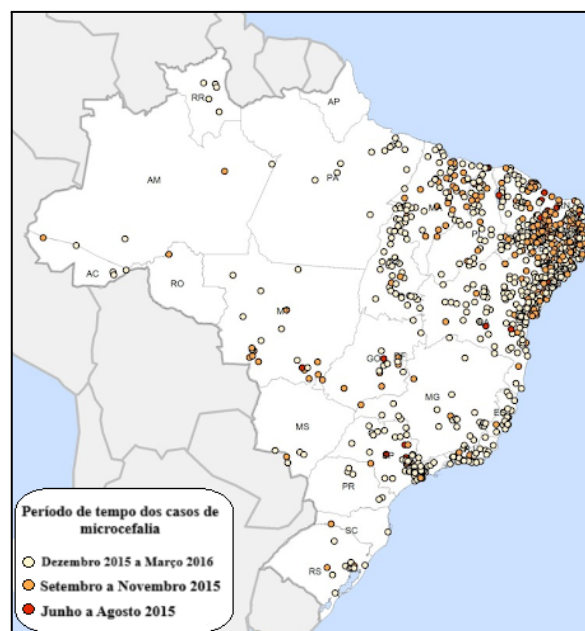
Fonte: Sharma *et al.*, (2020) - Traduzido pela autora.

No Brasil, a epidemia de Zika teve início meses após a copa do mundo (2014) com casos da doença aparecendo nas regiões Norte e Nordeste. Em 2015, no estado do Rio Grande do Norte, alguns pacientes foram investigados por um infectologista, com “síndrome semelhante à dengue”. A partir dos achados laboratoriais, ao realizarem o teste de RT-PCR para ZIKV, obtiveram oito pacientes positivos para o vírus, confirmados por sequenciamento de DNA (Zanluca *et al.*, 2015). Em abril de 2013, durante um surto de dengue no Rio de

Janeiro (RJ), foram analisadas 210 amostras de pacientes febris e três delas foram positivas para o vírus Zika. Sendo, então, considerado o primeiro surto de ZIKV no RJ, com pico de transmissão em maio de 2015 (Passos *et al.*, 2017). Em novembro do mesmo ano, o Ministério de Saúde declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (Portaria MS nº 1813/2015).

A primeira associação do vírus Zika com distúrbios neurológicos, como a Síndrome de Guillain Barré (GBS) ocorreu em 2013, a partir dos surtos na Polinésia Francesa (Musso; Gubler, 2016). Em território brasileiro, no ano de 2016, foram registrados nos estados da Bahia 30.266 casos de infecção pelo ZIKV, deste total 155 apresentaram GBS (Barbi *et al.*, 2018). Além disso, houve um aumento súbito e preocupante de casos de SCZ no Nordeste do Brasil (Figura 5), o qual impulsionou diversas pesquisas a descobrirem a relação deste aumento com os casos de Zika elevado no país (Coelho e Crovella, 2017). No Estado de Pernambuco, 2155 casos de microcefalia foram notificados entre 1º de agosto de 2015 e 15 de outubro de 2016, dos quais 988 atenderam aos padrões InterGrowth da OMS para microcefalia (SES-PE, 2016).

Figura 5: Mapa de distribuição espacial da microcefalia no Brasil, no período de junho de 2015 a março de 2016.



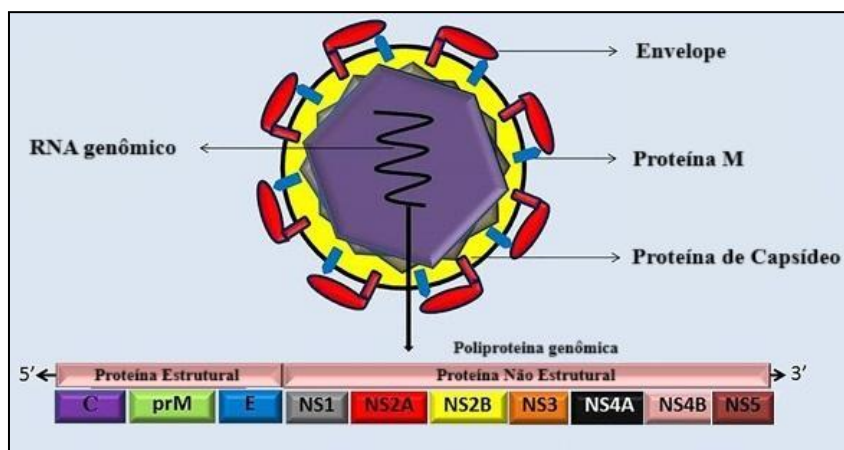
Fonte: Peiter *et al.*, (2020) - Traduzido pela autora.

Além do Brasil, ZIKV se espalhou rapidamente por outras áreas da América seguindo de outros 47 países incluindo Haiti, Honduras, Venezuela e Colômbia. Todas essas regiões declararam transmissão autóctone e também em algumas áreas houve aumento dos casos de SCZ e outros defeitos congênitos associados a ZIKV e a epidemia esteve sob estado rigoroso nas principais agências de saúde pública do mundo durante este período (Chinazzi *et al.*, 2020).

2.1.1.2 Estrutura do vírus

ZIKV pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Orthoflavivirus*, é um vírus de RNA de sentido positivo de fita simples. Seu genoma é composto de aproximadamente 10,7 kb de comprimento, da mesma maneira que os outros vírus que pertencem à família. O genoma do vírus foi dividido a partir da análise de sua estrutura genômica (Figura 6) em dois segmentos principais sendo eles, sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e em três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), proteína do envelope (PrE) e proteína pré-membrana (PrM) (Pielnaa *et al.*, 2020).

Figura 6: Organização do genoma de Flavivirus.



Fonte: Javed *et al.*, (2017) - Traduzido pela autora.

2.1.1.3 Origem filogenética

A investigação da origem filogenética demonstra que ZIKV pode ser classificado em duas linhagens, a africana e asiática, no qual as duas surgiram da África Oriental entre o final

de 1800 ou início de 1900. Em seguida, os casos foram identificados por meio de sistemáticas de sequenciamento (Gatherer; Kohl, 2016; Lanciotti *et al.*, 2008). Diante disso, com as análises filogenéticas, foi possível estimar a data de emergência e seu espalhamento, ou seja, a linhagem asiática teve origem com a migração do vírus da África para o Sudeste Asiático. Posteriormente, foi observado o espalhamento para Yap, Polinésia Francesa e em seguida para as Américas (Plourde; Bloch, 2016).

2.1.1.4 Patogênese e manifestações clínicas

A forma comumente encontrada para o início do ciclo de patogênese de Zika é através da picada de fêmeas de mosquitos em humanos infectados. Posteriormente, o vírus inicia sua replicação nas células epiteliais do intestino médio, e vai para as glândulas salivares do mosquito, ou seja, após o período de incubação de 10 dias, o mosquito torna-se capaz de transmitir o vírus através da saliva (Mwaliko *et al.*, 2021). Diante disso, a infecção causada por ZIKV em humanos, inicia-se após picada de um mosquito infectado, o vírus supostamente começa a replicação nas células dendríticas e queratinócitos da pele, em seguida espalhando-se para diversas partes do corpo pela corrente sanguínea (Lazear; Stringer; de Silva, 2016). O período de incubação de ZIKV em humanos é de 3 a 12 dias e os sintomas podem aparecer após um período de 6 a 11 dias, sendo que a maioria das infecções é assintomática. No entanto, os casos sintomáticos na maioria das vezes relatam febre entre 37,4°C-38,0°C, dor articular, olhos vermelhos, tontura, mal-estar, anorexia, cefaleia e exantema maculopapular que duram aproximadamente 14 dias (Musso; Nilles; Agumadu *et al.*, 2018; Lazear *et al.*, 2016).

As manifestações clínicas do ZIKV em indivíduos que não apresentam comorbidades são bastante semelhantes com os sinais e sintomas da chikungunya e dengue (Musso; Nilles; Agumadu *et al.*, 2018). Porém, em estudos de casos durante os surtos epidêmicos foram identificadas sequelas clínicas mais graves como danos neuropatológicos, incluindo meningite, meningoencefalite e Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Além disso, a infecção congênita por ZIKV apresenta aumento das malformações do sistema nervoso central (SNC), como é o caso da microcefalia em fetos. Outros danos não neurológicos incluem perda auditiva transitória, hipotensão e sintomas geniturinários (Plourde; Bloch, 2016).

2.1.2 Vírus Chikungunya (CHIKV)

Vírus Chikungunya é transmitido por espécies de mosquito *Aedes* e causa surtos periódicos principalmente em regiões tropicais (Silva; Dermody, 2017). A doença já possui 3,7 milhões de casos em 50 países distintos, entre 2013 e 2023. O Brasil, desde 2016, é conhecido como o epicentro das epidemias de CHIKV nas Américas, com 1,6 milhões de casos registrados (Souza *et al.*, 2024). Além disso, o vírus é responsável por causar artralgia aguda e crônica incapacitante, além de distúrbios neurológicos a longo prazo. Diante disso, nos últimos anos tem-se aumentado a busca dedicada ao desenvolvimento de medicamentos e imunização eficientes para CHIKV, mas nenhum tratamento específico conseguiu ser licenciado atualmente (De Lima Cavalcanti *et al.*, 2022). Dessa forma, a doença é uma grave preocupação para o sistema público de saúde por trazer malefícios duradouros para vida de vários pacientes (De Lima Cavalcanti *et al.*, 2022; Wang; Zhang, 2019).

2.1.2.1 Epidemiologia

CHIKV foi isolado pela primeira vez do soro de um paciente em 1952, ao longo da fronteira entre a Tanzânia e Moçambique, durante um grande surto de doença articular. Por ser um vírus que deixava os indivíduos infectados curvados e com movimentação limitada, passou a ser chamado pelo nome chikungunya pelo povo Makonde, o que significa “doença que dobra as articulações” (De Lima Cavalcanti *et al.*, 2022). Outros casos isolados foram detectados entre 1960 e 1980 em vários países da África Central e Austral, sendo os principais Senegal e Nigéria na África Ocidental. Além disso, a Ásia foi um local de casos frequentes de chikungunya, com o primeiro relato estabelecido em 1963 na Índia, em Calcutá e posteriormente em 1966 no Vietnã, onde o caso registrado de CHIKV foi relacionado à guerra local (Khongwichit *et al.*, 2021; Powers *et al.*, 2000).

Após décadas sem a circulação frequente do CHIKV, houve a ressurgência a partir de 2005 com relatos de grandes surtos na África, Ásia e Américas (Wang; Zhang, 2019). No período de 2005-2006, houve um surto explosivo de CHIKV no Sul da Índia, com mais de 1,4 milhões de infectados. Em seguida, a doença entrou em declínio no país no ano de 2014 (Lo Presti *et al.*, 2016). Já na Europa, a doença foi detectada pela primeira vez em 2007 na Itália, por transmissão autóctone, resultando em uma epidemia com cerca de 200 casos. Também

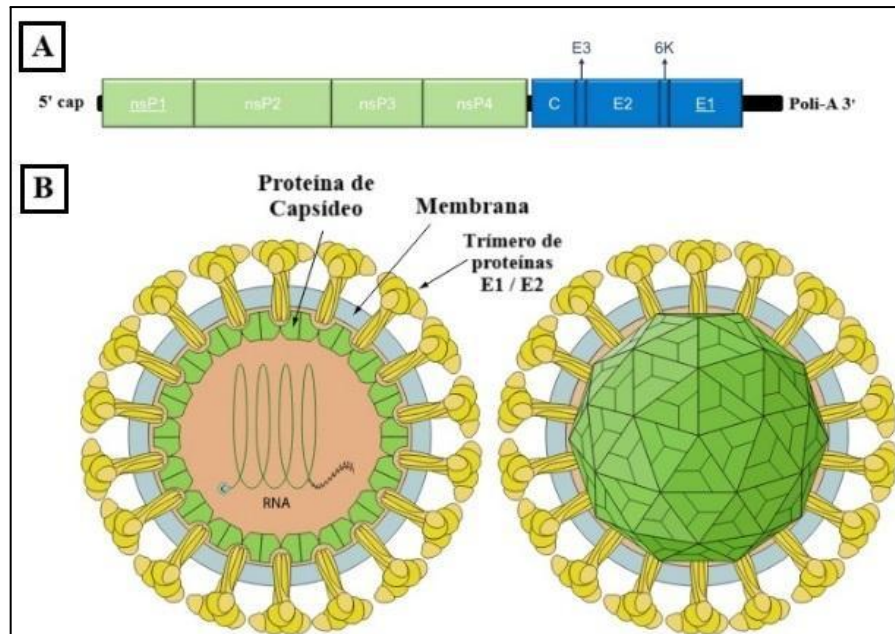
houve detecção na França com o aparecimento de dois casos em 2010, entrando em alerta de risco por ter um grande número de viajantes (Cassadou *et al.*, 2014; Khongwichit *et al.*, 2021).

Nas Américas, foram detectados os primeiros casos autóctones de CHIKV em novembro de 2013. Especificamente, na Ilha de Saint Martin, cinco moradores apresentaram febre com dores articulares. Posteriormente, CHIKV se espalhou para diversas ilhas do Caribe e Guiana Francesa com mais de 17.000 casos. No fim de 2014, as Américas registraram um total de 777.069 casos da doença (Cassadou *et al.*, 2014). Os primeiros casos autóctones de CHIKV no Brasil ocorreram em Oiapoque, no Estado do Amapá, em setembro de 2014. Logo depois, foi detectado na Bahia mais casos positivos e no fim do mesmo ano o Ministério da Saúde do Brasil obteve 682 casos confirmados no país (Nunes *et al.*, 2015).

2.1.2.2 Estrutura do vírus

CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* e possui um nucleocapsídeo icosaédrico envelopado que mede 65 a 70 nm de diâmetro. Contém um genoma de RNA de sentido positivo, com cerca de 12 Kb, é empacotado pelo núcleo do capsídeo e envolto por membrana derivada da célula hospedeira. O RNA genômico é constituído de 2 ORFs (*Open reading frame*) que codifica 3 proteínas estruturais (C, E1 e E2) na extremidade 3' e uma poliproteína não estrutural, clivada em NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4, localizada na extremidade 5', conforme mostra a figura 7 (Bartholomeeusen *et al.*, 2023; Khongwichit *et al.*, 2021).

Figura 7: Organização do genoma de Alphavirus



Fonte: Natrajan *et al.*, (2019) - Traduzido pela autora.

Legenda: **A-** Genoma de ZIKV; **5' cap-** Cap 5' 7-metilguanosina; **nsP1-** Proteína não estrutural P1; **nsP2-** Proteína não estrutural P2; **nsP3-** Proteína não estrutural P3; **nsP4-** Proteína não estrutural P4; **C-** Proteína do capsídeo; **E3-** Proteína estrutural E3; **E2-** Proteína estrutural E2; **6K-** Proteína estrutural 6k; **E1-** Proteína estrutural E1; **Poli-A 3'-** Cauda 3'-poli-A. **B-** Estrutura da partícula viral de ZIKV.

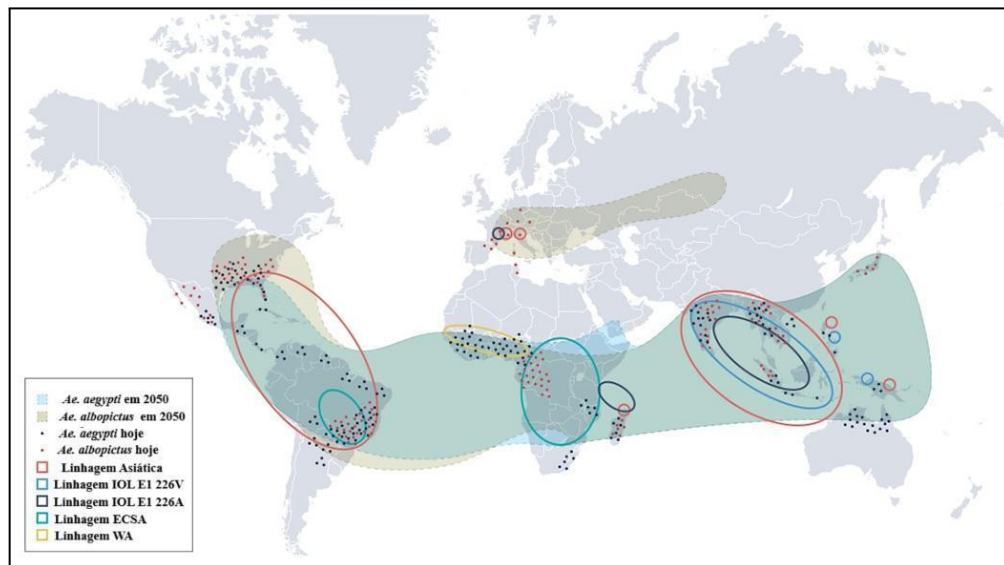
2.1.2.3 Origem filogenética

Desde 2004, CHIKV causa surtos esporádicos no cenário mundial infectando até 10 milhões de indivíduos ao longo dos anos. Diante disso, a partir de alguns estudos filogenéticos, foi possível explicar o caminho e sequência desse espalhamento global (Khongwichit *et al.*, 2021). Detectou-se quatro linhagens distintas relacionadas a suas origens geográficas (Figura 8): África Ocidental, África do Sul Centro-Oriental (ECSA), Ásia e Oceano Índico. A partir disso, desde sua descoberta em 1952, causou surtos esporádicos na África subsaariana. A linhagem ECSA é dividida em ECSA1 (sequências ancestrais de CHIKV), e ECSA2 (sequências da República Centro-Africana, Camarões, Gabão e República do Congo). Com o aumento dos casos no Quênia entre 2004 e 2005, a doença se espalhou rapidamente para diversas ilhas do Oceano Índico, Índia, Sri Lanka e Sudeste Asiático, resultando em milhões de pessoas infectadas. Assim, a responsável por esse surto no Oceano Índico foi a cepa de ECSA, a qual sofreu mutação adaptativa na glicoproteína E1. Posteriormente, acarretou em transmissão autóctone na Europa e Mediterrâneo (Gobbi *et al.*,

2015; Zeller; Van Bortel; Sudre, 2016).

A linhagem asiática foi responsável por proliferar a doença em grande parte das Américas, com mais de 50 países do continente sul-americano, com aproximadamente 1 milhão de infectados. Já no Brasil, a linhagem ECSA se sobressai e circula na região até os dias atuais (Cassadou *et al.*, 2014). Além disso, algumas mutações são responsáveis por favorecer o aumento na transmissão por mosquitos *Ae. albopictus* sem alterar a capacidade de infecção do vetor principal *Ae. aegypti*, como pode ser visto na mutação E1-A226V (Bartholomeeusen *et al.*, 2023; Tsetsarkin *et al.*, 2011).

Figura 8: Mapa do mundo mostrando a disseminação das linhagens CHIKV e os mosquitos vetores dominantes *Aedes*.



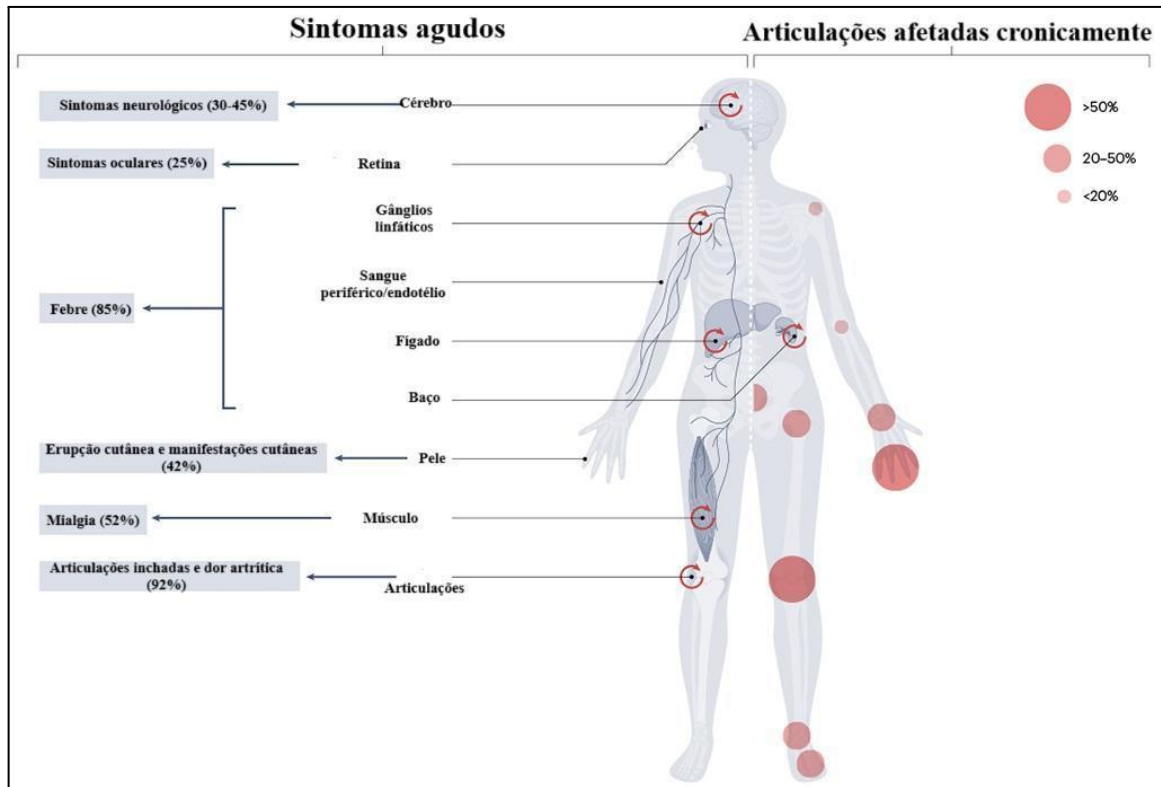
Fonte: Bartholomeeusen *et al.*, (2023) - Traduzido pela autora.

2.1.2.4 Patogênese e manifestações clínicas

A infecção por CHIKV ocorre a partir do repasto sanguíneo de um mosquito fêmea infectada, a qual carrega partículas virais através de sua saliva e ao serem depositadas na derme, vão se disseminar através da corrente sanguínea (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). O período de incubação do vírus no hospedeiro é consideravelmente curto variando de 3 à 7 dias, a maioria dos casos torna-se sintomático, com os sintomas mais frequentes sendo doença febril aguda ($>38,9^{\circ}\text{C}$) articulações inchadas e doloridas, erupção cutânea, cefaléia, mialgia e

dor nos olhos, conforme mostra a figura 9 (Khongwichit *et al.*, 2021; Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Contudo, alguns estudos avaliaram diversos casos de CHIKV e relataram que 3-25% dos indivíduos infectados são assintomáticos (Russo; Subissi; Rezza, 2020).

Figura 9: Ilustração representando os sintomas provocados por CHIKV.



Fonte: Bartholomeeusen *et al.*, (2023) - Traduzido pela autora.

De acordo com a duração dos sintomas, a infecção por CHIKV é dividida em três estágios. Na fase aguda, o paciente apresenta erupção cutânea, febre e dor articular, assim o início da doença é acompanhada por uma alta viremia, seguida de uma resposta inata elevada, cuja duração varia de aproximadamente 3 a 7 dias após a exposição ao vírus, estendendo-se até o 21º dia (Khongwichit *et al.*, 2021). Posteriormente, ocorre a fase pós-aguda que começa após as primeiras três semanas e se estende até o terceiro mês a partir do início da infecção. Por último, a fase crônica que acomete de 40% a 80% dos indivíduos e é estabelecida quando o paciente persiste com manifestações clínicas após o terceiro mês. Dessa forma, alguns motivos para desenvolver consequências crônicas após a infecção por CHIKV, são lesões teciduais que geram complicações prolongadas, condições articulares pré-existentes e a suscetibilidade genética (Khongwichit *et al.*, 2021; Vairo *et al.*, 2019).

Também existem evidências de doença neurológica associada ao vírus Chikungunya (Mehta *et al.*, 2018). As mais frequentes são encefalopatia e encefalite, mielopatia e mielite, síndrome de Guillain Barré, hipotonia neonatal e doença neuro-ocular. Além disso, os casos mais graves acometem neonatos, idosos e aquelas pessoas com comorbidades, como diabetes, doença hepática e renal crônicas (Vairo *et al.*, 2019).

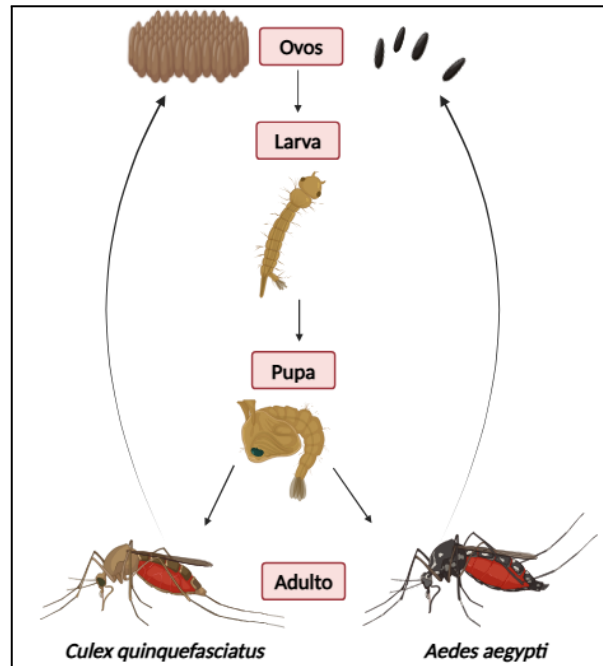
Nesse cenário frequente de circulação das arboviroses, considerando que os vírus ZIKV, CHIKV e DENV compartilham um vetor comum, condições climáticas e hospedeiros semelhantes (Paixão; Teixeira; Rodrigues, 2018). Torna-se notório que as dificuldades enfrentadas ao longo da epidemia da Dengue, pode ter favorecido a introdução de ZIKV e CHIKV no Brasil, como também a permanência da Dengue (Donalisio; Freitas; Zuben, 2017). Assim, diante dos desafios enfrentados no tratamento específico dessas doenças em conjunto com a falta de vacinas para Zika e Chikungunya, a medida fundamental para prevenção dessas doenças seria o controle vetorial, a partir do estudo da disseminação e biologia desses vetores (Paixão; Teixeira; Rodrigues, 2018).

2.2 MOSQUITOS VETORES: ASPECTOS BIOLÓGICOS

Os mosquitos podem ser reconhecidos como os animais mais mortais do mundo, por serem responsáveis pela transmissão de parasitas e vírus, as quais são responsáveis por mais de 700 milhões de infecções a cada ano (Cottis *et al.*, 2023). São considerados os principais vetores de arbovírus da atualidade e estão se espalhando globalmente, um fenômeno que tem sido favorecido pelas mudanças climáticas ao longo das décadas (Dusfour *et al.*, 2019).

As espécies de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, possuem um ciclo de vida complexo baseado em 4 estágios de vida (Figura 10) que consiste no estágio de ovo, larva (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto, e vão apresentar diferenças em seus habitats (Chouin-Carneiro; Santos, 2017). Os mosquitos machos e fêmeas alimentam-se de substâncias açucaradas, mas as fêmeas em específico realizam repasto sanguíneo em animais vertebrados para completar o processo de maturação de seus ovos (Consoli *et al.*, 1994).

Figura 10: Esquema representando o ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: A autora, criado no BioRender (2024).

2.2.1 *Aedes aegypti*

Ae. aegypti (Figura 11) é um dos principais vetores urbanos de diversas arboviroses de importância mundial, incluindo a DENV, CHIKV, ZIKV e vírus da febre amarela (Charrel *et al.*, 2014; Fauci; Morens, 2016; Kramer; Ciota, 2015). Esta espécie possui classificação taxonômica de ordem Diptera pertencente à família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Soares *et al.*, 2015). Morfologicamente, o mosquito é escuro e possui cerca de 4 a 7 mm, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira (Consoli; Oliveira, 1994).

Figura 11: Fêmea do mosquito da espécie *Aedes aegypti*.



Fonte: CDC (2012).

A forma ancestral silvática da espécie *Ae. aegypti* provavelmente é oriunda da África subsaariana, onde atualmente é conhecido pelo nome de subespécie, *formosus* (Powell; Tabachnick, 2013). Ao longo do tempo, a espécie sofreu uma adaptação conforme frequentava ambientes domésticos, onde as alterações antrópicas propiciaram sua proliferação, devido ao rápido crescimento da população humana, e do comércio internacional permitiu sua disseminação global (Kraemer *et al.*, 2019; Powers *et al.*, 2000). Acredita-se que na época do tráfico de escravos no período colonial do Brasil, houve a introdução da espécie *Ae. aegypti* no território que foi erradicado em 1955, devido ao aumento do combate do vetor da febre amarela. No entanto, como outros países da América não tiveram incentivo para combater a doença, o mosquito voltou a ser introduzido em 1967 no Brasil (Consoli; Oliveira, 1994). Além disso, a disseminação do vetor na Europa também teve auxílio do tráfego, das mudanças climáticas e o salto no avanço da globalização (Laporta *et al.*, 2023).

O comportamento deste vetor é endofílico, endofágico e antropofílico, tendo sua proliferação favorecida pelo crescimento da urbanização e migração humana (De Souza *et al.*, 2022). Além disso, são frequentemente encontrados em seus estágios imaturos de desenvolvimento em recipientes artificiais contendo água limpa e com pouca iluminação. Assim, os criadouros podem ser pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos, caixas d'água, toneis, latões e cisternas destapadas ou mal tapadas entre outros. Já em condições naturais pode-se encontrar *Ae. aegypti* em bromélias, buracos em árvore, escavação em rocha e bambu. Em todos os ambientes citados anteriormente, as fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, em um substrato úmido, próximo à lâmina d'água (Consoli; Oliveira, 1994).

Sua alimentação é composta principalmente da seiva das flores e frutos como fonte de carboidratos, para obter reserva energética. Já as fêmeas precisam realizar alimentação sanguínea para manutenção de seus ovos e completar seu ciclo gonadotrófico (Facchinelli; Badolo; Mccall, 2023).

2.2.2 *Culex quinquefasciatus*

Culex quinquefasciatus (Figura 12) é uma espécie pertencente à família Culicidae, subfamília Culicinae e gênero *Culex*, sendo um mosquito que possui facilidade para prosperar em regiões tropicais e subtropicais, encontrados nas Américas, Austrália, Ásia, África, Oriente Médio e Nova Zelândia, além de ser amplamente distribuído no Brasil (Forattini, 1996). Do ponto de vista morfológico, essa espécie possui coloração marrom claro ou escuro e são densamente cobertos por escamas amarelo-douradas (Consoli; Oliveira, 1994).

Figura 12- Fêmea do mosquito da espécie *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: CDC (2021).

Cx. quinquefasciatus tem distribuição cosmopolita e é antropofílico. Como mosquito cosmopolita tem preferência por ambientes tropicais e subtropicais, especialmente em regiões urbanas. Tanto as fêmeas como os machos tendem a habitar casas durante o dia e a noite e se alimentam de seiva das plantas para obter energia (Forattini, 1996). No entanto, as fêmeas só procuram realizar seu repasto sanguíneo nas horas mais avançadas da noite, possuindo um comportamento obrigatoriamente noturno para conseguir realizar a maturação de seus ovos (Consoli; Oliveira, 1994). Os criadouros de mosquitos são principalmente águas providas de residências como ralos, fossas e poços que apresentam alta carga de matéria orgânica

(Manimegalai; Sukanya, 2014).

O comportamento reprodutivo das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* é baseado na oviposição de uma única jangada em superfícies aquáticas, com cerca de 155 ovos durante cada ciclo gonadotrófico. Assim, dando continuidade a seu ciclo de vida composto por 4 fases com duração de aproximadamente 7 dias, quando expostos a condições de temperatura ideais (30°). Nesse sentido, as regiões tropicais costumam ser os locais onde a espécie atinge o pico da densidade populacional ou posteriormente a estações chuvosas. Os meses mais quentes e chuvosos favorecem o acúmulo de água no solo e nos recipientes artificiais ajudando na proliferação da espécie (Bhattacharya; Basu; Sajal Bhattacharya, 2016).

A introdução da espécie *Cx. quinquefasciatus* ocorreu no Sudeste Asiático e depois migrou para o Novo Mundo por meio de embarcações voltadas para o comércio de escravos na África colonizada. Em seguida, acredita-se que o crescimento industrial tenha impulsionado a propagação da espécie nas Américas durante o século XIX. Por fim, se expandindo para ilhas do Pacífico por meio do comércio aéreo (Bhattacharya; Basu; Sajal Bhattacharya, 2016). O vetor é amplamente distribuído no mundo e possui potencial para transmitir diversos arbovírus, como o vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), Oropouche (OROV), Mayaro (MAYV), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) (Beranek *et al.*, 2020; De Mendonça *et al.*, 2021; Goddard *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2016). Além disso, é considerado o principal vetor da *Wuchereria bancrofti*, patógeno responsável por causar a filariose bancroftiana no Brasil (Consoli; Oliveira, 1994).

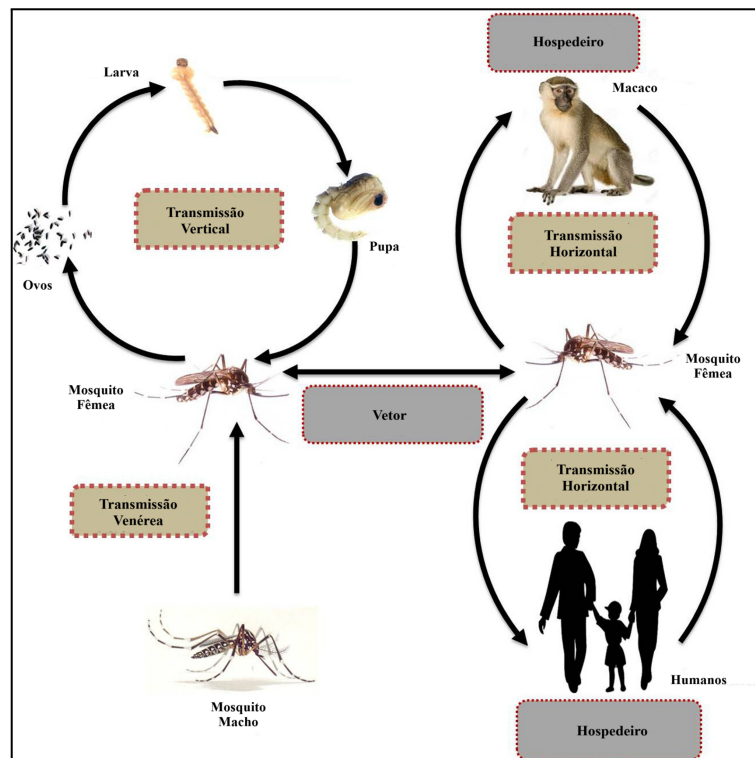
2.3 MECANISMO DE TRANSMISSÃO DE ARBOVÍRUS

As doenças infecciosas humanas, em sua grande maioria, causadas por patógenos são de origem zoonótica, pois continuam mantidas na natureza devido a interação dos vetores com os animais silvestres. Assim, o aumento do comércio, migração e transporte de diversos ambientes florestais para meios urbanos, vindo de ações antrópicas, facilitam que muitos insetos vetores, como o mosquito, conseguem aumentar a transmissão e proliferação de doenças em humanos (Lima-Camara, 2016). Diante disso, o ciclo de transmissão enzoótica requer que o vírus, o vetor e o hospedeiro interajam espacialmente e por um período de tempo para que ocorra a disseminação viral pelo vetor chegando ao hospedeiro (Conway; Colpitts; Fikrig, 2014).

Os arbovírus são mantidos principalmente pela transmissão entre espécies entre vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados. Diferentes fatores podem auxiliar ou prejudicar na relação dinâmica, incluindo a capacidade vetorial e a suscetibilidade do hospedeiro (Conway; Colpitts; Fikrig, 2014). As interações complexas entre vírus e vetor são determinadas pela competência vetorial, a qual reflete na superação das barreiras internas desses vetores e a capacidade de transmitir patógenos de maneira eficiente. Assim, pode ser afetada por fatores extrínsecos, como temperatura, umidade e nutrição, além de fatores intrínsecos, sendo eles barreiras do intestino médio, barreiras da glândula salivar, microbiota intestinal, respostas imunes (Agarwal; Parida; Dash, 2017; Kramer; Ciota, 2015). Outro fator que reflete na competência vetorial é o período de incubação extrínseco (PIE), referente ao tempo entre a ingestão de sangue infeccioso por um mosquito até infectar as glândulas salivares e disseminar o vírus para a saliva, o qual pode sofrer mudanças conforme a temperatura do ambiente e a dose viral (Agarwal; Parida; Dash, 2017; Conway; Colpitts; Fikrig, 2014).

Os mecanismos de transmissão vetorial de arbovírus envolvem a transmissão horizontal (entre vetores e hospedeiros vertebrados), a transmissão venérea (transferência viral durante a cópula) e a transmissão vertical (capacidade de fêmeas infectadas transmitirem o vírus para sua progênie), conforme mostra a (Figura 13) (Agarwal; Parida; Dash, 2017).

Figura 13: Três modos importantes de manutenção e amplificação de arbovírus envolvendo transmissão horizontal, vertical e venérea.

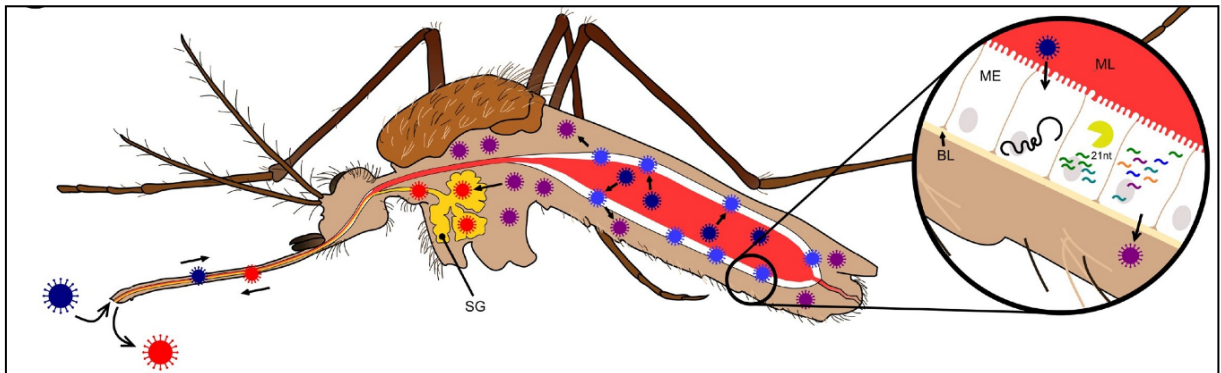


Fonte: Agarwal *et al.*, (2017) - Traduzido pela autora.

2.3.1 Transmissão horizontal

Através do mecanismo de transmissão horizontal o mosquito é infectado quando ingere sangue de um hospedeiro virêmico. O vírus após ser ingerido no repasto sanguíneo se liga às células epiteliais do intestino médio do vetor (Figura 14), e posteriormente, é encaminhado para hemocele se disseminando para outros órgãos secundários, como ovários e glândulas salivares (Marklewitz; Junglen, 2019). Nesse sentido, após infectar a glândula salivar, o vírus emerge na saliva, ultrapassando as barreiras de infecção e passando pelo ducto salivar, podendo ser transmitido para um novo hospedeiro. No entanto, existem algumas barreiras nesses vetores que impedem o sucesso da disseminação e transmissão viral, como a barreira de infecção do intestino médio (MIB), quando o vírus não se liga aos receptores nas células epiteliais do intestino médio. Além disso, pode ocorrer a não liberação de partículas virais do intestino, denominado de barreira de escape do intestino médio (MEB). Barreira de infecção da glândula salivar (SIB), o vírus não se liga às células acinares da glândula e a barreira de escape da glândula salivar (SEB), quando as partículas virais não são liberadas pelas células acinares (Agarwal; Parida; Dash, 2017; Kramer; Ciota, 2015).

Figura 14: Infecção e disseminação por arbovírus dentro de um mosquito.



Fonte: Marklewitz; Junglen, (2019).

Legenda: (SG) glândulas salivares, (BL) lâmina basal, (ME) epitélio do intestino médio, (ML) lúmen do intestino médio.

2.3.2 Transmissão venérea

Na transmissão venérea, os mosquitos são infectados durante a cópula. Este modo de transmissão ocorre a partir de um macho infectado por meio da transmissão vertical, o qual passa a carrear o vírus para uma fêmea sadia da mesma espécie (Higgs; Beaty, 2005). Alguns estudos demonstram a ocorrência desse fenômeno, como é o caso de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas por CHIKV, quando compartilharam o ambiente com machos infectados intratorácicos. Também foi visto a transmissão de DENV tipo 1, 2, 3 ou 4 para fêmeas de *Ae. albopictus* após machos infectados experimentalmente. Logo, essa via de transmissão viral pode elevar os ciclos naturais da doença (Agarwal; Parida; Dash, 2017; Mavale *et al.*, 2010).

2.3.3 Transmissão vertical

A transmissão vertical (TV) em mosquitos, refere-se à passagem de um arbovírus de uma fêmea de mosquito infectada para sua prole, garantindo a perpetuação do vírus entre gerações de mosquitos através de seus ovos (Agarwal; Parida; Dash, 2017). Pode ser classificada em três modos, sendo eles transmissão transovariana (TOT) onde ocorre a partir da invasão dos agentes patogênicos nas células germinativas primordiais ou nos oócitos antes de estarem envolvidos pelo córion do mosquito fêmea. Enquanto a infecção pela transmissão transovo, ocorre durante a oviposição, ou seja, o vírus permanece na casca do ovo e infecta o vetor no momento da eclosão. Por último a transmissão por contaminação da superfície do

oócito, a qual ocorre por meio da adesão do agente infeccioso ao córion, permanecendo durante todo o período de ovulação e no momento da eclosão contaminam as larvas. Assim, todas as formas de transmissão são classificadas diante da localização do patógeno. (Lequime; Lambrechts, 2014).

A transmissão vertical natural já foi representada nos três principais grupos de arbovírus, sendo eles flavivírus, alfavírus e bunyavírus. Também foi demonstrada, em mosquitos de diferentes espécies, como *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* (Lequime; Lambrechts, 2014). Alguns estudos de campo comprovam a manutenção dos arbovírus através da TV, com base na detecção viral de larvas, pupas e mosquitos machos coletados diretamente da natureza (Agarwal *et al.*, 2014; Alencar *et al.*, 2021; Da Silva *et al.*, 2023). Além disso, outros estudos laboratoriais também obtiveram sucesso ao investigar TV a partir de infecções realizadas em ambientes controlados laboratorialmente (Comeau *et al.*, 2020a; Lequime; Lambrechts, 2014).

Por meio de experimentos laboratoriais foi demonstrado que geralmente a TV ocorre com menor frequência no primeiro ciclo gonadotrófico. Isso pode acontecer por razões biológicas, ou seja, o vírus estará mais presente a partir do segundo ciclo gonadotrófico, pois teve mais tempo para se espalhar para o sistema reprodutivo do mosquito (Comeau *et al.*, 2020). Outro fator que pode influenciar a detecção seria a variação de temperatura que molda as interações entre vetores e patógenos. Alguns estudos relatam que em temperaturas mais quentes podem aumentar a replicação viral, o escape do intestino médio e a disseminação para tecidos secundários, mas também elevam a mortalidade do mosquito e diminui sua oviposição (Jian *et al.*, 2023; Tesla *et al.*, 2018).

A TV dos arbovírus torna-se um mecanismo indispensável para manutenção do vírus na natureza em períodos adversos para realização da transmissão horizontal (Lequime; Lambrechts, 2014). Dessa maneira, o estudo da ocorrência de transmissão vertical em populações de mosquitos mais frequentes em uma determinada região, auxilia a compreensão da dinâmica de transmissão dos vírus, e ainda permite realizar uma vigilância epidemiológica que investiga a circulação desses patógenos na natureza (Manuel; Missé; Pompon, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a transmissão vertical de vírus Zika e Chikungunya em mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* alimentados artificialmente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de transmissão vertical de ZIKV em mosquito das espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* alimentados artificialmente;
- Avaliar a taxa de transmissão vertical de CHIKV em mosquito das espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* alimentados artificialmente;
- Comparar os dados da transmissão vertical de mosquitos alimentados artificialmente com os dados da transmissão vertical de mosquitos coletados na natureza.

4 METODOLOGIA

4.1 PROPAGAÇÃO DOS VÍRUS EM CÉLULAS VERO

Os estoques virais que foram utilizados no presente estudo são a cepa de Zika (ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015) pertencente à coleção de vírus do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do IAM e a cepa (CHIKV/Brazil/PE408/2016) de Chikungunya derivada de isolados gentilmente cedida pela Dra. Roberta Bronzoni da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT-Sinop). A preparação dos estoques virais utilizados nos ensaios de alimentação artificial (ZIKV e CHIKV) está descrita em Guedes (2012) e foram cedidos pela Dra. Duschinka Guedes e Msc. Maria Eduarda Oliveira. Além dos ensaios de alimentação artificial, os estoques virais também foram usados na síntese dos padrões usados na curva de diluição dos ensaios de RT-qPCR. Para determinar o título do estoque de cada vírus na infecção artificial via oral, em unidade formadora de placa por mililitros (PFU/ml), foram realizadas titulações em ensaio de placa para CHIKV e ZIKV.

4.2 AMOSTRAGEM DOS MOSQUITOS PARA INFECÇÃO ARTIFICIAL EM LABORATÓRIO

Os mosquitos *Ae. aegypti* utilizados nos experimentos foram da colônia estabelecida em laboratório, proveniente da Região Metropolitana do Recife-Pernambuco (RecLab) (Melo-Santos *et al.*, 2010). Em relação aos mosquitos da espécie *Cx. quinquefasciatus*, a colônia utilizada também foi estabelecida em laboratório, advinda da Região Metropolitana do Recife-Pernambuco (CqSLab) (Amorim *et al.*, 2013). Ambas as espécies foram mantidas sob condições controladas de temperatura ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (50 a 90%) e fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro) no insetário do Departamento de Entomologia. As formas jovens (larvas e pupas) foram mantidas em bandejas plásticas, (45 cm x 20 cm x 7cm) com 2L de água potável contendo ração para gatos estéril (Whiskas®). Após a emergência dos mosquitos adultos, os mesmos foram transferidos para gaiolas de contenção, onde machos e fêmeas foram alimentados com solução de açúcar a 10% e, para as fêmeas, foi oferecido um repasto sanguíneo semanalmente, com sangue de coelho desfibrinado, utilizando placas de Petri, cobertas com PARAFILME® M (Sigma) e bolsas térmicas pré-aquecidas em banho-maria (37°C) para obtenção da progênie e continuidade da colônia em laboratório. Essa colônia foi mantida em condição padrão de insetário, até a obtenção dos

adultos para formação dos grupos utilizados nos respectivos experimentos de alimentação artificial com CHIKV e ZIKV.

4.3 INFECÇÃO ORAL DOS MOSQUITOS PARA AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL EM LABORATÓRIO

Todo o procedimento de alimentação artificial oral dos mosquitos, incluindo a manutenção dos mosquitos infectados, foi realizado no infectório NB2 (Nível de Biossegurança 2) do Departamento de Entomologia do IAM, dentro das normas internacionais de biossegurança e bioproteção.

O procedimento de alimentação artificial via oral com CHIKV e ZIKV, segue o mesmo protocolo descrito por Salazar *et al.* (2007) com algumas modificações, conforme descrição em Guedes *et al.* (2017) e foram efetuados em ensaios duplicados. Em média, foram utilizados 100 fêmeas e 50 machos para alimentação com o vírus (grupo teste). Para o grupo controle, que continha 50 fêmeas e 15 machos, os mosquitos foram alimentados com sangue sem vírus. Previamente à alimentação, os mosquitos foram submetidos a um jejum de solução de açúcar por um período de 24 horas antes da realização dos ensaios.

Na alimentação artificial via oral, os vírus foram oferecidos a fresco. Para isso, os estoques virais foram inoculados em garrafas de 25cm² seguindo o protocolo descrito no tópico 4.1, com uma MOI (multiplicity of infection) de 0,1. Quando o efeito citopático atingiu mais de 50% do tapete celular, as garrafas de cultivo passaram por um processo de congelamento e descongelamento, então foram misturadas com sangue de coelho desfibrinado na proporção de 1:1 e 3mM de ATP. Foram feitas alíquotas de 500 µl dos cultivos celulares utilizados, assim como da mistura, para avaliação do título viral.

O grupo teste foi alimentado com uma mistura de 4 ml de sangue e 4 ml de suspensão de células infectadas. Já o grupo controle negativo foi alimentado com uma mistura de 4 ml de sangue e 4 ml de suspensão de células não infectadas. As misturas foram ofertadas em placas de petri de 4 cm de diâmetro contendo uma tripla camada de PARAFILME® M (Sigma) no topo das gaiolas. Também, foram adicionadas sobre as placas de petri as bolsas térmicas aquecidas (37°C) e trocadas após 30 min (Figura 15). O sangue foi ofertado aos mosquitos por no máximo 60 minutos. As fêmeas que não se alimentarem adequadamente foram descartadas do estudo e as fêmeas ingurgitadas foram desmaiadas, separadas e

transferidas para um novo pote, onde permaneceram por 15 dias. Logo após a alimentação, foram coletadas duas fêmeas de cada grupo a fim de determinar o título do vírus após alimentação sanguínea.

Figura 15: Esquema da alimentação artificial via oral com ZIKV em populações de mosquitos.



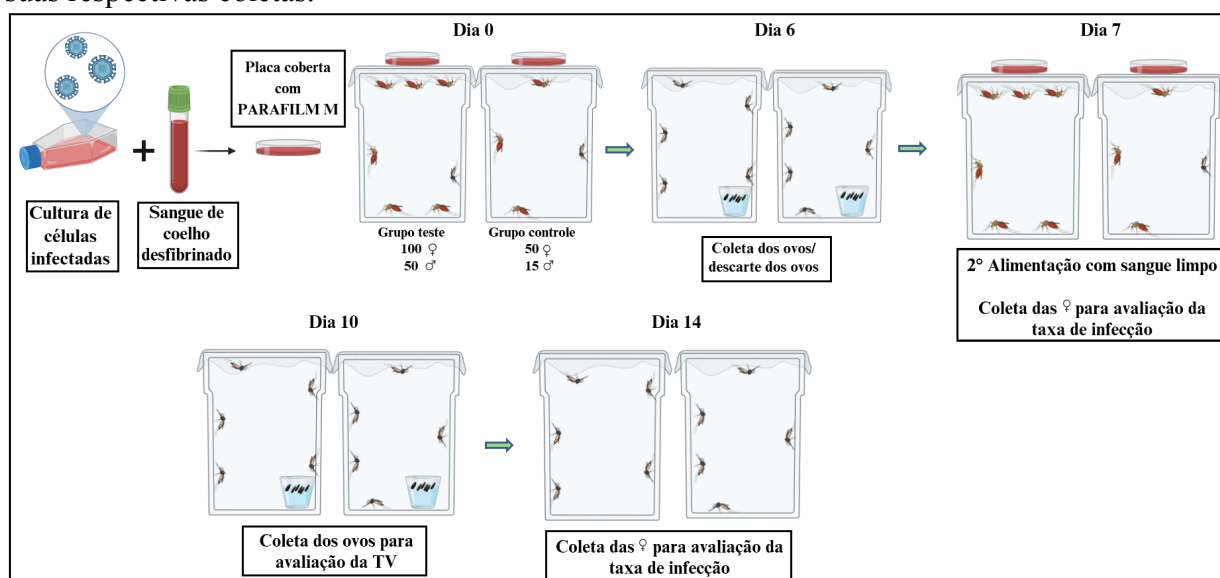
Fonte: A autora (2024).

Com o objetivo de determinar a taxa de infecção de cada população (números de mosquitos positivos/total de mosquitos testados) usada no estudo, 15 a 25 fêmeas de cada grupo de estudo (controle e teste) foram coletadas no 7º dia e no 14º dia e posteriormente, foram processadas para extração de RNA e RT-PCR quantitativa. Vale salientar, que após a infecção, os vírus geralmente atingem um pico de replicação em um determinado intervalo de tempo, e a coleta no 7º dpi ocorreu antes da administração da segunda alimentação, uma vez que se verifica o sucesso de infecção pelo vírus correspondente à primeira alimentação. A coleta dos mosquitos no 14º dpi é importante para observar a persistência da infecção e a capacidade de transmissão a longo prazo.

Para análise da transmissão vertical em laboratório, no 6º dia após alimentação artificial em cada grupo alimentado foram adicionados papelotes para oviposição para que as fêmeas conseguissem se alimentar novamente com uma segunda alimentação com sangue limpo realizada no 7º dia pós alimentação. A primeira oviposição coletada no 6º dia foi descartada, pois a TV de vírus ocorre com menor frequência nesse primeiro ciclo gonadotrófico. Isso acontece porque, a partir do segundo ciclo, o vírus tem mais tempo para se disseminar pelo sistema reprodutivo do mosquito, aumentando a probabilidade de ser transmitido para os ovos. No 10º dia após alimentação com sangue limpo de vírus, foi realizado a segunda coleta dos ovos, foi adicionado em cada gaiola um copo plástico contendo infusão de graminha (10%) e um substrato de oviposição feito a partir de um recorte de

papelão (16cm²) que mimetiza o sítio de oviposição para os mosquitos da espécie *Ae. aegypti*. Já para os potes contendo *Cx. quinquefasciatus* foram adicionados apenas o recipiente plástico redondo medindo 3 cm de diâmetro com água e infusão de gramínea (10%) para as jangadas serem depositadas. Os ovos coletados após a segunda alimentação livre de vírus durante o período de incubação extrínseco foram utilizados para avaliar a transmissão vertical desses vírus na prole (F1). Os ovos foram colocados em um recipiente para eclosão das larvas que foram acompanhadas durante todo o ciclo de desenvolvimento até a fase adulta. Após emergência dos adultos, estes foram mantidos em gaiolas por 10 dias. Após este tempo, os mosquitos foram mortos por congelamento e transferidos para um freezer -80°C onde permaneceram até o momento da sua utilização para isolamento viral, extração de RNA e reações de RT-PCR para identificação dos vírus. O fluxograma do ensaio de infecção artificial está descrito na figura 16.

Figura 16: Ilustração representando as alimentações artificiais de cada grupo analisado e suas respectivas coletas.



Fonte: A autora, criado no Biorender (2024).

4.4 TITULAÇÃO POR ENSAIO DE PLACA

A titulação viral foi realizada por ensaio de placa em células Vero. Inicialmente as placas de cultura de células de 24 poços contendo 3×10^5 células/ml em meio MEM suplementado com 10 % de SBF foram preparadas e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 horas, o meio foi descartado e foram adicionados 100 µl de cada diluição seriada (10-1 a 10-10), em duplicata, preparada para cada vírus. Na diluição seriada, foi utilizado 450 µl de

meio MEM sem SBF e 50 µl do inóculo viral. As placas foram transferidas para uma estufa a 37 °C em CO₂ a 5% durante 30 minutos para permitir a adsorção dos vírus. Após a incubação, foram retirados 100 µl de cada diluição seriada e adicionados 500 µl de meio semissólido (90 ml de Carboximetilcelose 3%, 10 ml de MEM 10x, 1 ml de PenStrep e 1ml de Fungizon). Após incubação por 48 horas a 37 °C com 5% de CO₂, o meio semissólido foi retirado por inversão e a monocamada de células fixada com solução de formalina 8% (solução de formol em água, na proporção 1:3,6) por 1 hora e 20 minutos. Após a fixação, foram adicionados em cada poço 500 µl do corante cristal violeta 0,04% para revelação das placas por um tempo mínimo de 15 minutos. Após a revelação, as placas foram lavadas por imersão em água corrente e levadas à estufa 37 °C para secagem por 24 horas. Após a secagem, as placas foram contadas e foi calculado o título viral.

$$T \text{ (PFU/ml)} = P \times F \times 10^x$$

T= Título do vírus;

P= Média do número de placas obtidas da diluição onde se conseguiu contar as placas;

F = Fator de correção para expressão do título em PFU/ml (multiplicar pelo volume inoculado em µl para obter o valor em 1000 µl);

X= Diluição onde foram contadas as placas.

4.5 ISOLAMENTO VIRAL

O procedimento de isolamento viral foi realizado seguindo o protocolo de Diallo *et al.*, 2014 com modificações conforme descrição a seguir. Após o período de desenvolvimento dos mosquitos da geração F1, foram mortos por congelamento a -80°C e posteriormente separados em *pools* de 10 mosquitos em meio L-15 5%. A partir disso, foram macerados e posteriormente filtrados, por meio de seringa e filtro, para obtenção de um sobrenadante límpido para fácil observação dos poços ao serem inoculados em placas de 96 poços contendo células Vero. Foram retirados 10 µl do sobrenadante filtrado e adicionados à placa e cobertos com 100 µl de meio MEM 2% (*Minimum Essential Media*, Gibco) e foram incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O isolamento viral foi confirmado através da avaliação do efeito citopático (EC) por microscopia eletrônica em até 7 dias após a inoculação. Em seguida, os poços que apresentaram EC foram coletados e utilizados para extração de RNA e reações de RT-qPCR para confirmação do vírus.

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-QPCR

A extração de RNA das amostras provenientes das infecções artificiais em laboratório foi realizada usando o protocolo de Trizol, com modificações conforme descrito em Guedes *et al.* (2017) e detalhado a seguir.

Uma alíquota de 100 µl do homogenato obtido dos *pools* de mosquitos foi misturada com 200 µl de Trizol (Invitrogen), agitado durante 15 segundos e incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente. À mistura foram adicionados 100 µl de clorofórmio (Sigma) e agitada manualmente durante 15 segundos, seguido de uma incubação a temperatura ambiente durante 3 minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa de cada amostra foi removida e transferida para um novo tubo contendo 250 µl de isopropanol 100 % (Sigma). As amostras foram misturadas por inversão dos tubos, incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e depois centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante então foi removido e o sedimento de RNA foi então lavado com 300 µl de etanol 75 % (Sigma). As amostras foram agitadas brevemente e depois centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Por fim, o sobrenadante foi desprezado, o excesso foi retirado por inversão em papel toalha e o RNA foi então transferido para uma estufa a 37 °C durante 20 minutos para secagem do pellet. O pellet contendo o RNA extraído foi ressuspensionado em 30 µl de água livre de DNase e RNase.

Para detecção molecular de vírus das amostras de mosquitos infectados artificialmente, foram realizadas reações monoplex de RT-PCR em Tempo Real para detecção dos vírus ZIKV e CHIKV. Os primers e sondas para ZIKV estão descritos em Lanciotti *et al.* (2008), para CHIKV em Lanciotti *et al.* (2007) (Quadro 1). Foi utilizado o kit TaqMan QIAGEN QuantiNova Probe, com uma concentração de 1x para QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix, de 0,8 µM para os primers, 0,1 µM para as sondas, 1x para QuantiNova ROX™ Reference Dye e 1x para QuantiNova RT Mix. As reações de RT-qPCR foram realizadas conforme descrição do protocolo do kit com uma pequena modificação referente a quantidade de ciclos (45 ciclos) usada.

Quadro 1. Lista de *primers* e sondas usados no presente estudo e suas respectivas sequências

<i>Primers</i> e sondas	Sequência (5' 3')	Fonte:
Zika1087	CCG CTG CCC AAC ACA AG	Lanciotti <i>et al.</i> , (2008)
Zika1163c	CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT	
Zika1108FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	
CHIKV 6856	TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA	Lanciotti <i>et al.</i> , (2007)
CHIKV 6981	TTG ACG AAC AGA GTT AGG AAC ATA CC	
CHIKV 6919VIC	AGG TAC GCG CTT CAA GTT CGG CG	

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Após a detecção dos *pools* positivos das amostras alimentadas artificialmente foi calculada a taxa de infecção mínima (MIR – *Minimum Infection Rate*) conforme descrito em Chow *et al.* (1998). A MIR é calculada dividindo-se o número de *pools* positivos pelo número total de mosquitos analisados, multiplicado por 1000.

$$MIR = \frac{n^{\circ} \text{ de } pools \text{ positivos}}{n^{\circ} \text{ de mosquitos}} \times 1000$$

5 RESULTADOS

5.1 TAXA DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DE ZIKV EM *Aedes aegypti* (RECLAB) E *Culex quinquefasciatus* (CQSLAB)

Na primeira alimentação, as colônias RecLab e CqSLab foram alimentadas com uma mistura de sangue com suspensão viral de ZIKV, apresentando um título de $1,7 \times 10^6$ PFU/ml. Considerando os mosquitos coletados no dia 0 pós alimentação, os títulos foram de $7,5 \times 10^3$ PFU/ml e $5,5 \times 10^3$ PFU/ml para *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente. No segundo experimento para *Ae. aegypti* obteve-se um título da mistura de $1,65 \times 10^8$ PFU/ml. Já os mosquitos coletados no dia 0 pós alimentação apresentaram um título de 4×10^7 PFU/ml. Infelizmente, no 2º experimento, não foi possível avaliar as amostras da espécie *Cx. quinquefasciatus* com a nova infecção oral, pois as larvas não eclodiram devido à contaminação por fungos. Assim, foram mantidas as análises feitas a partir da primeira alimentação para a linhagem CqSLab.

As amostras individuais de corpo inteiro de 15 a 25 fêmeas foram coletadas no 7º e 14º dpi para ambas as espécies. Em seguida, foram testadas por RT-qPCR para verificar a presença individualmente do vírus nas amostras. A partir desses resultados, foi possível calcular a taxa de infecção para as duas espécies, sendo *Ae. aegypti* analisada por ensaios em duplicata (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição das amostras positivas e taxas de infecção para o vírus ZIKV oriundas da infecção artificial de *Ae. aegypti* (RecLab) e *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab). Resultados referentes a espécie *Ae. aegypti* incluem os dados do 1º e 2º experimento.

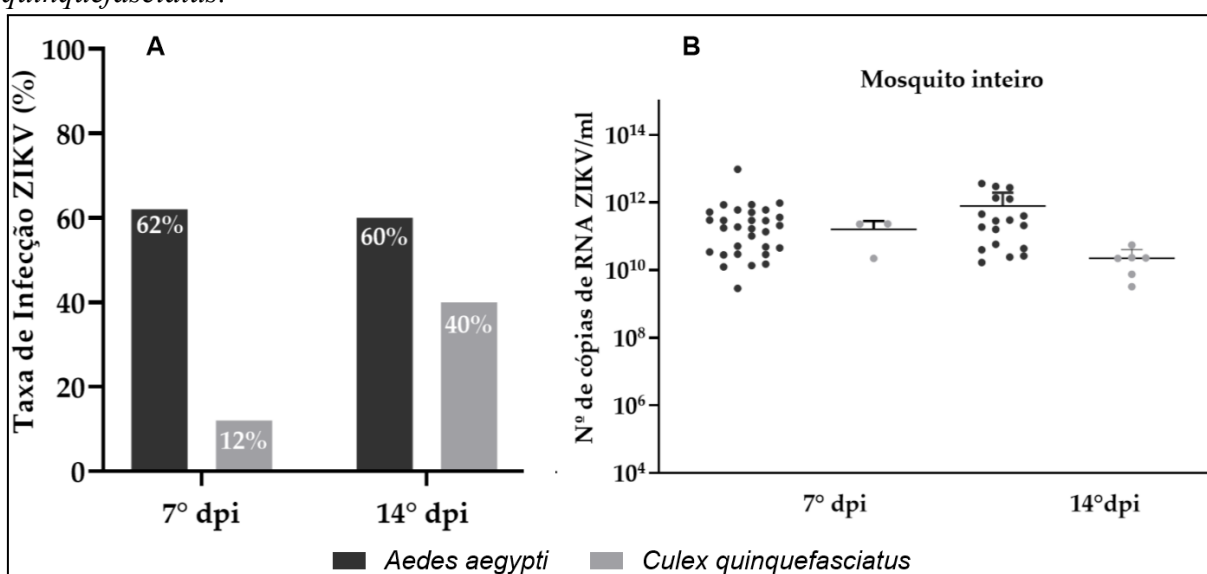
Espécies				
<i>Aedes aegypti</i>			<i>Culex quinquefasciatus</i>	
Dia pós infecção	Mosquito inteiro +	Taxa de Infecção	Mosquito inteiro +	Taxa de Infecção
7º	31/50	62%	3/25	12%
14º	18/30	60%	6/15	40%
Total	49/80		9/40	

Nota: O total refere-se a soma dos mosquitos analisados nos dois experimentos

Fonte: A autora (2024).

A linhagem RecLab mostrou uma taxa de infecção que variou entre 60-62%, enquanto a taxa de infecção para CqSLab variou entre 12-40% (Figura 17A). Sendo que, para *Ae. aegypti* o 7º dpi mostrou uma maior taxa de infecção, diferente dos dados para *Cx. quinquefasciatus* onde a maior taxa de infecção foi vista no 14º dpi. A análise do número de cópias de RNA/ml dos mosquitos inteiros, mostrou uma variação entre $2,8 \times 10^9$ a $9,6 \times 10^{11}$ no 7º dpi (Figura 17B). Já no 14º dpi a quantificação variou de $3,2 \times 10^9$ a $2,34 \times 10^{11}$, conforme demonstrado na Figura 17B.

Figura 17 - Gráfico da taxa de infecção populacional do ZIKV em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: **A)** Taxa de infecção populacional (números de mosquitos positivos/total de mosquitos testados) e **B)** Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/mL em mosquitos inteiros. Em cada momento foram analisados 15-25 mosquitos individualmente.

Com relação à TV, no experimento com os mosquitos *Ae. aegypti* foi possível obter 58 *pools* (580 mosquitos no total) a partir dos mosquitos emergidos da F1, avaliando os dois experimentos realizados. Deste total, 25 *pools* de *Ae. aegypti* foram positivos para ZIKV a partir da análise do efeito citopático, resultando em um MIR de 43,1‰ (Tabela 2). Já no experimento utilizando a espécie *Cx. quinquefasciatus*, no total foram obtidos 53 *pools* (530 mosquitos), a partir dos mosquitos emergidos da F1. Sendo 24 positivos para a presença de efeito citopático (Figura 18) quando inoculados em células Vero, resultando em um MIR de 45,2‰ (Tabela 2). Esses *pools* que apresentaram EC foram coletados para extração de RNA e posterior RT-qPCR. As análises do número de cópias de RNA/ml dos

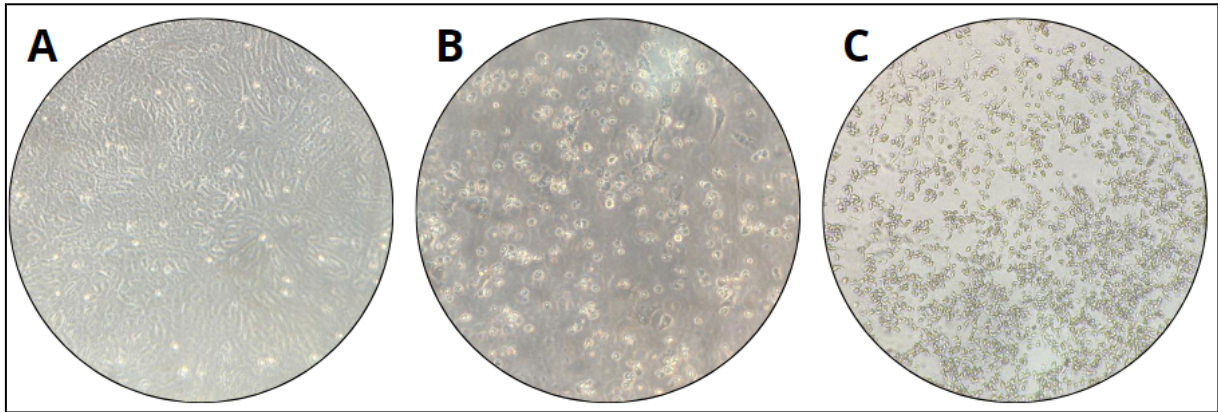
poços que apresentaram EC mostraram uma variação entre 4×10^6 a $5,5 \times 10^{11}$ para *Ae. aegypti* (Figura 19B). Já em *Cx. quinquefasciatus*, a quantificação variou de $6,9 \times 10^{14}$ a $7,7 \times 10^{15}$, conforme demonstrado na Figura 19B.

Tabela 2 - Taxa de infecção mínima (*minimum infection rate* - MIR) de mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* expostos ao vírus Zika (ZIKV)

Transmissão Vertical (<i>Pools</i>)		
Espécies	Número de <i>pools</i> positivos	MIR (‰)
<i>Aedes aegypti</i>	25/58	43,1‰
<i>Culex quinquefasciatus</i>	24/53	45,2‰
Total	43/72	

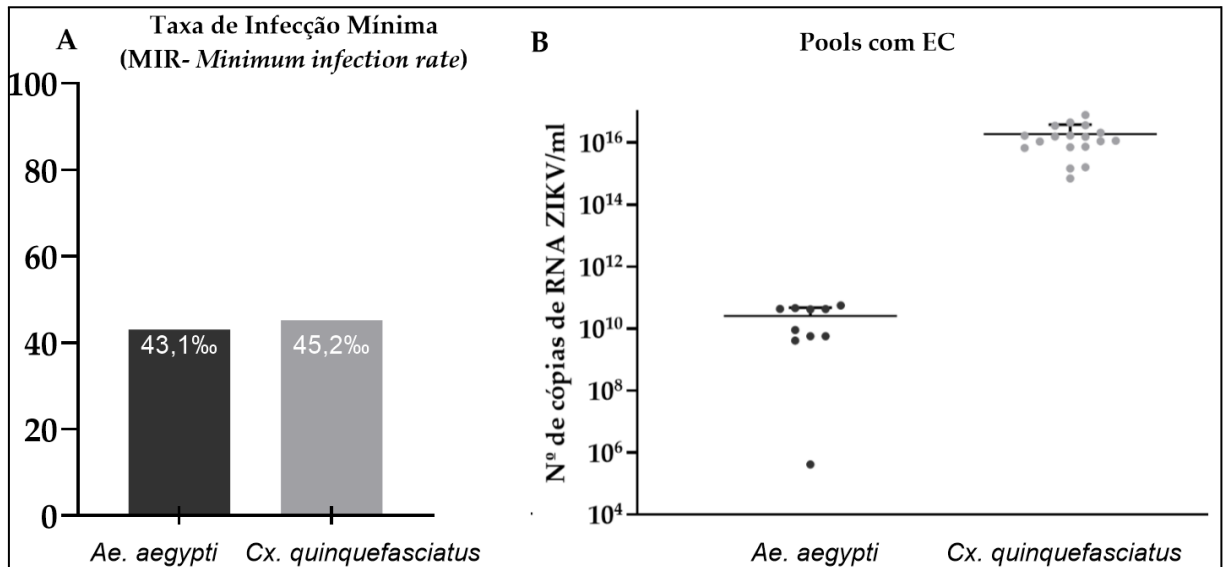
Fonte: A autora (2024).
Nota: Taxa de infecção mínima (*Minimum infection rate* – MIR) é calculada pela quantidade de *pools* positivos dividido pelo número de mosquitos analisados, multiplicado por 1000.

Figura 18 - Captura da visualização ao microscópio invertido de diferentes poços de uma placa de cultura de 96 contendo células VERO inoculadas com amostras de mosquitos da espécie *Cx. quinquefasciatus* (F1) infectados com ZIKV.



Fonte: Dados da autora (2024).
Legenda: Imagens capturadas no aumento 10x no microscópio invertido (Fisher Scientific). **A)** Células não infectadas; **B)** Células infectadas com ZIKV 2 dias após inoculação das amostras; **C)** Células infectadas com ZIKV 4 dias após inoculação das amostras.

Figura 19 - Gráfico da taxa de infecção mínima por ZIKV detectado em amostras da geração F1 de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* de laboratório.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: **A)** Taxa de infecção mínima (número de pools positivos dividido pelo número de mosquitos analisados, multiplicado por 1000) e **B)** Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/mL em *pools* que apresentaram EC.

5.2 TAXA DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DE CHIKV EM *Aedes aegypti* (RECLAB) E *Culex quinquefasciatus* (CQSLAB)

Nesta infecção, a linhagem RecLab foi alimentada com uma mistura composta por sangue e suspensão viral, que apresentou um título de $7,5 \times 10^7$ PFU/ml. Considerando os mosquitos coletados no dia 0 pós alimentação apresentaram um título de $2,1 \times 10^7$ PFU/ml. Já a linhagem CqSLab, obteve na mistura de sangue com suspensão viral um título de 8×10^4 PFU/ml e os mosquitos coletados no dia 0 obtiveram um título de 8×10^3 PFU/ml.

Para avaliar a taxa de infecção mínima das populações de *Aedes aegypti* (RecLab) e *Culex quinquefasciatus* (CqSLab) para Chikungunya foram realizados dois experimentos independentes de alimentação artificial. Foram processadas amostras individuais de corpo inteiro, coletadas no 7º e 14º dpi, para ambas as espécies. Em seguida, foram testados por RT-qPCR para detectar a presença do vírus, permitindo o cálculo da taxa de infecção populacional para as duas espécies (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição das amostras positivas e taxas de infecção para CHIKV oriundas da infecção artificial de *Ae. aegypti* (RecLab) e *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab). Resultados obtidos a partir de um único experimento para ambas as espécies

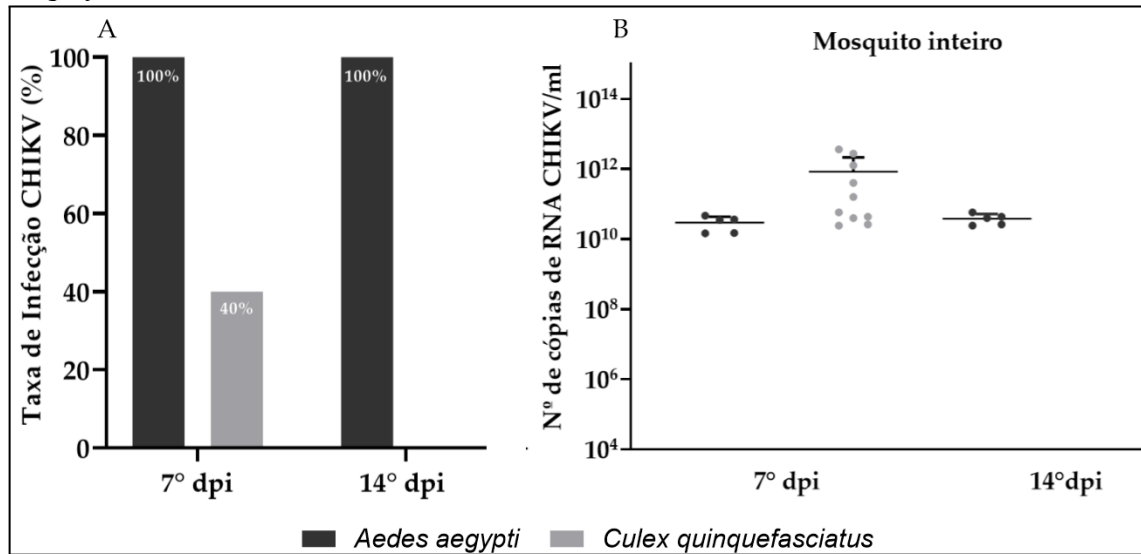
Espécies				
<i>Aedes aegypti</i>			<i>Culex quinquefasciatus</i>	
Dia pós infecção	Mosquito inteiro +	Taxa de Infecção	Mosquito inteiro +	Taxa de Infecção
7°	5/5	100%	10/25	40%
14°	5/5	100%	0/15	0%
Total	10/10		10/40	

Fonte: A autora (2024).

Nota: A taxa de infecção é calculada pela quantidade de mosquitos positivos dividido pelo número de mosquitos analisados.

A linhagem RecLab obteve uma taxa de infecção de 100% enquanto a taxa de infecção para CqSLab variou entre 0-40% (Figura 20A). Ou seja, em relação ao *Cx. quinquefasciatus*, apenas as fêmeas no 7° dpi apresentaram resultados positivos, e não foi detectada a presença do vírus no 14° dpi. As análises do número de cópias de RNA/ml nos mosquitos inteiros mostraram uma variação de $2,6 \times 10^{10}$ a $3,6 \times 10^{11}$ no 7° dpi, enquanto no 14° dpi a quantificação variou de $2,4 \times 10^{10}$ a $5,8 \times 10^{12}$, conforme ilustrado na Figura 20B.

Figura 20 - Gráfico da taxa de infecção populacional do CHIKV em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: **A)** Taxa de infecção populacional (números de mosquitos positivos/total de mosquitos testados) e **B)** Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/mL em mosquitos inteiros. Em cada momento foram analisados 5-25 mosquitos individualmente.

Com relação à TV, no experimento com os mosquitos *Ae. aegypti*, foram obtidos 60 *pools* (totalizando 600 mosquitos) a partir dos mosquitos emergidos da F1. Desses, 34 *pools* de *Ae. aegypti* foram confirmados para CHIKV por meio da análise do efeito citopático (Figura 21), indicando a presença do vírus, resultando em um MIR de 56,7% (Tabela 4). Os *pools* com efeito citopático (EC) foram coletados para extração de RNA e posterior RT-qPCR. As análises do número de cópias de RNA/ml nos *pools* positivos para EC variaram de 2×10^{15} a $4,8 \times 10^{16}$ para *Ae. aegypti* (Figura 22B). No experimento com *Cx. quinquefasciatus*, foram obtidos 20 *pools* (200 mosquitos), todos negativos para a presença viral (Figura 22B).

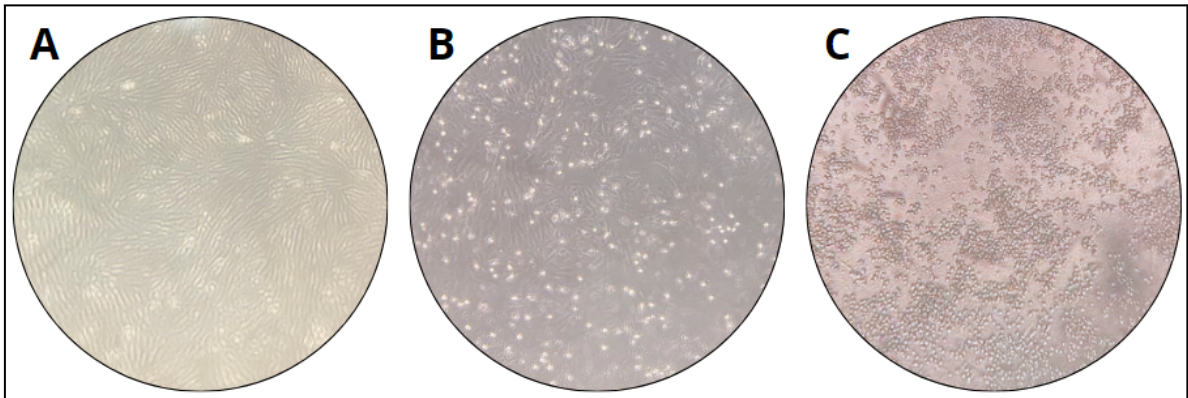
Tabela 4 - Taxa de infecção mínima (*minimum infection rate* - MIR) de mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* expostos ao vírus Chikungunya (CHIKV).

Transmissão Vertical (<i>Pools</i>)		
Espécies	Número de <i>pools</i> positivos	MIR(‰)
<i>Aedes aegypti</i>	34/60	56,7‰
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0/20	-
Total	34/80	

Fonte: A autora (2024)

Nota: Taxa de infecção mínima (*Minimum infection rate* – MIR) é calculada pela quantidade de *pools* positivos dividido pelo número de mosquitos analisados, multiplicado por 1000.

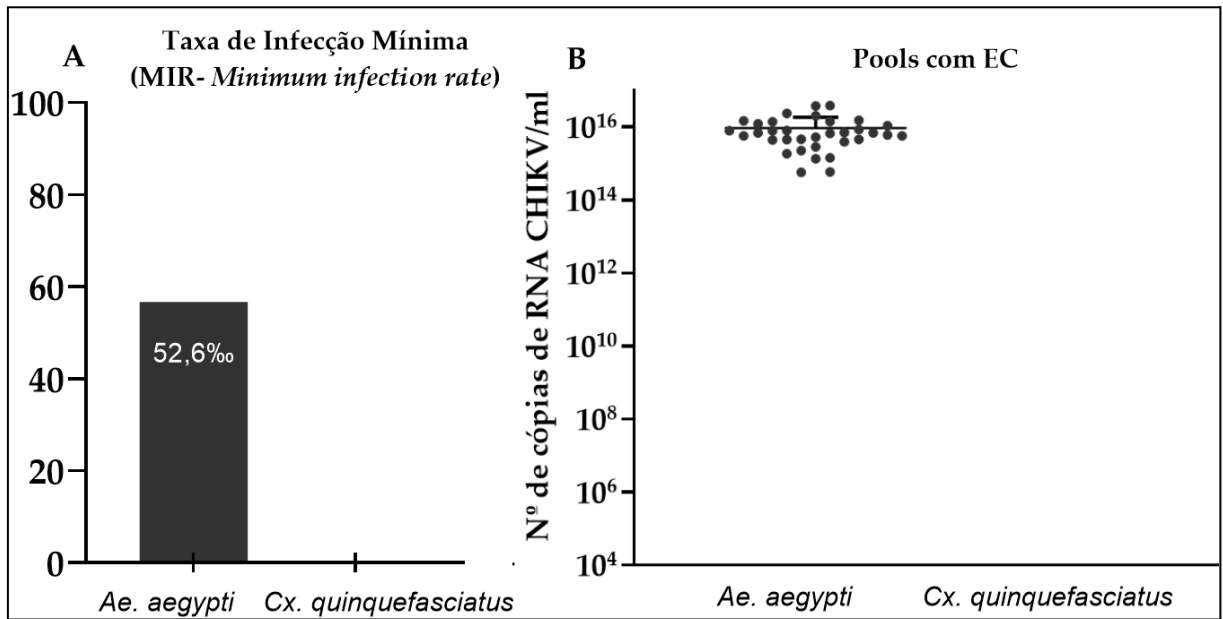
Figura 21 - Captura da visualização ao microscópio invertido de diferentes poços de uma placa de cultura de 96 contendo células VERO inoculadas com amostras de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (F1) infectados com CHIKV.



Fonte: Dados da autora (2024).

Legenda: Imagens capturadas no aumento 10x no microscópio invertido (Fisher Scientific) **A)** Células não infectadas; **B)** Células infectadas com CHIKV 1 dia após inoculação das amostras; **C)** Células infectadas com CHIKV 3 dias após inoculação das amostras.

Figura 22 - Gráfico da taxa de infecção mínima para CHIKV detectado em amostra da geração F1 de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* de laboratório.



Fonte: A autora (2024).

Legenda: **A)** Taxa de infecção mínima (número de pools positivos dividido pelo número de mosquitos analisados, multiplicado por 1000) e **B)** Quantificação da carga viral em números de cópias de RNA/mL em *pools* que apresentaram EC.

6 DISCUSSÃO

O mecanismo de transmissão vertical de um arbovírus pode ter como papel a garantia da manutenção das infecções causadas por esses agentes patogênicos em seus vetores naturais, mesmo durante períodos interepidêmicos e em condições climáticas não favoráveis (períodos frios em regiões temperadas e estações quentes e secas em zonas tropicais) ou na ausência de um hospedeiro vertebrado suscetível (Agarwal *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2019; Thangamani *et al.*, 2016). Diante disso, o presente trabalho avaliou a transmissão vertical (TV) dos dois arbovírus com frequente circulação nacional, ZIKV e CHIKV nas populações de mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* alimentados artificialmente com os vírus descritos. Em resumo, os resultados obtidos nas amostras de F1 nas colônias RecLab e CqSLab analisadas mostram que ZIKV pode ser transmitido pela via vertical. Para CHIKV, a taxa de transmissão vertical foi alta para RecLab, o que não ocorreu em CqSLab.

A infecção por ZIKV é uma constante ameaça à saúde pública e possui potencial de ressurgir como uma epidemia em diversas regiões. Este vírus pode ser transmitido através da urina infectada, repasto sanguíneo do mosquito, transfusão sanguínea e da mãe para o feto. Por ser um patógeno de grande risco à população, é essencial a investigação dos seus aspectos biológicos e possíveis interações com vetores distintos, buscando compreender sua transmissão e proteger a população de futuras epidemias (Pielnaa *et al.*, 2020). Para ZIKV, o fenômeno de transmissão vertical em mosquitos de diversas espécies foi avaliado tanto em estudos a partir de experimentos em laboratório (Chaves *et al.*, 2019; Ciota *et al.*, 2017; Comeau *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2017; Phumee *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2020), quanto em mosquitos coletados em campo (Ferreira-De-Brito *et al.*, 2016; Calle-Tobón *et al.*, 2020; Satoto *et al.*, 2019; Phumee *et al.*, 2019; Elizondo-Quiroga *et al.*, 2017; (Costa *et al.*, 2018; Izquierdo-Suzán *et al.*, 2019, Zimler Ra *et al.*, 2023).

Com relação à TV em *Ae. aegypti* com ZIKV no presente trabalho, identificamos um MIR de 43,1‰ (25 *pools* positivos/58 analisados), que é considerada alta quando comparamos com estudos citados adiante. Assim, analisando vários experimentos de infecção oral, alguns estudos detectaram a TV de ZIKV nessa espécie, a partir de diferentes estágios da vida e algumas gerações parentais. Como é o caso do trabalho feito por Comeau *et al.*, (2020), na detecção do ZIKV em gerações F1 adultas, emergidas posteriormente à oviposição de fêmeas infectadas oralmente, com valores de MIR variando entre 5,7 a 65,0‰ (Comeau *et al.*,

2020). Em outro estudo, desenvolvido por Chaves *et al.*, (2019) com gerações de mosquitos *Ae. aegypti* amazônico, mostrou que as taxas de infecção mínima foram 18,0‰ em larvas, 20,0‰ em pupas e 14,3‰ nos mosquitos adultos (Chaves *et al.*, 2019). Em outro experimento, foram testados 104 *pools* de adultos F1 de *Ae. aegypti* e 6 delas foram positivas para vírus ZIKV, obtendo um MIR de 11,9‰ (Ciota *et al.*, 2017). Os resultados apresentados aqui sugerem que a transmissão vertical para *Ae. aegypti* com ZIKV pode ser um fator comum quando investigados sobre condições controladas em laboratório.

Com relação aos resultados obtidos para infecções de ZIKV em *Culex quinquefasciatus*, encontrou-se valores de MIR de 45,2‰ (24 *pools* positivos/53 analisados). Esses resultados corroboram com o estudo realizado na Tanzânia, demonstrado por Phumee *et al.*, 2019, que obtiveram a detecção do RNA do ZIKA da geração F1 com MIR de 29,2‰ e na geração F6 um MIR de 24,2‰, sugerindo que a transmissão vertical é um fenômeno habitual nessa espécie (Phumee *et al.*, 2019).

Os resultados para estudo de TV em ZIKV encontrados neste trabalho, quando comparados com estudos desenvolvidos em populações de campo, verifica-se que os resultados em laboratório obtiveram um MIR semelhante aos de campo para *Ae. aegypti*. Porém, as taxas de transmissão vertical natural demonstraram algumas distinções quando analisadas em períodos, locais e números de mosquitos diferentes. Assim, em um estudo realizado por Oliveira (2021) durante 2017, 2018 e 2019 na Região Metropolitana do Recife, identificaram alta circulação de ZIKV, variando os valores de MIR entre 35,2 e 91,7‰ para *Ae. aegypti*. Corroborando com os dados obtidos para este vírus em populações estudadas em laboratório. Porém, outros estudos no Brasil detectaram MIR inferiores aos observados no presente trabalho, como é o caso da pesquisa do vírus em machos adultos *Ae. aegypti* realizada no Rio de Janeiro entre 2015-2016 com MIR de 4,3‰ (Ferreira-De-Brito *et al.*, 2016). E das larvas da espécie *Ae. aegypti*, coletadas no México em 2016, durante dois períodos distintos no ano, foram observadas MIR de 2,8 em junho e 6,9 em novembro (Izquierdo-Suzán *et al.*, 2019).

Em relação a *Cx. quinquefasciatus*, alguns dados sugerem que a transmissão do ZIKV ocorre pela via transovariana, tanto em campo quanto em laboratório (Phumee *et al.*, 2019). Como foi demonstrado por meio da alimentação artificial que o *Cx. quinquefasciatus* é

susceptível à infecção do vírus Zika e possui um ciclo de replicação ativo nas glândulas salivares e é posteriormente eliminado na saliva (Guedes *et al.*, 2017). Também foi relatado em um estudo em laboratório realizado na China, a detecção do RNA do ZIKV na saliva do mosquito *Cx. quinquefasciatus*, indicando que esse poderia ser um potencial vetor do vírus (Guo *et al.*, 2016). Além disso, também foi detectado o vírus em mosquitos machos dessa espécie na região Metropolitana do Recife por Oliveira (2021), indicando a ocorrência da transmissão vertical, foi encontrado valores de MIR variantes entre os três anos de coleta, sendo 9,2‰ em 2016, 45,9‰ em 2017 e 11,2‰ em 2018.

Considerando o vírus Chikungunya, a infecção por esse arbovírus apresenta riscos constantes à saúde pública mundial, por causar malefícios duradouros para vida de vários pacientes e alguns casos que chegam ao óbito. É visto que 30 a 40% dos indivíduos infectados apresentam doença articular crônica que pode durar semanas, meses ou anos após a infecção inicial (De Lima Cavalcanti *et al.*, 2022; Sangeeta Janjoter *et al.*, 2024; Wang; Zhang, 2019). Assim, com a chegada no Brasil em 2010, tornou-se necessário o entendimento das suas formas de transmissão para evitar possíveis surtos. Já foi descrito em experimentos de laboratório a transmissão vertical de CHIKV (Agarwal *et al.*, 2014; Chompoosri *et al.*, 2016) e também foi relatada em estudos realizados em coletas de campo (Granger Neto *et al.*, 2022; Heath *et al.*, 2020; Jain *et al.*, 2016).

Em relação ao experimento em laboratório realizado com CHIKV em *Aedes aegypti*, foi obtido um valor de MIR de 56,7‰ (34 *pools* positivas/ 60 analisadas) relativamente alto quando comparado com alguns estudos já realizados. Como é o caso do experimento realizado por Chompoosri *et al.*, (2016), o qual demonstrou em *Ae. aegypti* alimentados artificialmente com CHIKV obtiveram na sua geração F1 adultos um MIR variando entre 3,3 a 10,0‰. Já em outro estudo laboratorial que seguiu o mesmo padrão de alimentação obtiveram também em adultos F1 um MIR 20,2‰ (Agarwal *et al.*, 2014). Diante disso, um estudo de campo evidenciou a transmissão vertical natural do vírus chikungunya em populações de *Aedes aegypti* nos estados de Delhi e Haryana na Índia, com um MIR de 33,3‰ (Jain *et al.*, 2016).

Considerando o experimento de laboratório com CHIKV em *Culex quinquefasciatus*, foram analisados 20 *pools* e todos foram negativos para a presença do vírus. Visto que, alguns

estudos já relataram a ineficácia da transmissão de CHIKV nesses vetores. Como é o caso da primeira avaliação de competência vetorial, realizada por Jupp *et al.*, (1981), a qual não foi possível detectar infecções. Enquanto que, outros estudos apresentam apenas infecções a nível de intestino médio (Richards; Anderson; Smartt, 2010). Porém, mesmo com a infecção natural de *Cx. quinquefasciatus*, sendo detectada em amostras do 7º dpi neste trabalho, não se pode especular e sugerir que a espécie esteja participando da transmissão do CHIKV. Considerando uma limitação deste estudo, é que os mosquitos tiveram seus corpos analisados como um todo, e a análise das glândulas salivares, que poderia ser indicativa de competência vetorial, não foi realizada.

A capacidade de transmissão vertical de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* indica que estas espécies podem ser hospedeiros de sobrevivência persistente do ZIKV durante períodos interepidêmicos desfavoráveis como foi relatado em diversos estudos realizados em campo. Esses achados têm implicações epidemiológicas que demonstram maior risco de possíveis surtos futuros. Nesse sentido, com os resultados obtidos neste trabalho em condições laboratoriais, podemos sugerir que o vírus Zika faz-se presente na transmissão vertical nos mosquitos da primeira geração parental. No entanto, ainda é necessário realizar mais estudos a respeito da capacidade da geração F1 e futuras gerações de realizar a transmissão desse vírus. Já para CHIKV, o presente estudo obteve resultados satisfatórios em relação a transmissão vertical para *Aedes aegypti* semelhantes a estudos de campo, sugerindo que o mecanismo de TV poderia ser um fenômeno frequente para esta espécie em relação ao vírus Chikungunya, podendo, assim, contribuir para a manutenção desse arbovírus na natureza e provocar futuros surtos em regiões onde o controle vetorial não é implementado ou é insuficiente.

Em síntese, os dados obtidos nas populações e linhagens analisadas demonstram que há potencial para a transmissão transovariana do ZIKV nas espécies *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. No entanto, para CHIKV, essa forma de transmissão foi detectada exclusivamente em *Aedes aegypti*. É fundamental destacar a importância de realizar novos experimentos para confirmar estes resultados. Isso é importante para reforçar o papel que esse mecanismo de transmissão possui em provocar riscos à saúde mundial, por favorecer a circulação de arbovírus em períodos interepidêmicos.

CONCLUSÃO

- a. ZIKV é transmitido verticalmente em *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, identificados em ambos os ambientes naturais e experimentais, sugerindo que esse mecanismo de transmissão pode ser crucial para realização da manutenção desse vírus na natureza mesmo entre períodos inter-epidêmicos;
- b. A transmissão vertical do CHIKV é um fenômeno comum em *Ae. aegypti*, demonstrado em laboratório e campo. Possibilitando sua manutenção viral na natureza, até em períodos adversos. Diferente da TV em *Cx. quinquefasciatus*, onde não foi possível detectar esse mecanismo de transmissão;
- c. O potencial da transmissão vertical em realizar a manutenção de arboviroses, reforça a necessidade de ampliação do controle vetorial a fim de evitar grandes epidemias no futuro.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2990, 2014.
- AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P. K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 27, n. 5, p. e1941, 2017.
- ALENCAR, J. et al. Natural Infection and Vertical Transmission of Zika Virus in Sylvatic Mosquitoes *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* from Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 2, p. 99, jun. 2021.
- AMORIM, L. B. et al. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. **Pest Management Science**, v. 69, n. 12, p. 1307–1314, dez. 2013.
- BÁRBARA APARECIDA CHAVES 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.
- BARBI, L. et al. Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 137–141, 2018.
- BARTHOLOMEEUSEN, K. et al. Chikungunya fever. **Nature reviews. Disease primers**, v. 9, n. 1, p. 17, 6 abr. 2023.
- BERANEK, M. D. et al. *Culex interfor* and *Culex saltanensis* (Diptera: Culicidae) are susceptible and competent to transmit St. Louis encephalitis virus (Flavivirus: Flaviviridae) in central Argentina. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 10, p. 725–729, 5 out. 2020.
- Boletim Epidemiológico - Volume 55 - no 11 — Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/e-dicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-11.pdf/view>>.
- BHATTACHARYA, S.; BASU, P.; SAJAL BHATTACHARYA, C. The southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. **J Entomol Zool Stud**, v. 4, n. 2, p. 73–81, 2016.
- BRASIL. Informe Epidemiológico de Arboviroses: SE 38/2024. Recife: Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde de Pernambuco, 2024. Disponível em: https://portalcievs.saude.pe.gov.br/docs/Informe%20Epidemiol%C3%B3gico%20Arboviroses_SE38-2024.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 53. Boletim Epidemiológico, 52, 2021.

BRITO, C. A. A. DE; CORDEIRO, M. T. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 537–543, 2016.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, jun. 2014.

CARVALHO, C. D. S.; SOUZA, Z. H. DE. REFLEXÃO ACERCA DA INCIDÊNCIA DOS CASOS DE DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZICA NO BRASIL. **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**, 2016.

CASSADO, S. et al. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 19, n. 13, p. 20752, 3 abr. 2014.

CECÍLIO, S. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae from southeastern Brazil - Cecílio - 2015 - Journal of Vector Ecology - Wiley Online Library. **Journal of vector ecology**, jun. 2015.

CHAN, J. F. W. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **The Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 507–524, 1 maio 2016.

CHARREL, R. N. et al. Globalization of Chikungunya: 10 years to invade the world. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 662–663, jul. 2014.

CHAUHAN, L. et al. Nervous System Manifestations of Arboviral Infections. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 9, n. 4, p. 107–118, 2022.

CHINAZZI, M. et al. The effect of travel restrictions on the spread of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) outbreak. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6489, p. 395–400, 24 abr. 2020.

CHOMPOOSRI, J. et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 227, 23 abr. 2016.

CHOW, V. et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, p. 578–86, 1 jun. 1998.

CIOTA, A. T. et al. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 880–882, maio 2017.

COMEAU, G. et al. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Produces Potentially Infectious Progeny. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 876–883, ago. 2020.

CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. **Annual Review of Virology**, v. 1, n. Volume 1, 2014, p. 71–88, 29 set. 2014.
COSTA, C. F. DA et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006594, 16 jul. 2018.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Editora Fiocruz**, 1994.

COTTIS, S. et al. Determinants of Chikungunya and O'nyong-Nyong Virus Specificity for Infection of *Aedes* and *Anopheles* Mosquito Vectors. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 589, 21 fev. 2023.

DA SILVA, D. M. F. et al. TRANSMISSÃO VERTICAL DE ARBOVIROSES EM *AEDES AEGYPTI* EM GOIÂNIA: UMA ESTRATÉGIA PARA A DISSEMINAÇÃO DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, XXIII Congresso Brasileiro de Infectologia. v. 27, p. 103489, 1 out. 2023.

DIARIO DE PERNAMBUCO. Número de casos prováveis de dengue no Estado este ano é 473,6% maior do que no mesmo período de 2023. Disponível em: <<https://www.diariodepernambuco.com.br/noticia/vidaurbana/2024/03/numero-de-casos-provaveis-de-dengue-e-473-6-maior-do-que-2023.html#:~:text=Pernambuco%20registrou%209.505%20casos%20prov%C3%A1veis%20de%20dengue.%20O>>. Acesso em: 22 set. 2024.

DIALLO, D. et al. Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109442, 13 out. 2014.

DE LIMA CAVALCANTI, T. Y. V. et al. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 969, 5 maio 2022.

DE MENDONÇA, S. F. et al. Evaluation of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes Competence to Oropouche virus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 755, maio 2021.

DE SOUZA, S. J. P. et al. Spatial and Temporal Distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Oviposition on the Coast of Paraná, Brazil, a Recent Area of Dengue Virus Transmission. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 9, p. 246, 14 set. 2022.

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

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

DUSFOUR, I. et al. Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 10, p. e0007615, out. 2019.

DZUL-MANZANILLA, F. et al. Evidence of vertical transmission and co-circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 2, p. 141–144, fev. 2016.

FACCHINELLI, L.; BADOLO, A.; MCCALL, P. J. Biology and Behaviour of *Aedes aegypti* in the Human Environment: Opportunities for Vector Control of Arbovirus Transmission. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 636, 27 fev. 2023.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 18 fev. 2016.

FERNÁNDEZ-SALAS, I. et al. Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. **Antiviral Research**, v. 124, p. 30–42, dez. 2015.

FERREIRA-DE-LIMA, V. H. et al. Silent circulation of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) resulting from natural vertical transmission. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3855, 2 mar. 2020.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2.** [s.l.] EdUSP, 1996.

FRANKLINOS, L. H. V. et al. The effect of global change on mosquito-borne disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. e302–e312, set. 2019.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **The Journal of General Virology**, v. 97, n. 2, p. 269–273, fev. 2016.

GOBBI, F. et al. Emergence and Surveillance of Chikungunya. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 1, p. 4–12, 1 mar. 2015.

GODDARD, L. B. et al. Vector Competence of California Mosquitoes for West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1385–1391, dez. 2002.

GRANGER NETO, H. P. et al. Natural vertical cotransmission of Dengue virus and Chikungunya virus from *Aedes aegypti* in Brumado, Bahia, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 55, p. e0427, 2022.

GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 1 jan. 2017.

GUEDES, D. R. D. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 2, p. 67–75, jun. 2010.

GUO, X.-X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 9, p. e102, 7 set. 2016.

HEATH, C. J. et al. Evidence of transovarial transmission of Chikungunya and Dengue viruses in field-caught mosquitoes in Kenya. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008362, 19 jun. 2020.

HIGGS, S. et al. Nonviremic transmission of West Nile virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 25, p. 8871–8874, 21 jun. 2005.

HONÓRIO, N. A. et al. Experimental Vertical Transmission of Chikungunya Virus by Brazilian and Florida *Aedes Albopictus* Populations. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 353, 17 abr. 2019.

INFORME SEMANAL N°07 DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/zika>. Acesso em: 17 jun. 2024

IZQUIERDO-SUZÁN, M. et al. Natural Vertical Transmission of Zika Virus in Larval *Aedes aegypti* Populations, Morelos, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 8, p. 1477–1484, ago. 2019.

JAIN, J. et al. Evidence for natural vertical transmission of chikungunya viruses in field populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana states in India-a preliminary report. **Acta Tropica**, v. 162, p. 46–55, out. 2016.

JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know? **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 3–16, 13 nov. 2017.

JIAN, X. et al. Effects of constant temperature and daily fluctuating temperature on the transovarial transmission and life cycle of *Aedes albopictus* infected with Zika virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1075362, 4 jan. 2023.

JUPP, P. G. et al. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 15–19, jan. 1981.

KETKAR, H.; HERMAN, D.; WANG, P. Genetic Determinants of the Re-Emergence of Arboviral Diseases. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 150, 12 fev. 2019.

KHONGWICHIT, S. et al. Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, p. 84, 2 dez. 2021.

- KRAEMER, M. U. G. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 854–863, maio 2019.
- KRAMER, L. D.; CIOTA, A. T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. **Current opinion in virology**, v. 15, p. 112–118, dez. 2015.
- LAI, Z. et al. Vertical transmission of zika virus in *Aedes albopictus*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008776, 15 out. 2020.
- LAMBRECHTS, L. Does arbovirus emergence in humans require adaptation to domestic mosquitoes? **Current Opinion in Virology**, v. 60, p. 101315, 1 jun. 2023.
- LANCIOTTI, R. et al. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. **Emerging infectious diseases**, 2007.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, ago. 2008.
- LAPORTA, G. Z. et al. Global Distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a Climate Change Scenario of Regional Rivalry. **Insects**, v. 14, n. 1, p. 49, 3 jan. 2023.
- LAZEAR, H. M.; STRINGER, E. M.; DE SILVA, A. M. The Emerging Zika Virus Epidemic in the Americas: Research Priorities. **JAMA**, v. 315, n. 18, p. 1945–1946, 10 maio 2016.
- LEQUIME, S.; LAMBRECHTS, L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 681–690, 1 dez. 2014.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 36, 17 jun. 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, set. 2014.
- LO PRESTI, A. et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 270–278, jul. 2016.
- LUTOMIAH, J. et al. Probable contribution of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes to the circulation of chikungunya virus during an outbreak in Mombasa County, Kenya, 2017–2018. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, 5 mar. 2021.
- MAIA, L. M. S. et al. Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 3, p. 437–442, 18 fev. 2019.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, mar. 1954.

MANIMEGALAI; S SUKANYA. Original Research Article Biology of the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **International journal of current Microbiology and Applied Sciences**, v 4, n 3, p.718, 2014.

MANUEL, M.; MISSÉ, D.; POMPON, J. Highly Efficient Vertical Transmission for Zika Virus in *Aedes aegypti* after Long Extrinsic Incubation Time. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 366, 11 maio 2020.

MARKLEWITZ, M.; JUNGLEN, S. Evolutionary and ecological insights into the emergence of arthropod-borne viruses. **Acta Tropica**, v. 190, p. 52–58, 1 fev. 2019.

MARTÍNEZ, N. E. et al. Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 30, n. 2, p. 143–146, jun. 2014.

Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2016. Ministério da Saúde, v. 48, n. 3, p. 1-11, 2017.

Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2017. Ministério da Saúde, v. 49, n. 2, p. 1-13, 2018.

Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Ministério da Saúde, v. 50, n. 4, p. 1-14, 2019.

MAVALE, M. et al. Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1242–1244, dez. 2010.

MEHTA, R. et al. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. **Reviews in Medical Virology**, v. 28, n. 3, p. e1978, maio 2018.

MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, n. 2, p. 180–189, fev. 2010.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, jul. 2016.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. O595-596, out. 2014.

MWALIKO, C. et al. Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 1, p. 21–39, fev. 2021.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 abr. 2015.

OLIVEIRA, Maria Eduarda dos Santos Pereira de. Avaliação da transmissão vertical de arbovírus em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* coletadas na região metropolitana do Recife entre 2016-18 / Maria Eduarda dos Santos Pereira de Oliveira - 2021. 64 f.f.: il.;30 cm.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ global health**, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, 2018.

PHUMEE, A. et al. Vertical transmission of Zika virus in *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5257, 27 mar. 2019.

PEITER, P. C. et al. Zika epidemic and microcephaly in Brazil: Challenges for access to health care and promotion in three epidemic areas. **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0235010, 7 jul. 2020.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34–42, abr. 2020.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, jul. 2016.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 2, p. 471–479, fev. 2000.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. suppl 1, p. 11–17, 2013.

RIBEIRO, J.; FERNANDES, M. Revisão de literatura: **Revista ponto de vista**, v. 13, n. 1, p. 01-19, 8 mar. 2024.

RUSSO, G.; SUBISSI, L.; REZZA, G. Chikungunya fever in Africa: a systematic review. **Pathogens and Global Health**, v. 114, n. 3, p. 136–144, maio 2020.

RÜCKERT, C.; EBEL, G. D. How do virus-mosquito interactions lead to viral emergence? **Trends in parasitology**, v. 34, n. 4, p. 310–321, 1 abr. 2018.

RICHARDS, S. L.; ANDERSON, S. L.; SMARTT, C. T. Vector competence of Florida mosquitoes for chikungunya virus. **Journal of Vector Ecology**, v. 35, n. 2, p. 439–443, dez. 2010.

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

SANGEETA JANJOTER et al. Transovarial transmission of mosquito-borne viruses: a systematic review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 3 jan. 2024.

SATOTO, T. B. et al. Occurrence of Natural Vertical Transmission of “Zika like Virus” in *Aedes aegypti* Mosquito in Jambi City. Kesmas: **Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional**, v. 13, n. 4, p. 189–194, 1 jun. 2019.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.

SEMENZA, J. C.; ROCKLÖV, J.; EBI, K. L. Climate Change and Cascading Risks from Infectious Disease. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 11, n. 4, 19 maio 2022.

SMARTT, C. T. et al. Evidence of Zika virus RNA fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) field-collected eggs from Camaçari, Bahia, Brazil. **J Med Entomol**, v. 54, n. 4, p. 1085-1087, 2017

SCHAFFNER, F.; MATHIS, A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1271–1280, dez. 2014.

SHARMA, V. et al. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 87–98, fev. 2020.

SOUZA, W. M. et al. Chikungunya: a decade of burden in the Americas. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 30, p. 100673, 1 fev. 2024.

TESLA, B. et al. Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1884, p. 20180795, 15 ago. 2018.

THANGAMANI, S. et al. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1169–1173, 2 nov. 2016.

TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7872–7877, 10 maio 2011.

VAIRO, F. et al. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 1003–1025, dez. 2019.

VILELA, A. P. P. et al. Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 989–992, jun. 2010.

VIGLIETTA, M. et al. Vector Specificity of Arbovirus Transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 9 dez. 2021.

WANG, P.; ZHANG, R. Chikungunya Virus and (Re-) Emerging Alphaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 779, 24 ago. 2019.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZELLER, H.; VAN BORTEL, W.; SUDRE, B. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013-2014. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S436–S440, 15 dez. 2016.

ZIMLER, R. A.; ALTO, B. W. Vertical Transmission of Zika Virus by Florida *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Insects**, v. 14, n. 3, p. 289, 16 mar. 2023.

ZHU, C. et al. Vertical Transmission of Zika Virus by Jiegao and Mengding *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Strains in Yunnan Province in China. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 9, p. 664–669, 1 set. 2020.

WANG, P.; ZHANG, R. Chikungunya Virus and (Re-) Emerging Alphaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 779, 24 ago. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>.