



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

# **Análises proteômica e fosfoproteômica de células Aag-2 de *Aedes aegypti* infectadas com os arbovírus MAYV e CHIKV**

ANNA FERNANDA PINHEIRO  
DE VASCONCELLOS BRUM DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Co-orientador: Dr. Lucas Silva de Oliveira

Brasília, fevereiro de 2024



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Patologia Molecular

# **Análises proteômica e fosfoproteômica de células Aag-2 de *Aedes aegypti* infectadas com os arbovírus MAYV e CHIKV**

ANNA FERNANDA PINHEIRO  
DE VASCONCELLOS BRUM DE SOUZA

Exame de defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, associado à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular, na área de concentração Bioquímica dos Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau.

Co-orientador: Dr. Lucas Silva de Oliveira.

Brasília, fevereiro de 2024

## BANCA EXAMINADORA

Presidente:

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau  
Universidade de Brasília (UnB)

Membro 1:

Prof. Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araujo  
Universidade de Brasília (UnB)

Membro 2:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Juliana Alves Parente Rocha  
Universidade Federal de Goiás (UFG)

Membro 3:

Dr<sup>ª</sup> Rayane Nunes Lima  
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Sintética (INCT-BioSyn)

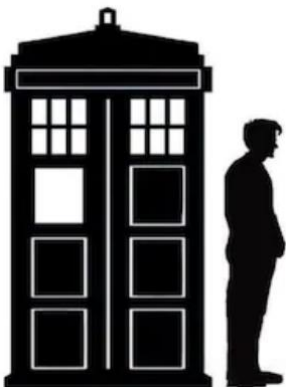
Suplente:

Dr. Reynaldo Magalhães Melo  
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

Local: Auditório 4 - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília

Data: 23/02/2024

Horário: 08 h 30



*“You want weapons?  
We’re in a library! Books!  
Best weapons in the world!”*

Doctor Who

# Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, e ao meu co-orientador, Dr. Lucas Silva de Oliveira, pela oportunidade, pela parceria e por todos os ensinamentos ao longo desses cinco anos. À Universidade de Brasília (UnB), ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Molecular (UnB), ao Instituto de Ciências Biológicas (UnB), à CAPES, ao CNPq, à FAP-DF e à Finep por proporcionarem espaços, materiais, equipamentos e profissionais qualificados que permitiram a realização deste estudo. À minha família (Valéria, Antônio, Clara e Victor) e à Giovanna Bampa por todo o apoio emocional e financeiro que me permitiram chegar até aqui. Ao Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende, aos meus amigos do Laboratório de Baculovírus (em especial, ao Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro) e do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, que foram essenciais no desenvolvimento do meu projeto. Aos amigos da Biologia (e agregados), de outros laboratórios e aos amigos de fora da UnB também. Ao Prof. Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araujo, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Anamélia Lorenzetti Bocca, à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Alves Parente Rocha, à Dr<sup>a</sup> Rayane Nunes Lima e ao Dr. Reynaldo Magalhães Melo pela presença nas minhas bancas de qualificação e/ou de defesa de Tese e pela contribuição no desenvolvimento do meu projeto. Agradeço também ao Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro – FIOCRUZ-RJ e ao Instituto Butantan pelas colaborações estabelecidas.

# Resumo

Mayaro virus (MAYV) e Chikungunya virus (CHIKV) são dois arbovírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* e que são transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti*. Enquanto o MAYV é endêmico da América do Sul, o CHIKV já foi responsável por epidemias em todo o globo. Os elevados números de casos de arboviroses pelo mundo e o fato de muitas populações de mosquitos serem resistentes a inseticidas levaram à necessidade de desenvolvimento de estratégias alternativas de controle desses vírus. Houve um aumento expressivo na quantidade de estudos focados na interação vírus-vetor, muitos deles analisando aspectos moleculares, como as proteínas envolvidas nessa interação. Neste sentido, o presente estudo abordou a análise proteômica de células Aag-2 de *Ae. aegypti* infectadas com CHIKV em multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 e tempos de coleta  $t = 0$  h, 12 horas pós-infecção (h p.i.) e 48 h p.i. As amostras, em triplicatas biológicas, foram identificadas por espectrometria de massas após redução, alquilação e digestão. Entre outros resultados, foi observada uma maior abundância de proteínas relacionadas à tradução em 12 h p.i., enquanto proteínas relacionadas à produção de energia, em 48 h p.i. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelaram, além de muitas partículas virais, mitocôndrias com formato alongado em 48 h p.i. Tal morfologia pode ser consequência de um provável desbalanço da rede mitocondrial decorrente da infecção viral, gerando uma maior demanda energética. Ademais, sabe-se que a fosforilação de proteínas está altamente relacionada à regulação espaçotemporal de diversos processos essenciais ao funcionamento dos organismos. Como os vírus sequestram a maquinaria celular do hospedeiro para sua própria replicação, espera-se encontrar uma modulação diferencial no padrão de fosforilação nas células infectadas. Assim, objetivou-se realizar uma análise fosfoproteômica de células Aag-2 infectadas com MAYV e CHIKV no presente trabalho. Foi realizada uma predição *in silico* de fosfoproteínas de *Ae. aegypti* e as 433 proteínas resultantes foram enriquecidas para processos como autofagia e via de sinalização MAPK. Para as análises experimentais, foram utilizados o MOI 1 e os tempos de coleta  $t = 0$  h, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i., em quadruplicatas biológicas. As proteínas extraídas a partir das células Aag-2 foram utilizadas para *Western Blot* e espectrometria de massas. Os ensaios de *Western Blot* contra anticorpos anti-fosfoserina, fosfotirosina e fosfotreonina apresentaram diferentes padrões de marcação na comparação por anticorpo. A partir do processamento do extrato total de proteínas para a espectrometria de massas e dessalinização, foi realizado o enriquecimento de fosfopeptídeos por colunas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Após a obtenção dos dados da análise por espectrometria de massas, a análise de bioinformática nos permitirá verificar a influência da infecção por MAYV e CHIKV sobre a homeostase das células hospedeiras de *Ae. aegypti* nas vias metabólicas que são reguladas por eventos de fosforilação.

**Palavras-chave:** arbovírus, *Aedes aegypti*, cultura de célula, espectrometria de massas, proteínas, fosforilação.

# Abstract

Mayaro virus (MAYV) and Chikungunya virus (CHIKV) are two arboviruses belonging to the genus Alphavirus and transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito. While MAYV is endemic to South America, CHIKV has been responsible for epidemics across the globe. The high number of arbovirus cases around the world and the fact that many mosquito populations are resistant to insecticides have led to the need to develop alternative strategies to control these viruses. There has been a significant increase in the number of studies focused on the virus-vector interaction, many of them analyzing molecular aspects, such as the proteins involved in this interaction. In this sense, the present study addressed the proteomic analysis of Aag-2 cells from *Ae. aegypti* infected with CHIKV at multiplicity of infection (MOI) 0.1 and collection times  $t = 0$  h, 12 hours post-infection (h p.i.) and 48 h p.i. The samples, in biological triplicates, were identified by mass spectrometry after reduction, alkylation, and digestion. Among other results, a greater abundance of proteins related to translation was observed at 12 h p.i., while proteins related to energy production were observed at 48 h p.i. Transmission electron microscopy images revealed, in addition to many viral particles, mitochondria with an elongated shape at 48 h p.i. This morphology may be a consequence of a probable imbalance in the mitochondrial network resulting from the viral infection, generating a greater energy demand. Furthermore, it is known that protein phosphorylation is highly related to the spatiotemporal regulation of several processes essential to the functioning of organisms. As viruses hijack the host's cellular machinery for their own replication, we expect to find a differential modulation in the phosphorylation pattern in infected cells. Thus, the aim was to perform a phosphoproteomic analysis of Aag-2 cells infected with MAYV and CHIKV in the present work. An *in silico* prediction of *Ae. aegypti* phosphoproteins was performed and the resulting 433 proteins were enriched for processes such as autophagy and the MAPK signaling pathway. For experimental analyses, MOI 1 and collection times  $t = 0$  h, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. were used. and 12 h p.i., in biological quadruplicates. Proteins extracted from Aag-2 cells were used for Western blot and mass spectrometry. Western blot assays against anti-phosphoserine, phosphotyrosine, and phosphothreonine antibodies showed different staining patterns when compared by antibody. From the processing of the total protein extract for mass spectrometry and desalination, the enrichment of phosphopeptides was carried out using titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) columns. After obtaining data from mass spectrometry analysis, bioinformatics analysis will allow us to verify the influence of MAYV and CHIKV infection on the homeostasis of *Ae. aegypti* host cells in metabolic pathways that are regulated by phosphorylation events.

**Keywords:** arbovirus, *Aedes aegypti*, cell culture, mass spectrometry, proteins, phosphorylation.

# Sumário

	página
<b>Capítulo 1. Introdução</b> .....	10
1.1. Aspectos gerais dos vírus .....	10
1.2. Aspectos gerais dos arbovírus .....	10
1.3. <i>Alphavirus</i> .....	12
1.3.1. Chikungunya vírus .....	15
1.3.2. Mayaro vírus .....	16
1.4. O vetor <i>Aedes aegypti</i> .....	17
1.5. Resistência a inseticidas .....	19
1.6. Interação vírus-vetor .....	23
1.7. Células Aag-2 de <i>Aedes aegypti</i> .....	25
1.8. Vias de transdução de sinal e infecções arbovirais .....	26
1.9. Modificações pós-traducionais .....	30
1.10. A fosforilação de proteínas .....	31
1.10.1. O estudo de fosfoproteínas .....	33
1.11. Objetivo geral e hipótese geral .....	36
1.12. Escopo da tese .....	36
<b>Capítulo 2. Modulação do proteoma de células Aag-2 de <i>Aedes aegypti</i> em resposta à infecção pelo vírus Chikungunya</b> .....	37
2.1. Resumo .....	37
2.2. Artigo científico .....	37
<b>Capítulo 3. Análise fosfoproteômica de células Aag-2 de <i>Aedes aegypti</i> infectadas com os arbovírus MAYV e CHIKV</b> .....	53
3.1. Panorama geral.....	53
3.2. Justificativa .....	54
3.3. Objetivo e metas .....	55
3.3.1. Objetivo .....	55
3.3.2. Metas .....	55
3.4. Materiais e métodos .....	56
3.4.1. Predição <i>in silico</i> de proteínas fosforiladas de <i>Aedes aegypti</i> por homologia com organismos modelo eucarióticos.....	56
3.4.2. Cultura celular .....	57
3.4.3. Vírus .....	57
3.4.4. Cinética de crescimento em células Aag-2 .....	58
3.4.5. Infecção das células Aag-2, coleta e extração das proteínas.....	60
3.4.6. Imunodeteção das proteínas fosforiladas por <i>Western Blot</i> .....	60
3.4.7. Preparo das amostras para espectrometria de massas .....	61
3.4.8. Dessalinização .....	61
3.4.9. Enriquecimento de fosfopeptídeos .....	62
3.4.10. Etapas futuras: espectrometria de massas e análise bioinformática .....	63



	<b>página</b>
<b>3.5. Resultados</b> .....	64
3.5.1. Predição <i>in silico</i> de proteínas fosforiladas de <i>Aedes aegypti</i> por homologia com organismos modelo eucarióticos .....	64
3.5.2. Cinética de crescimento de MAYV e CHIKV em células Aag-2 .....	72
3.5.3. Imunodeteccção das proteínas fosforiladas por <i>Western Blot</i> .....	77
3.6. Discussão .....	80
3.6.1. Predição <i>in silico</i> de proteínas fosforiladas de <i>Aedes aegypti</i> por homologia com organismos modelo eucarióticos .....	80
3.6.2. Cinética de crescimento de MAYV e CHIKV em células Aag-2 .....	85
3.6.3. Imunodeteccção das proteínas fosforiladas por <i>Western Blot</i> .....	86
3.7. Conclusões e perspectivas .....	88
<b>Capítulo 4. Considerações finais e perspectivas gerais</b> .....	90
<b>Referências bibliográficas</b> .....	95
<b>Lista de figuras</b> .....	108
<b>Lista de tabelas</b> .....	111
<b>Abreviações e símbolos</b> .....	112
<b>Anexos</b> .....	115

# Capítulo 1.

## Introdução

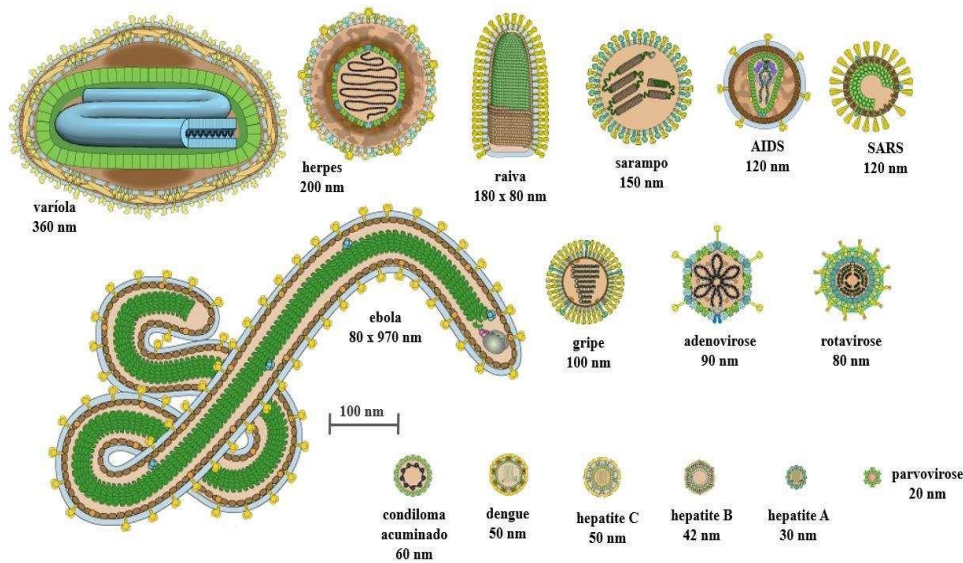
### 1.1. Aspectos gerais do vírus

Os vírus são agentes infecciosos que agem como parasitas intracelulares obrigatórios, visto que não possuem estrutura celular própria (Eisenreich et al., 2019). Apesar de existir uma grande diversidade de vírus, muitos apresentam em comum o material genético envolto por uma capa proteica, denominado nucleocapsídeo (Summers, 2009). Por serem acelulares, os vírus têm a necessidade de utilizar a maquinaria estrutural e bioenergética de produção proteica de seu hospedeiro (Eisenreich et al., 2019). Ao final da replicação viral, durante a liberação de novas partículas, alguns tipos de vírus ficam recobertos pela membrana plasmática da célula hospedeira, formando um envelope lipoproteico. Já foram descritos genomas virais formados por RNA ou/e DNA, de fita simples ou dupla, senso positivo ou negativo, podendo ser linear ou mesmo circular (Gelderblom, 1996). Os vírus também podem apresentar diversos tamanhos e formatos (**Figura 1.1**), além de possuírem a capacidade de infectar desde seres procarióticos a eucariotos complexos (Summers, 2009), até mesmo outros vírus (Paez-Espino et al., 2019). Uma infecção viral pode ser assintomática, assim como pode causar sintomas leves, moderados e, em casos mais extremos, levar à morte do seu hospedeiro (Huang et al., 2019). As formas de transmissão viral também são diversas, havendo vírus que são transmitidos pelo ar (*Varicella zoster virus*), por contato direto com um indivíduo contaminado (*Herpes simplex virus*), por via fecal-oral (*Rotavirus A*) ou por meio de vetores (*Yellow fever virus* - YFV) (Louten, 2016).

### 1.2. Aspectos gerais dos arbovírus

A palavra arbovírus surgiu do termo em inglês *arthropod-borne virus* e faz referência aos vírus que são transmitidos por um vetor artrópode ao seu organismo hospedeiro (Madewell, 2020). Por ser um grupo criado artificialmente, esses vírus podem possuir ou não relação taxonômica. Além de se replicar e causar doença nos hospedeiros, os arbovírus também realizam parte de seu ciclo reprodutivo no próprio vetor artrópode. Porém, para que o vírus seja disseminado de maneira eficiente, não é vantajoso que muitos

danos sejam causados ao vetor (Viglietta et al., 2021).



**Figura 1.1. Diversidade de formas e tamanhos de vírus que causam doenças de em humanos.** As doenças causadas e os tamanhos dos seus respectivos agentes infecciosos virais são apresentados. Adaptado de ViralZone – *Human virus relative size*.

No caso de vetores como mosquitos e carrapatos, esses vírus chegam por meio da alimentação do sangue de vertebrados infectados. Assim, em geral, precisam vencer a barreira epitelial do intestino médio, alcançar as glândulas salivares e nelas se replicarem para que possam ser transmitidos (Conway et al., 2014). Nesse processo, apesar de a infecção ser persistente, os arbovírus não causam grandes prejuízos ao seu vetor. Por outro lado, ao serem introduzidos em hospedeiros como macacos ou humanos, por meio do repasto sanguíneo do vetor hematófago, as partículas virais são diretamente injetadas com a saliva na circulação sanguínea, tendo acesso fácil e rápido a diversas partes do corpo (Dégallier et al., 1998).

As famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Bunyaviridae* abrigam os vírus transmitidos por artrópodes a diversos tipos de hospedeiros. Das mais de 500 espécies de arbovírus conhecidas atualmente, cerca de 150 causam doenças em humanos (Madewell, 2020). Devido a uma união entre fatores ecológicos, sociais, econômicos e tecnológicos, a frequência e a magnitude das epidemias causadas por arbovírus vêm aumentando, em especial dos arbovírus transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes* (World Health Organization, 2022). Como exemplo, pode-se observar um aumento no

número de ocorrências anuais causadas por Dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV) e Zika virus (ZIKV), todos transmitidos por *Aedes aegypti* (Kantor, 2016; Monteiro et al., 2020). Segundo a Organização de Saúde Pan-Americana, em todo o ano de 2022 foram registrados mais de 3 milhões de casos de arboviroses apenas nas Américas, um aumento de 18,5% comparado a 2021 (Annual Arbovirus Bulletin, 2021). Atualmente, as arboviroses são um grave problema de saúde pública em todo o mundo.

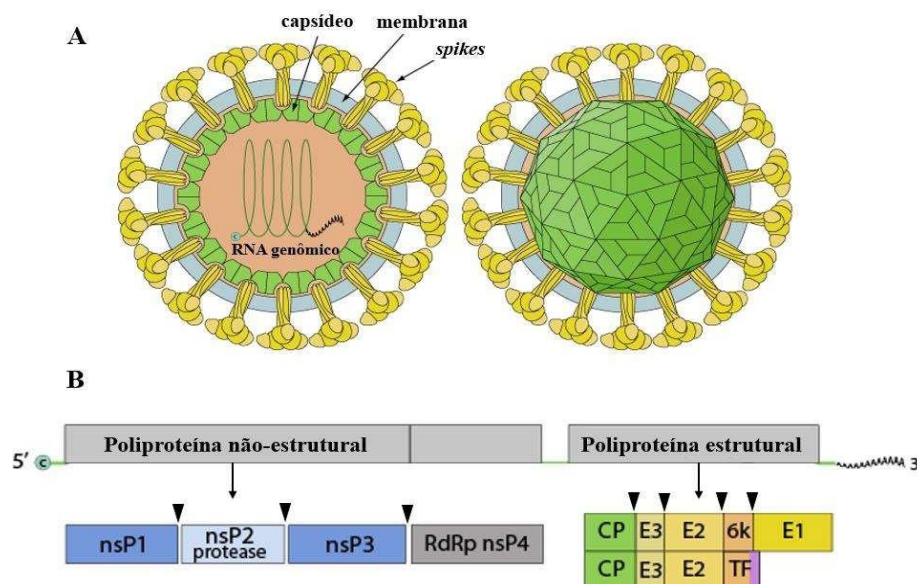
### 1.3. *Alphavirus*

Dentro da família de arbovírus *Togaviridae*, o gênero *Alphavirus* inclui mais de 30 espécies que causam doenças tanto em humanos quanto em animais como macacos, equinos, pássaros e anfíbios (Weaver et al., 2012). *Sindbis virus* é a espécie tipo desse gênero e muito do que se sabe sobre alfavírus foi estudado a partir dele (Gylfe et al., 2018). Alguns outros representantes desse gênero são vírus das espécies *Chikungunya virus*, *O'nyong-nyong virus*, *Ross river virus*, *Semliki Forest virus* e *Mayaro virus* (Madewell, 2020).

O genoma dos alfavírus é de RNA fita única senso positivo, entre 11,4 e 11,8 kilobases (kB), com cap-5' e cauda poli-A (Rupp et al., 2015). Duas fases de leitura codificam as poliproteínas estrutural e não-estrutural, que são clivadas por proteases virais e da célula hospedeira em proteínas estruturais e não-estruturais (**Figura 1.2A**). As proteínas não-estruturais (nsP 1-4) realizam funções como replicação do RNA viral, clivagem das poliproteínas e adição do cap-5'. Essas proteínas não são encontradas nas partículas virais, apenas na célula em replicação viral (Zaid et al., 2021). Já as proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, 6k/TF, E1) são expressas a partir de um RNA subgenômico e formam o nucleocapsídeo, juntamente com o RNA genômico. Glicoproteínas E1 e E2 formam 80 trímeros na superfície da partícula icosaédrica de geometria T=4, que é composta por 240 monômeros da proteína capsídeo (**Figura 1.2B**) (Zaid et al., 2021). Os vírions possuem diâmetro aproximado entre 65 e 70 nm (Sokoloski et al., 2013).

As glicoproteínas E2 e E1, que possuem glicanos *N-linked*, são responsáveis, respectivamente, pela aderência a receptores da célula hospedeira e pela entrada dos nucleocapsídeos na célula por meio de endossomos (Weaver et al., 2012). Durante o

processo de entrada na célula, essas proteínas sofrem uma mudança conformacional. Já os peptídeos E3 e 6k servem como guias para as proteínas E1 e E2. As proteínas não estruturais apresentam funções como metiltransferase e guaniltransferase (nsP1), helicase e protease (nsP2), fosfoproteína integral na síntese de fitas de RNA senso negativo – fita molde para o RNA viral senso positivo (nsP3), além de da RNA polimerase dependente de RNA (nsP4) (Powers et al., 2012). A fosforilação da nsP3 já foi detectada em alfavírus como Sindbis virus (SINV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), O'nyong-nyong virus (ONNV) e Chikungunya virus (CHIK) (Li et al., 1990; Peranen et al., 1988; Bakovic et al., 2020; Teppor et al., 2021). No caso do CHIKV, a substituição dos resíduos de aminoácidos 20 e 26, que são fosforilados, levou a uma diminuição da atividade do complexo replicativo viral. Já a substituição de todos os resíduos fosforiláveis impediu a replicação viral, ambos os casos em células de mamíferos (Teppor et al., 2021). A replicação do genoma viral, a expressão proteica e a montagem de novos capsídeos ocorrem no citoplasma celular, processo que leva cerca de 4 h no total (Oliveira Mota et al., 2015). O brotamento de novos vírions ao final da replicação ocorre pela membrana plasmática da célula hospedeira. Nos artrópodes, tal processo também já foi observado em vesículas internas (Gliedman et al., 1975).

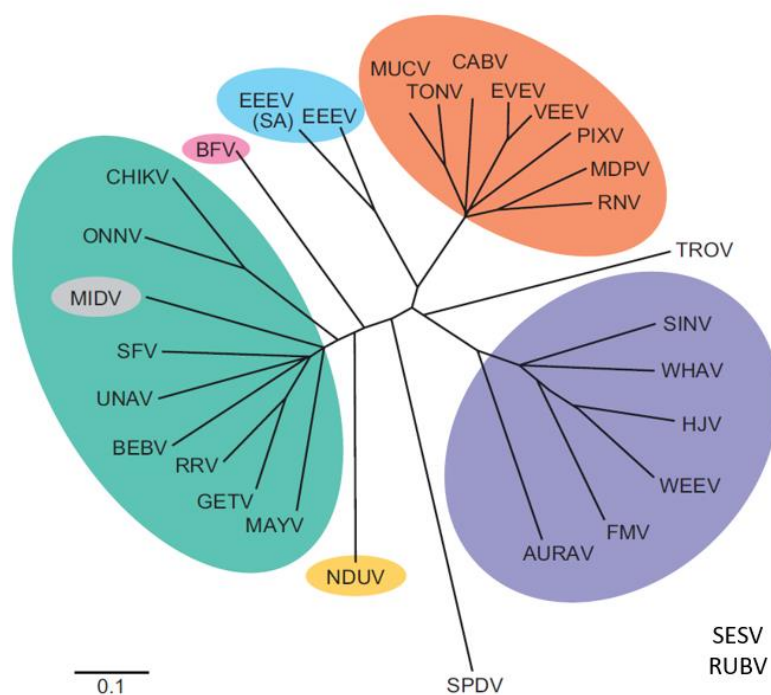


**Figura 1.2. Partícula viral e genoma de um alfavírus.** **A.** O capsídeo icosaédrico com *spikes* é mostrado, envolto por uma membrana e com o RNA genômico encapsidado. **B.** Esquema resumido de proteínas não-estruturais e estruturais que são produzidas a partir das duas poliproteínas dos alfavírus e clivadas ao longo da infecção. O RNA genômico possui cap 5' e cauda poli-A. Adaptado de ViralZone - Alphavirus.

Os alfavírus causam doenças reemergentes, que ficam períodos de tempo sem

causar grandes problemas de saúde pública, mas que podem mudar de comportamento epidemiológico e voltar a representar ameaças (Abdelnabi e Delang, 2020). Essa característica pode se dar por fatores como a introdução dos vírus em novas populações suscetíveis ou a diminuição dos cuidados de prevenção a essas doenças (Conway et al., 2014). Devido à enorme imprevisibilidade no surgimento de epidemias, as arboviroses, em geral, estão continuamente no foco de estudos científicos e medidas sanitárias de prevenção (Olivia et al., 2015).

Neste trabalho estudaremos os alfavírus MAYV e CHIKV. Como pode ser observado na **Figura 1.3**, ambos são agrupados no mesmo complexo antigênico do vírus Semlik Forest por homologia entre o gene de suas proteínas E1. A espécie tipo SINV foi agrupada em outro complexo. Espécies alfavirais distintas dentro do mesmo complexo antigênico apresentam um mínimo de 21 % de divergência na sequência nucleotídica e pelo menos 8 % de divergência na sequência de aminoácidos. Por outro lado, apresentam divergência na sequência nucleotídica menor que 38 % de divergência na sequência de aminoácidos menor que 40 %, já que esses são os limites para categorizar as espécies em complexos antigênicos distintos (Powers et al., 2012).



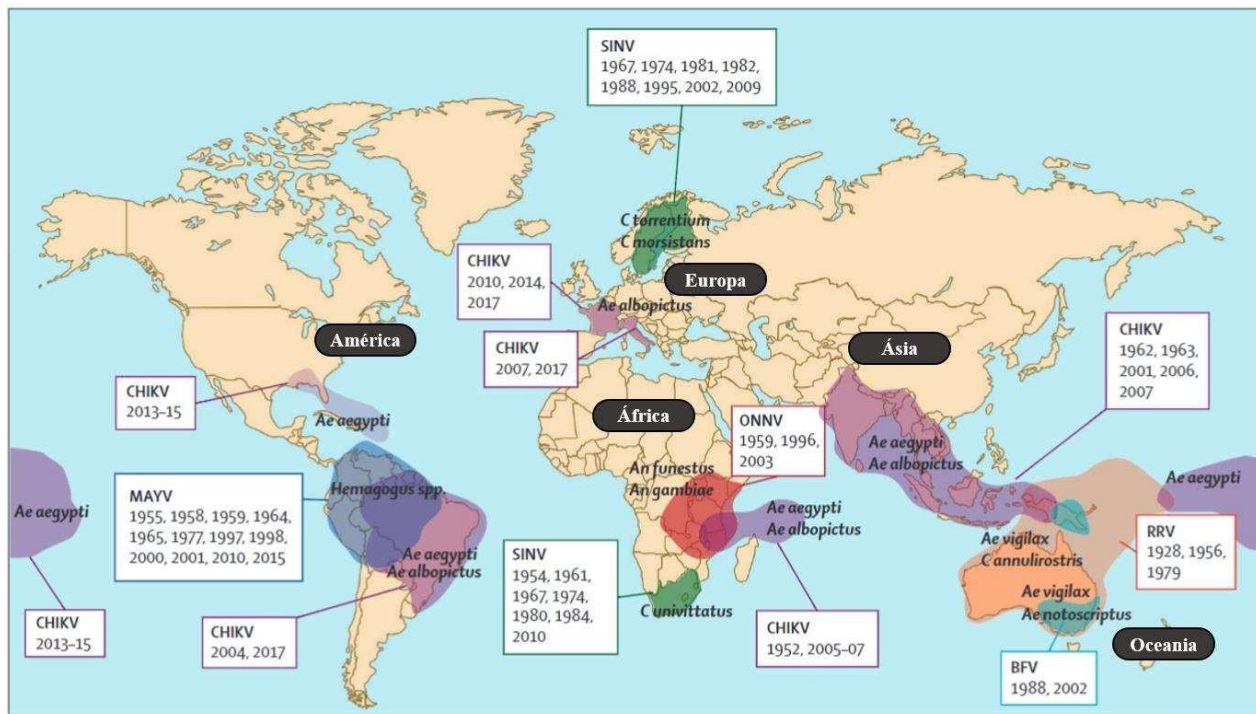
**Figura 1.3. Árvore filogenética das espécies de alfavírus.** Todas as espécies de alfavírus foram agrupadas em complexos antigênicos nessa árvore filogenética não enraizada a partir da do gene da proteína E1, usando o algoritmo F84. SESB e RUBV não apresentam sequências homólogas a E1. Adaptado a partir de Powers et al. (2012).

### 1.3.1. Chikungunya virus

O CHIKV foi primeiramente identificado na Tanzânia, em 1952 (Donalisio et al., 2017). Em 2004, ocorreu o início de sua expansão pandêmica que teve início no Quênia e atingiu mais de 60 países na África, Ásia, Europa e nas Américas (**Figura 1.4**) (Madewell, 2020). Inicialmente, o CHIKV era transmitido nas cidades apenas pelo vetor *Ae. aegypti*, mas a mutação E1-A226V (substituição de uma alanina por uma valina na posição 226 da proteína E1) sofrida na linhagem Africana a adaptou também à transmissão por *Aedes albopictus*. Enquanto o *Ae. aegypti* está presente em regiões tropicais e subtropicais, o *Ae. albopictus* sobrevive em regiões temperadas, aumentando assim a área de expansão do CHIKV e o risco de epidemias em novas regiões (Nunes et al., 2015).

A febre CHIKV tem taxa de infecção sintomática acima de 90%, a qual pode se apresentar nas formas de fase aguda e crônica (Azar et al., 2020). Na fase aguda, observa-se febre alta, artralgia intensa nas articulações de mãos e pés, mialgia, poliartrite e exantema. Na fase crônica, que pode durar por meses e até anos, os possíveis sintomas incluem poliartralgia e artropatias que se assemelham à Artrite Reumatoide, sendo uma doença altamente dolorosa e debilitante (Castro et al., 2016). O próprio termo “Chikungunya” pertence à língua africana Kimakonde e significa “aquele que se contorce”, fazendo alusão à dor provocada. Ainda não há antivirais específicos ou vacinas aprovadas para CHIKV (World Health Organization, 2020).

No Brasil, a transmissão autóctone do CHIKV foi detectada em 2014 no Amapá. No ano de 2015, uma severa epidemia atingiu o país, com mais de um milhão de casos notificados em diversos estados brasileiros (Figueiredo, 2017). Em 2016, o Brasil foi o país com o maior número de casos registrados de febre CHIKV na América do Sul (World Health Organization, 2020). De acordo com a Organização de Saúde Pan-Americana, no final de 2022, os países que mais apresentaram casos de febre CHIKV foram Brasil, Belize, Paraguai e Guatemala (Annual Arbovirus Bulletin, 2021).



**Figura 1.4. Distribuição mundial das principais epidemias causadas por alguns alfavírus, como CHIKV e MAYV, assim como os seus principais vetores.** Apesar de o MAYV ser originalmente transmitido por *Haemagogus spp.*, ele também pode ser transmitido por mosquitos de diferentes gêneros, incluindo o *Aedes aegypti*, amplamente distribuído pelo Brasil. SINV: Sindbis virus, ONNV: O’Nyong-Nyong virus, BFV: Barmah Forest virus, RRV: Ross River virus. Adaptado de Zaid et al. (2021).

### 1.3.2. Mayaro virus

O MAYV foi isolado pela primeira vez em 1954, a partir de trabalhadores florestais em Trindade e Tobago e, desde então, vem causando epidemias esparsas em países como Bolívia, Peru, Venezuela e Brasil, sendo que a primeira epidemia de MAYV no Brasil foi reportada em 1957 (**Figura 1.4**) (Lopes et al., 2014; Mourão et al., 2012). Enquanto mosquitos do gênero *Haemagogus* representam os principais vetores silvestres do MAYV, sua transmissão já foi detectada em mosquitos de diversos gêneros assim como o *Ae. aegypti*, o vetor urbano mais bem estabelecido no Brasil (Pereira Serra et al., 2016).

Já foi observado que, em temperaturas mais elevadas (países subtropicais e tropicais, como o Brasil), o MAYV apresenta um período extrínscico de incubação em mosquitos *Ae. aegypti* mais reduzido do que em temperaturas mais amenas (Alomar e Alto, 2022). Na última década, a presença de anticorpos neutralizantes contra o MAYV



em soro de primatas do Mato Grosso do Sul foi demonstrada, sugerindo a circulação desse vírus na região. Por afetar majoritariamente a população rural de países da América do Sul, o MAYV foi historicamente pouco estudado (Lopes et al., 2014). Os sintomas mais comuns de pacientes com a febre Mayaro aguda duram de 3 a 5 dias e incluem febre, dor de cabeça, dor muscular, irritação na pele e artralgia. Já a convalescença decorrente da infecção pode durar algumas semanas. A dor nas articulações é descrita como severa nas articulações maiores e o *rash* na pele é a manifestação que caracteriza o fim da infecção (Mourão et al., 2012). Miocardite e complicações mais severas são eventos raros (Pinheiro et al., 1981). Assim como para o CHIKV, ainda não existem vacinas ou antivirais específicos para o MAYV (Azar et al., 2020).

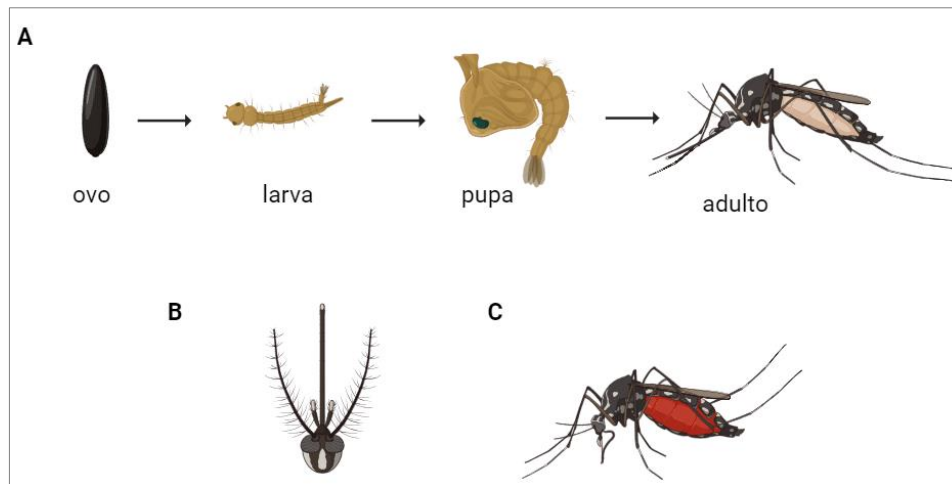
No geral, o diagnóstico preciso dessas viroses é limitado a testes sorológicos ou à detecção de seu material genômico via RT-PCR (Zaid et al., 2021). Por causarem sintomas inespecíficos na fase aguda, como dor de cabeça e febre, não é incomum a ocorrência de diagnósticos clínicos equivocados. Estima-se que 1% dos casos diagnosticados como dengue no Norte da América do Sul tenham sido, na realidade, causados pelo MAYV (Oliveira Mota et al., 2016). Além disso, é recorrente que arbovírus diferentes tenham áreas de incidência compartilhadas (Azar et al., 2020).

#### **1.4. O vetor *Aedes aegypti***

Originalmente, os arbovírus infectavam hospedeiros que vivam nas florestas, com infecções humanas eventuais. Porém, o desenvolvimento das cidades e a mudança no padrão de comportamento das comunidades humanas ao longo dos séculos levaram à diferenciação dos ciclos selvático e urbano das arboviroses (Weaver et al., 2012). Esses ciclos são contínuos e interligados e envolvem o vírus, seu vetor e seu hospedeiro (Huang et al., 2019). Assim, apesar de a hematofagia ser um hábito raro entre os insetos, o ciclo urbano de transmissão de arbovírus tornou-se um grave problema de saúde pública. Até 2050 estima-se que 66% da população mundial habite em centros urbanos, proporcionando assim uma maior densidade populacional para a alimentação dos mosquitos nessas áreas (UN, 2015).

Os arbovírus de maior relevância para a saúde humana são transmitidos por insetos da família Culicidae, principalmente mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* (Conway et al., 2014). O *Ae. aegypti*, que chegou às Américas por meio de navios oriundos da África que traziam pessoas escravizadas, atualmente é um mosquito bastante promíscuo das zonas urbanas (Huang et al., 2019). Esse vetor é competente na transmissão de diversos arbovírus como MAYV, CHIKV, DENV, YFV e ZIKV. O *Ae. aegypti*, além de ter uma marcante preferência por sangue humano devido ao odorante sulcatona (McBride et al., 2014), habita nos arredores e interiores de casas e apartamentos. Essa proximidade excessiva entre o mosquito e a população humana posa um desafio adicional no controle das arboviroses (Madewell, 2020).

O vetor *Ae. aegypti* possui quatro estágios de vida, sendo três estágios imaturos (ovo, larva e pupa) e o adulto (**Figura 1.5, A**). A existência de água armazenada em recipientes ou locais abertos é necessária para o desenvolvimento das fases imaturas (Jorge et al., 2019). O mosquito adulto mede cerca de 1 cm e possui listras brancas pelo corpo, característica marcante para diferenciá-lo de outros mosquitos. Apenas as fêmeas se alimentam de sangue humano (**Figura 1.5, C**), já que necessitam de nutrientes adicionais para a produção de ovos (Harrington et al., 2001). A cada repasto sanguíneo, a fêmea ingere cerca de 3 µl de sangue, podendo contaminar o humano - ou outros animais - ou ser contaminada por mais de uma espécie de arbovírus simultaneamente (Madewell, 2020). Uma vez contaminada, a fêmea possui a capacidade de transmitir o vírus para a sua prole de forma transovariana, além de poder transmiti-lo pelo resto de sua vida a organismos em que faz repasto sanguíneo. A circulação do *Ae. aegypti* é intensificada no verão, devido à combinação de temperaturas mais elevadas e períodos chuvosos, intensificando-se também a ocorrência das arboviroses (Pascoe et al., 2022).

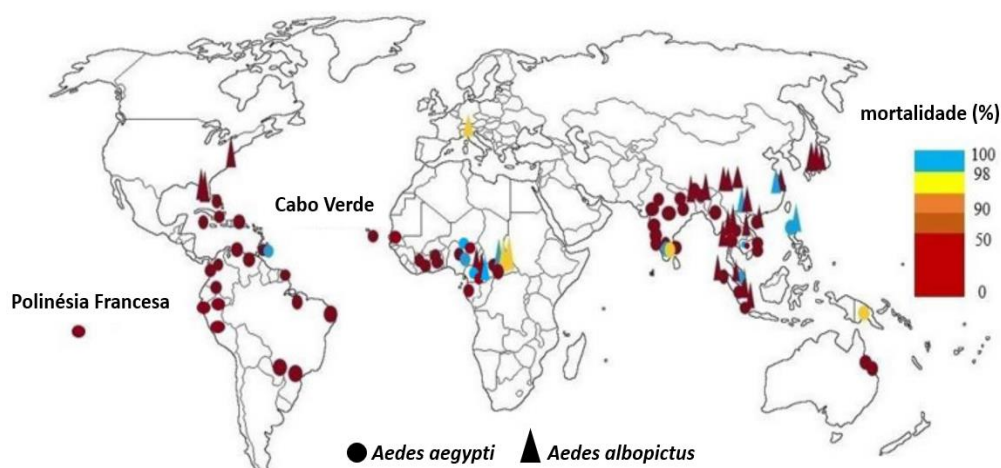


**Figura 1.5. Características morfológicas do vetor viral *Aedes aegypti*.** A: estágios imaturos (ovo, larva e pupa), que dependem da disponibilidade de água parada para o seu desenvolvimento, e maduro (adulto) do ciclo de vida desse mosquito. B: probóscide, aparelho bucal sugador. C: fêmea após repasto sanguíneo. Imagem criada no BioRender.

### 1.5. Resistência a inseticidas

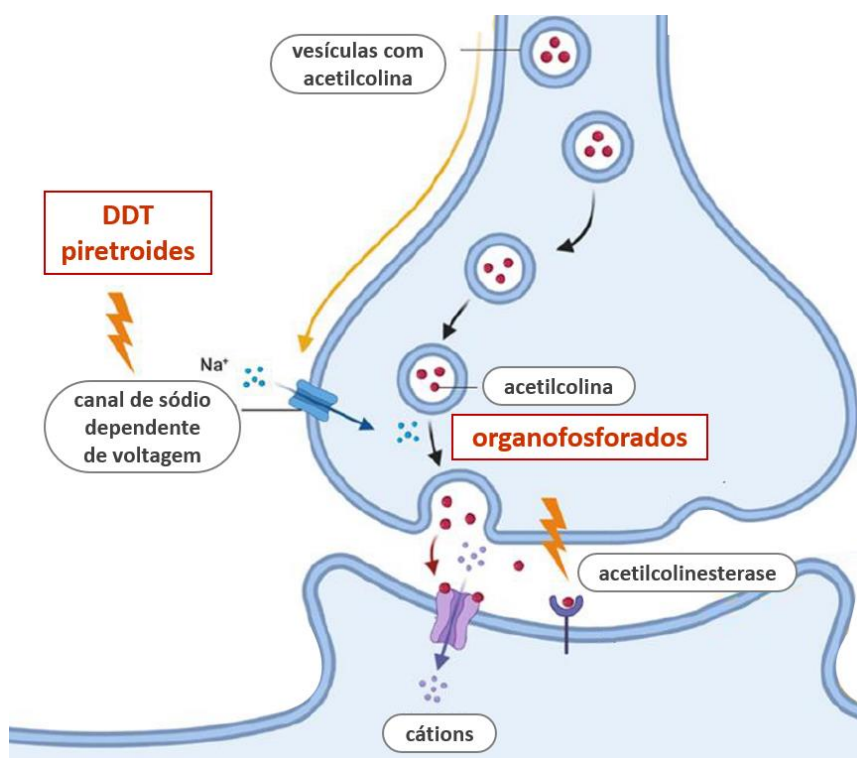
Durante muitos anos, o combate às arboviroses foi restrito à tentativa de erradicação do *Ae. aegypti*, com a eliminação dos focos de oviposição e a aplicação disseminada de inseticidas organofosforados, organoclorados e piretroides (Braga e Valle, 2007). Contudo, além dessas ações demandarem constantes esforços da população e elevados investimentos por parte do governo, são medidas que, isoladamente, podem não ser eficazes a longo prazo devido à facilidade de repovoamento do mosquito (Vargas et al., 2022). Além disso, a seleção de indivíduos resistentes aos inseticidas é um risco adicional, já que naturalmente existe uma variação entre organismos da mesma espécie que são mais suscetíveis ou mais resistentes a determinado composto (Moreira et al., 2009). Com o uso continuado do mesmo inseticida, os mosquitos que sobrevivem e se reproduzem são aqueles que já possuíam características genéticas e metabólicas que os permitiram sobreviver mesmo que sob exposição a tal substância (Asgarian et al., 2023). Como os insetos possuem ciclos de vida breves e produzem uma prole numerosa, eles conseguem se adaptar a situações de estresse como a presença de inseticidas em curto prazo (Araújo et al., 2023). Assim, o uso dos inseticidas vem selecionando artificialmente mosquitos resistentes e permitindo que estes se tornem a maior parte da população, levando assim à perda da sua eficiência, como aconteceu com o temefós, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e a deltametrina (Braga e Valle, 2007; Valle et al., 2019).

Os inseticidas organoclorados constituem o grupo utilizado há mais tempo no mundo. Um exemplo é o DDT, composto cuja aplicação no controle de vetores de doenças levou Paul Muller a ganhar o Prêmio Nobel de Medicina em 1948 por trabalhos iniciados na década de 1930 (Braga e Valle, 2007; Araújo et al., 2023). Contudo, o DDT, é um composto cancerígeno persistente no meio ambiente – que é repassado a outros organismos em uma cadeia alimentar, além de que populações de mosquito em diversas partes do mundo, como no Brasil, são resistentes a ele (**Figura 1.6**) (Vargas et al., 2022; Asgarian et al., 2023). Em relação aos prejuízos causados à saúde humana em consequência do uso do DDT, já foram observados vários tipos de câncer, danos neurológicos permanentes, danos em pulmões e órgão reprodutores e até mesmo malformações congênitas (Thuy, 2015). Já o pesticida organofosforado temefós vem sendo utilizado como larvicida desde a década de 1960, sendo que os primeiros relatos de resistência a ele surgiram na década de 1990 (Vargas et al., 2022). Os organofosforados, que correspondem a cerca de 50 % de todos os inseticidas utilizados mundialmente (Araújo et al., 2023), apesar de serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos biológicos, são neurotóxicos e muito instáveis quimicamente (Braga e Valle, 2007). Hoje, em todas as regiões do Brasil são encontrados mosquitos *Aedes* resistentes ao temefós e à deltametrina, um piretroide utilizado contra o mosquito adulto (Valle et al., 2019). Os piretroides, descobertos no final da década de 1940, apesar de não afetarem tanto seres terrestres e aéreos, são altamente tóxicos para os seres aquáticos e têm um custo muito elevado (Braga e Valle, 2007).



**Figura 1.6.** Mapa de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* resistentes ao inseticida DDT entre as populações estudadas por Asgarian et al. (2023). Quanto menor a taxa de mortalidade (vermelho) dos mosquitos, maior a taxa de resistência ao DDT. Adaptado de Asgarian et al. (2023).

Os principais alvos de ação conhecidos dos organoclorados, organofosforados, piretroides e de mais outras cinco classes de inseticidas são os componentes proteicos e enzimáticos do sistema nervoso central e periférico (Araújo et al., 2023). Organoclorados como o DDT interrompem a transmissão de impulsos nervosos por meio de um desbalanceamento entre íons de sódio e potássio (**Figura 1.7**) (Jayaraj et al., 2016). Os piretroides, em geral, atuam nas membranas dos neurônios de forma a atrasar o fechamento de canais de sódio. A deltametrina é um piretroide tipo II, provocando um efeito prolongado de permeabilidade do neurônio que leva a sinais repetitivos em órgãos e nervos sensoriais e nos músculos (National Pesticide Information Center). Já os organofosforados reagem com a enzima acetilcolinesterase, levando à fosforilação do resíduo de serina de seu sítio ativo, o que a torna irreversivelmente inibida (Menozzi et al., 2004). Tal mecanismo resulta em acúmulo de acetilcolina nas junções neuromusculares, o que provoca paralisia e morte (Rathnayake e Northrup, 2016). Outras classes de inseticidas também possuem alvos metabólicos e reguladores do crescimento (Araújo et al., 2023).



**Figura 1.7. Componentes do sistema nervoso que são alvos de alguns inseticidas.** DDT e piretroides (deltametrina): canais de sódio. Organofosforados (temefós): enzima acetilcolinesterase. Adaptado de Araújo e colaboradores (2023).

A resistência a inseticidas pode ter múltiplas origens, como fatores biológicos, ecológicos e até mesmo as práticas operacionais de aplicação dessas substâncias (Araújo et al., 2023). Os principais fatores biológicos que levam à resistência às três classes inseticidas citadas são mecanismos genéticos (mutações pontuais) e metabólicos (resistência metabólica) (Vargas et al., 2022). Nas mutações pontuais, por exemplo, pode ocorrer uma mudança estrutural do alvo do inseticida devido à mudança na sequência de seus aminoácidos, fazendo o inseticida não atuar como previsto, que é o caso do DDT e dos piretroides (Asgarian et al., 2023). Em relação aos organofosforados e carbamatos (classe de inseticida análoga aos organofosforados no quesito substrato), já foram detectadas sete mutações pontuais no gene da acetilcolinesterase de populações naturais de *Drosophila* que estão envolvidas na resistência a esses inseticidas (Villatte et al., 2000). Já na resistência metabólica, que já foi observada em mosquitos expostos a todos os inseticidas utilizados no controle de vetores, ocorre uma super expressão de enzimas capazes de quebrar as moléculas do inseticida antes dele chegar em seu sítio de ação (Asgarian et al., 2023).

Dos 5 inseticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde, 4 são da classe dos piretroides (Braga e Valle, 2007), tendo a resistência a essa classe sido observada menos de uma década após o início do seu uso (Forattini, 1986). No Brasil, a deltametrina vem sendo substituída pelo organofosforado *malathion*, contudo, essa classe também é utilizada no controle dos vetores da malária, da leishmaniose e da doença de Chagas, facilitando o surgimento de resistência nos artrópodes que transmitem os patógenos causadores dessas doenças (Valle et al., 2019). Além do mais, o *malathion* também possui efeitos neurotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos, tanto em humanos quanto em animais (Araújo et al., 2023). Há lugares do mundo em que as populações de mosquitos já são resistentes à maioria dos inseticidas disponíveis, inclusive a substâncias que não são mais utilizadas há décadas (Asgarian et al., 2023). Atualmente, a recomendação é realizar um levantamento geográfico a respeito da resistência em mosquitos previamente à aplicação e realizar um rodízio de inseticidas de curto a médio prazo, para evitar a seleção de indivíduos resistentes (Asgarian et al., 2023).

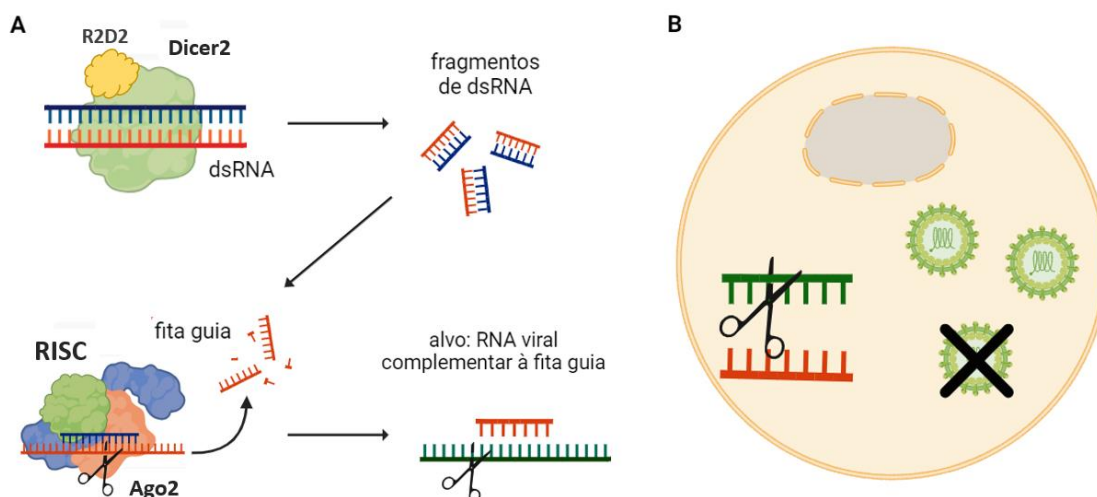
Diante desse cenário, surgiu a necessidade de desenvolver novas formas de combater as arboviroses, complementares à erradicação do mosquito, mas que focassem em outros aspectos da fisiologia dos mosquitos e/ou na interação dos vírus com seus vetores e seus hospedeiros. Uma alternativa desenvolvida foi transfectar mosquitos *Ae.*

*aegypti* com bactérias *Wolbachia spp.* e liberá-los no ambiente regularmente, sendo o Brasil um dos dez países em que esse procedimento já foi utilizado (Slatko et al., 2014; Lee et al., 2019). Tais bactérias não ocorrem naturalmente na microbiota desse mosquito. A depender da espécie e da cepa utilizadas na transfecção, pode-se reduzir o tempo de vida do *Ae. aegypti* ou mesmo impedir a replicação de alguns arbovírus nele, possivelmente por competição de recursos intracelulares ou por potencializar o sistema imune do vetor (Moreira et al., 2009; Ong, 2021). Além disso, fêmeas não-transfectadas são incompatíveis citoplasmaticamente com machos transfectados, o que leva à produção de ovos que não eclodem, reduzindo assim a população desses mosquitos (Ong, 2021). Além disso, foram liberados no Brasil, na Malásia e nas Ilhas Cayman machos de *Ae. aegypti* geneticamente modificados. O OX513A, desenvolvido pela empresa Oxitec, possui um transgene que expressa a proteína tTVA, a qual promove a mortalidade da prole ainda no estágio larval. Contudo, tal efeito pode ser perdido na presença de tetraciclina (Silva et al., 2022). A liberação de organismos geneticamente modificados na natureza envolve uma série de questões éticas e uma avaliação de risco rigorosa que leve em consideração: o alto custo da metodologia, as consequências do fluxo vertical e horizontal do transgene, se a população de mosquitos terá acesso a quantidade de tetraciclina ambiental suficiente para a sobrevivência dos mosquitos, se os riscos aos quais a comunidade local está sujeita são razoáveis em relação aos benefícios, se pode haver a ocupação dos criadouros por outras espécies vetoriais, entre outros (Resnik., 2014; Andrade et al., 2016). Para mais, nas últimas décadas, os esforços para compreender as bases moleculares da interação vírus-vetor têm se intensificado, com o objetivo de identificar fatores importantes para a manutenção da infecção persistente e, assim, potencialmente desenvolver ferramentas para manipulá-los.

## **1.6. Interação vírus-vetor**

Como já exposto, a replicação viral pode causar doenças e até a morte nos organismos hospedeiros, enquanto no vetor invertebrado a infecção é persistente e majoritariamente assintomática (Franz et al., 2015). Outra notável diferença entre esses dois organismos é a ausência da produção de anticorpos nos invertebrados, que contam com a imunidade inata e outros componentes como a via de RNA de interferência (RNAi) para defesa antiviral (Huang et al., 2019). Na via de RNAi, RNAs dupla fita (um padrão

molecular associado a vírus de RNA em replicação) são clivados em pequenos RNAs interferentes de 20 a 25 nucleotídeos (siRNAs) pela Dicer 2, uma helicase DEAD/DEAH-box com motivo de RNase (**Figura 1.8, A**) (Prince et al., 2023). Posteriormente, a proteína Argonata 2 carrega os siRNAs no complexo proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*), que visa a destruição do RNA-alvo viral complementar à sua fita guia (Lopez et al., 2019). Enquanto é bem aceito que a via de RNAi é essencial para o estabelecimento de uma infecção persistente e não letal nos mosquitos por diminuir as taxas de replicação dos vírus (Cirimotich et al., 2009; Magalhaes et al., 2019; Williams et al., 2020; Dong et al., 2022; Samuel et al., 2023), sua ação para a redução da transmissão viral vem sendo questionada (Maringer, 2023).



**Figura 1.8. Estágios do mecanismo de silenciamento gênico mediado pelo complexo proteico RISC. A:** o RNA dupla fita é clivado pela Dicer 2, formando heterodímeros com a R2D2, em pequenos fragmentos que são carregados pela proteína Argonata (Ago 2) no complexo RISC para produção de fitas guias de RNA. **B:** o silenciamento gênico do RNA viral a partir da complementariedade com as fitas guias em uma célula hospedeira dificulta a replicação viral. Imagem criada no BioRender.

Pode-se notar que a interação vírus-vetor possui características moleculares e fisiológicas bastante distintas da interação vírus-hospedeiro. Há diversas perspectivas para o estudo da interação vírus-vetor, como as abordagens genéticas, populacionais, de clima, de microbioma do vetor, transcriptômica, entre outras (Huang et al., 2019). Sob uma perspectiva molecular, as proteínas são um alvo de estudo interessante, já que possuem importante papel de mensageiros intra e intercelulares, além de seus papéis estrutural e executor (Conway et al., 2014). Enquanto o vírus precisa usar a maquinaria celular para produzir suas próprias proteínas, a célula hospedeira ativa mecanismos de



defesa para sua sobrevivência, ou mesmo para que a infecção não se alastre para outras células (Villanueva et al., 2005). Durante infecção por CHIKV, por exemplo, já foi observado em diferentes estudos um desligamento da maquinaria de tradução proteica após 24 h de infecção (White et al., 2011; Cui et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022). Nos estágios iniciais, a expressão de proteínas do hospedeiro aparenta ser suprimida em favor da síntese das proteínas virais. No estágio final da infecção, a célula possivelmente é modulada para priorizar a produção de energia, que é necessária tanto na montagem e no brotamento das novas partículas virais quanto na mobilização de respostas imunes da própria célula (Vasconcellos et al., 2022). Logo, a variação na diversidade e na abundância das proteínas da célula hospedeira ao longo de uma infecção viral pode fornecer informações valiosas a respeito das vias de transdução de sinais que foram moduladas.

### **1.7. Células Aag-2 de *Aedes aegypti***

Existem hoje algumas linhagens celulares derivadas do vetor *Ae. aegypti* disponíveis para pesquisas que envolvem cultura de células, como as linhagens CCL-125, RML-12 e Aag-2, sendo as duas primeiras derivadas de larvas e a última derivada de embriões do mosquito (American Type Culture Collection; Walker et al., 2014). Para estudos de interação vírus-vetor que utilizam cultura celular, a linhagem Aag-2 é amplamente utilizada (Barletta et al., 2012; Zhang et al., 2017), possivelmente pelo fato das células Aag-2 serem imunocompetentes nas vias de RNA de interferência e nas vias de imunidade Jak-STAT, Toll e IMD (Merkling e van Rij, 2013). As células Aag-2 já foram validadas como bons modelos para estudos de imunidade por apresentar um perfil imunológico similar ao do mosquito *Ae. aegypti* (Barletta et al., 2012).

Essa linhagem celular foi gerada na década de 1960 por Peleg a partir de um homogenizado de embriões e sofreu algumas adaptações até então (Peleg, 1968; Lan e Fallon, 1990). Em relação à morfologia, pode existir variações devido à diversidade de tipos celulares presente nos embriões dos mosquitos *Ae. aegypti* (Walker et al., 2014; Morazzani et al., 2012). Contudo, em geral, as células possuem formato estrelado e, com aumento da confluência celular, há a formação de sincícios, grandes células multinucleadas unidas por suas membranas plasmáticas. Já a visualização de sincícios em excesso é um efeito citopático característico da infecção das células Aag-2 por diversos

vírus, assim como MAYV e CHIKV (Albrecht et al., 1996; Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022).

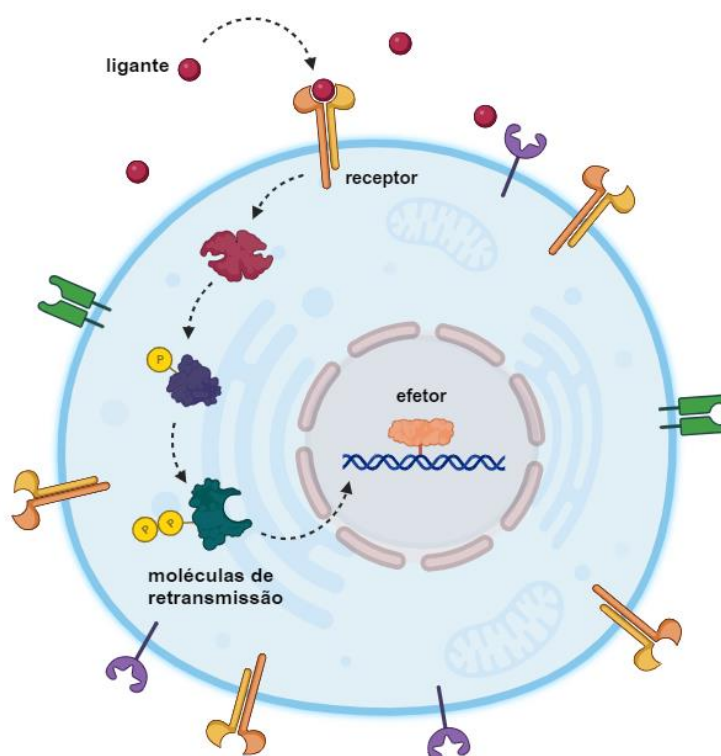
Na linhagem Aag-2 já foram detectados em infecção persistente vírus específicos de insetos, que não causam doença em humanos, como o Cell fusing agent virus (CFAV) (Cook et al., 2012), o Phase Charoen-like virus (PCLV) (Maringer et al., 2017), Aedes anphevirus (AeAV) (Parry e Asgari, 2018), e o Culex Y virus (CYV) (Franzke et al., 2018). Há na literatura alguns estudos a respeito da influência desses vírus específicos de inseto em infecção persistente na competência de transmissão de arbovírus. Entretanto, a combinação de linhagem celular, arbovírus e vírus específico de inseto utilizada em cada estudo influencia no resultado. Já foram reportados casos em que a infecção pelo vírus específico de inseto aumentou, diminuiu ou mesmo não teve influência na transmissão vetorial de arbovírus (Fredericks et al., 2019).

### **1.8. Vias de transdução de sinal e infecções arbovirais**

As vias de transdução de sinais revelam a interdependência de diversos tipos de moléculas para que um estímulo inicial gere a transdução de mensagens entre receptores e efetores (**Figura 1.9**) (Stokes et al., 2015). Os receptores que reconhecem padrões moleculares intracelulares e extracelulares trabalham em conjunto para detectar estímulos como a falta de determinado nutriente, a presença de hormônios ou mesmo situações de estresse como a infecção viral (Muralidharan e Mandrekar, 2013). Diversas vias podem ser ativadas ou suprimidas nas células hospedeiras quando um arbovírus entra em contato com seu vetor e começa a desenvolver uma infecção persistente. Durante a infecção pelos vírus Semliki Forest e CHIKV, por exemplo, observou-se que certas vias de sinalização do hospedeiro foram suprimidas para favorecer a replicação desses alfavírus (Fragkoudis et al., 2008; McFarlane et al., 2014). Na infecção de células de *Ae. aegypti* por MAYV e CHIKV, um desbalanceamento entre componentes do metabolismo energético pode ser causado devido ao sequestro da maquinaria de expressão proteica do hospedeiro (Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022). Ao produzir proteínas virais em larga escala em detrimento de proteínas próprias, a célula hospedeira passa a demandar elevados níveis de energia e seus processos de manutenção ficam prejudicados.

As cascatas de sinalização que modulam a resposta imune do vetor também são

centrais no decorrer do processo replicativo. Alguns insetos como o *Ae. aegypti* e o *Culex quinquefasciatus* possuem um sistema imune *priming*, sendo este um outro mecanismo de imunidade adquirida, presente em diversos organismos eucarióticos (Vargas et al., 2020; Blagrove e Barribeau, 2021). Na imunidade *priming*, exposições prévias a um patógeno em dose subletal podem tornar o inseto resistente a uma exposição em dose letal do mesmo patógeno. Essa memória imunológica pode ser passada à prole, contudo, pode ser perdida caso não haja uma reinfecção com o mesmo patógeno (Sheehan et al., 2020). Apesar de os invertebrados não possuírem imunidade adquirida produtora de anticorpos, sua imunidade inata é patógeno-específica e altamente elaborada (Stokes et al., 2015). Há, inclusive, patógenos que, apesar de causarem doenças em humanos, conseguem ser eliminados pelos invertebrados (Xi et al., 2008). Além disso, os insetos, dentre todos os invertebrados, são os seres que possuem o maior repertório de moléculas imunes sinalizadoras (Bang, 2019).



**Figura 19. Modelo hipotético de uma via de transdução de sinal.** Um sinal extracelular é reconhecido por um receptor de membrana, o qual ativa uma série de moléculas que retransmitem o sinal inicial até uma molécula efetora, que, neste caso, é um fator de transcrição que aciona a expressão de determinado gene. Imagem criada no BioRender.

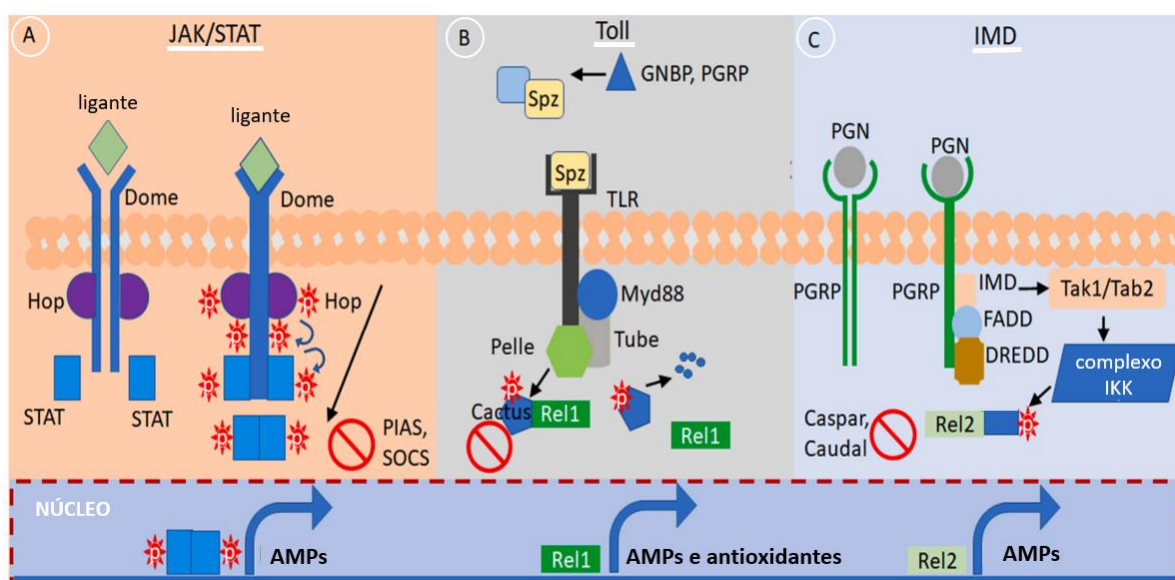
Quando mosquitos da espécie *Culex pipiens* foram infectados com o West Nile virus, detectou-se uma regulação positiva não apenas da via de RNAi, como também das vias de imunidade inata *Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription* (Jak-STAT) e Toll (Zink et al., 2015). Em concordância, a supressão da infecção de *Ae.*

*aegypti* por ZIKV também depende dessas duas vias de sinalização (Angleró-Rodríguez et al., 2017). Em 2017, Jupatanakul e colaboradores desenvolveram *Ae. aegypti* modificados geneticamente para a superexpressão de componentes da via Jak-STAT, o que levou à inibição da replicação de diferentes sorotipos do vírus Dengue no intestino médio e nas glândulas salivares. Tal via é multifuncional, controlando atividades biológicas diversas como proliferação celular, apoptose e regulação do sistema imune (Harrison, 2012; Rawlings et al., 2004). Entre os componentes principais da via de sinalização Jak-STAT, há tirosinoquinases que fosforilam receptores de citocinas para amplificação do sinal recebido (**Figura 1.10, A**), e fosfatases que defosforilam elementos subsequentes da sinalização (Bang, 2019). As respostas a infecções virais desencadeadas por essa via são complexas, específicas e versáteis, levando à síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) nos insetos (Kingsolver et al., 2013). Esses AMPs, produtos finais das vias aqui citadas, costumam possuir um amplo espectro de atividade antibacteriana e antiprotozoária, mas os mecanismos que levam os AMPs a agirem contra os vírus são desconhecidos (Tikhe e Dimopoulos, 2021). Os AMPs que possuem função antiviral são chamados de *antiviral peptides* (AVPs) e apresentam potencial para se tornarem medicamentos antivirais comerciais (Feng et al, 2020).

A via de transdução de sinais Toll também é central no desenvolvimento e na imunidade dos insetos (Viljakainen, 2015). Alguns dos genes relacionados à via Toll respondem à infecção pelo alfavírus Sindbis virus (SINV) e por DENV em mosquitos *Ae. aegypti*, sendo importantes no estabelecimento da resistência viral (Sanders et al., 2005). O silenciamento do regulador negativo Cactus da via Toll levou à supressão da infecção por DENV nesse mosquito vetor (Xi et al., 2008). Das vias que controlam a infecção por ZIKV em *Ae. aegypti*, a Toll parece ser a mais importante (Angleró-Rodríguez et al., 2017), ao passo em que, na infecção por CHIKV, mesmo que a via Toll tenha sido estimulada previamente, não foi verificado prejuízo para a infecção viral (McFarlane et al., 2014). O mecanismo de ativação dessa via também conta com eventos de fosforilação para liberar o fator de transcrição de AMPs para o núcleo celular (**Figura 1.10, B**) (Tikhe e Dimopoulos, 2021).

Em 2011, Luplertlop e colegas analisaram especificamente a resposta imune das glândulas salivares de *Ae. aegypti* à infecção por DENV, verificando-se a expressão positivamente regulada de genes pertencentes às vias Toll e *immune deficiency* (IMD).

Mais recentemente, foi observado que a infecção por SINV em *Ae. aegypti* levou à superexpressão de componentes da via IMD de forma dependente da microbiota intestinal dos mosquitos, visto que o efeito foi revogado com o uso de antibióticos (Barletta et al., 2017). A via de sinalização IMD também possui receptores, enzimas quinases e fatores de transcrição que ativam a produção de AMPs (Figura 1.10, C) (Tikhe e Dimopoulos, 2021). O peptídeo cecropina-like é um AMP produzido pela via IMD que resultou em função antiviral com DENV e CHIKV *in vitro* (Luplertlop et al., 2011). As vias Toll e IMD, que são significativamente similares às vias NF- $\kappa$ B em mamíferos (Lee et al., 2019), orquestram respostas imunes contra uma ampla gama de microrganismos, sendo os principais mecanismos de defesa nos insetos (Ferrandon et al. 2007). Enquanto a via Toll exerce outras funções além das imunes, a via IMD se dedica exclusivamente à imunidade (Viljakainen, 2015).



**Figura 1.10. Representação esquemática dos componentes das três vias de transdução de sinais mais importantes para a defesa antiviral em mosquitos.** A: a via JAK/STAT é ativada quando um ligante interage com o receptor Dome, que se dimeriza e induz a autofosforilação da tirosina quinase Hop. Hop então fosforila Dome para que ele interaja com as proteínas STATs, que são fatores de transcrição. As STATs são fosforiladas, dimerizadas e dirigidas ao núcleo para regular a expressão dos genes alvo. Seus reguladores negativos são SOCS e PIAS. B: na via Toll, as moléculas de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos GNBP e PGRP são reconhecidas pela citocina-like Spz. Este reconhecimento induz o contato de Spz com o receptor TLR, que interage com os adaptadores Myd88 e Tube e com a quinase Pelle. Pelle então fosforila e degrada o inibidor Cactus, liberando Rel1, o fator de transcrição que regula a expressão de certos genes. C: na via IMD, a ligação de PGN ao domínio extracelular do receptor PGRP resulta na oligomerização do seu domínio intracelular, o que leva ao recrutamento das proteínas sinalizadoras IMD, FADD e DREDD. Após receber uma ubiquitinação, IMD recruta o complexo intermediário de sinalização Tak1/Tab2, que ativa o complexo de fosforilação IKK. Então o fator de transcrição Rel2 é fosforilado e translocado para o núcleo. Caspar e Caudal atuam como reguladores negativos da via IMD. P: fosforilação. AMPs: peptídeos antimicrobianos. Adaptado de Tikhe e Dimopoulos (2021).

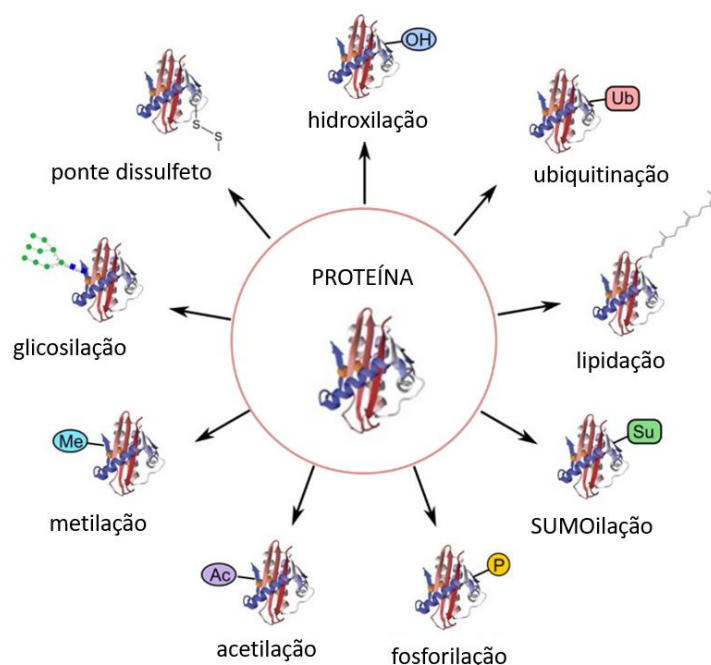
A via *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), que é essencial para desenvolvimento, metabolismo e sinalização celular, também tem papel imune antiviral em *Drosophila* spp. Em mosquitos, vem crescendo o número de evidências que suportam tal função (Tikhe e Dimopoulos, 2021). Na MAPK, uma cascata de fosforilação é responsável por transmitir o sinal recebido até a indução de fatores de transcrição. A depleção de componentes dessa via por RNAi levou ao aumento da titulação de SINV em células Aag-2 de *Ae. aegypti* (Xu et al., 2013).

Conforme o vetor utiliza estratégias imunes para combater a infecção, com o passar do tempo, o vírus também desenvolve estratégias para se sobrepôr a tais defesas. Esse processo contínuo de coevolução envolve diversos fatores do vírus, do hospedeiro e também fatores ambientais (Lovisolo et al., 2003). Os processos pró e antivirais, que são altamente interligados, se dão a partir de uma intensa comunicação molecular que tem as proteínas como agentes indispensáveis.

### 1.9. Modificações pós-traducionais

Visto que os organismos possuem um número limitado de genes, desenvolver diferentes estratégias para regular no tempo e no espaço a atividade das proteínas e seus parceiros de interação é uma grande aquisição evolutiva (Vogel e Marcotte, 2012; Nishi et al., 2014; Ramazi e Zahiri, 2021). As modificações pós-traducionais (*post-translational modifications*, PTMs) são eventos de alterações químicas das proteínas por clivagem proteolítica, adição ou remoção de grupos funcionais que, por mudarem as propriedades das proteínas, permitem a regulação fina de processos em que essas proteínas atuam. Juntamente ao mecanismo de *splicing* alternativo de RNAs mensageiros, as PTMs são responsáveis pela enorme quantidade de proteoformas que podem estar presentes em uma célula, comparada à quantidade de genes disponíveis (Smith e Kelleher, 2013; Zhou et al., 2018). Cada PTM, dependendo da proteína em que foi realizada e do contexto biológico, induz um resultado diferente na célula por meio das vias de transdução de sinais (Dudley e Bond, 2014). Mais de 400 tipos de PTMs já foram descritas, dentre elas, acetilação, glicosilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, palmitoilação, serotonilação e farnesilação (**Figura 1.11**). A fosforilação de proteínas,

que vem sendo estudada desde 1906, já foi identificada em organismos de todos os reinos da vida e, apesar de certas discordâncias entre os autores, é dita como uma das PTMs mais amplamente encontradas (Ramazi e Zahiri, 2021).

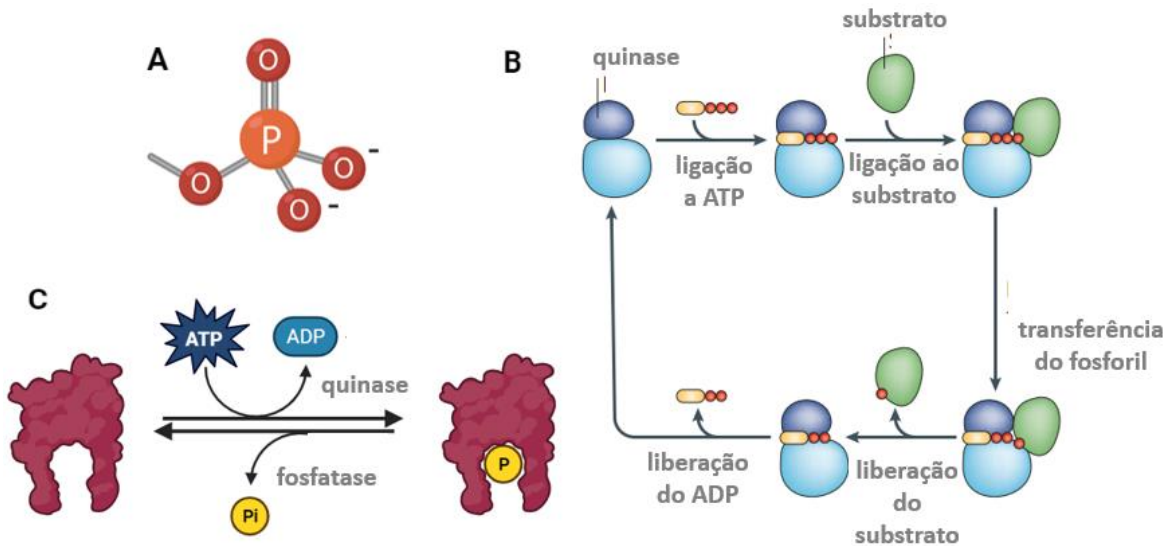


**Figura 1.11. Exemplos de modificações pós-traducionais que uma proteína pode sofrer, aumentando consideravelmente a complexidade de um proteoma.** Adaptado de Creative Proteomics Blog (<https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/strategies-for-post-translational-modifications-ptms/>).

### 1.10. A fosforilação de proteínas

Na fosforilação um grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (**Figura 1.12, A**), de carga negativa e massa molecular de +79,96 Da, é adicionado covalentemente ao radical de um resíduo de aminoácido por uma enzima quinase (Nishi et al., 2014). O grupo fosfato é doado por uma molécula de ATP, resultando em uma proteína fosforilada e um ADP (**Figura 1.12, B**). Como o ATP é o maior provedor energético das células, suas moléculas são mantidas em elevadas concentrações, garantindo que sua disponibilidade não se torne um fator limitante para a sinalização celular (Dudley e Bond, 2014). Após a fosforilação, um resíduo hidrofóbico passa a ser hidrofílico e pode sofrer uma mudança conformacional (Ardito et al., 2017). Diferentes quinases possuem especificidade a determinadas

proteínas-alvo e até a sítios específicos de fosforilação. O processo oposto, de retirar um grupo fosfato de um resíduo de aminoácido, ocorre por meio das enzimas fosfatases e leva à liberação de um fosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (**Figura 1.12, C**) (Dudley e Bond, 2014).

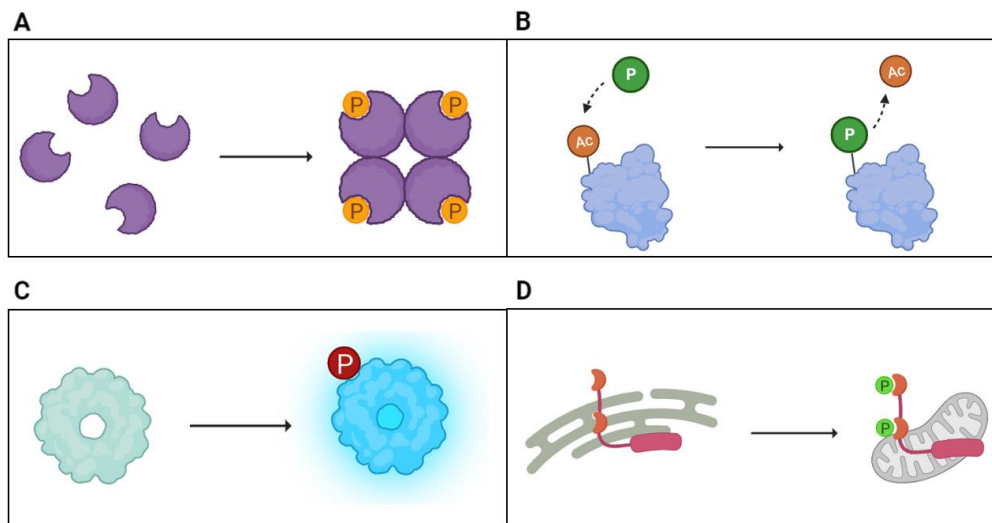


**Figura 1.12. Mecanismos moleculares da fosforilação e da defosforilação de proteínas.** **A:** estrutura molecular de um fosfato, que possui carga negativa. **B:** a proteína quinase realiza a adição de um grupamento fosfato (P) em proteínas a partir de um ATP e com liberação de um ADP; **C:** a reação contrária, de defosforilação, é realizada pela enzima fosfatase e libera um fosfato inorgânico (Pi). Imagem criada no BioRender com adaptações de Ubersax e Ferrel (2007).

Muitas enzimas e receptores celulares podem ser ativados ou desativados por meio dessas modificações, a partir de estímulos externos ou internos, para regular o metabolismo, a proliferação, a apoptose, o tráfego intracelular, a inflamação e outros processos importantes (Dudley e Bond, 2014). Desse modo, as proteínas modificadas pela fosforilação podem atuar de maneiras distintas, como induzindo uma interação proteína-proteína temporária e promovendo a adição ou remoção de outra PTM (**Figura 1.13, A e B**). Há também proteínas que só têm sua função ativada após serem fosforiladas, em um mecanismo de *switch* molecular, ou mesmo proteínas que são translocadas intracelularmente após a PTM para o local exato em que exercerão suas funções (**Figura 1.13, C e D**). Além disso, uma única quinase ou fosfatase pode estar envolvida em diferentes processos simultaneamente. É o caso das quinases das famílias CK1 e CK2, que, em eucariotos, fosforilam resíduos de serina e treonina presentes em sequências consenso específicas de proteínas que regulam processos como proliferação,



diferenciação celular e regulação do ciclo circadiano (Knippschild et al., 2005).



**Figura 1.13. Possíveis consequências moleculares da fosforilação de proteínas. A:** indução de interações proteína-proteína. **B:** retirada de outra PTM. **C:** ativação de uma proteína. **D:** translocação intracelular da proteína. Imagem criada no BioRender.

A fosforilação de proteínas é um mecanismo regulatório universal, presente em eucariotos e procariotos. Em geral, os três resíduos de aminoácidos mais comumente fosforilados em organismos eucarióticos são serina (S, frequência de 85%), treonina (T, frequência de 15%) e tirosina (Y, frequência de 1%), sendo que há pequenas variações entre tais proporções na literatura (Deshmukh et al. 2011; Humphrey et al., 2015; Ardito et al., 2017). Na espécie de inseto *Drosophila melanogaster*, os domínios proteicos encontrados nas quinases que fosforilam resíduos de serina, treonina e tirosina correspondem ao primeiro, ao segundo e ao terceiro domínios de proteínas mais abundantes do genoma, respectivamente (Johnson e Lewis, 2001). As cascatas de sinalização que envolvem fosforilações e defosforilações específicas nesses três resíduos de aminoácido estão envolvidas em processos biológicos vitais como síntese proteica, transdução de sinais, crescimento e divisão celular (McCance e Huether, 2014). Em seres procarióticos, além dos três resíduos já citados, a fosforilação também é comum em resíduos de arginina (R), ácido aspártico (D), histidina (H) e cisteína (C) (Shi et al., 2020).

### 1.10.1. O estudo de fosfoproteínas

Há diferentes metodologias que permitem o estudo de fosfoproteínas em seu contexto biológico, como o uso de anticorpos específicos para sítios de aminoácidos

fosforilados em *Western Blot* ou imunoprecipitação, ensaios *in vitro* de quinases e marcação com radioisótopos de fósforo (Dudley e Bond, 2014; Humphrey et al., 2015). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma ferramenta que, além da identificação e quantificação de peptídeos e proteínas em larga escala, permite o mapeamento de PTMs. Dentro da sequência da proteína, é possível localizar o exato resíduo de aminoácido que foi fosforilado, além de identificar quantas fosforilações foram adicionadas (Savage e Zhang, 2020). Como os resíduos com PTMs encontram-se em baixa proporção estequiométrica em relação aos resíduos não-modificados, é necessário realizar um enriquecimento dos fosfopeptídeos. O uso de inibidores de proteases e fosfatases nas amostras biológicas também é essencial para garantir a integridade, a concentração e o *status* de fosforilação das proteínas (Dudley e Bond, 2014).

As diversas técnicas que permitem o estudo fosfoproteômico vêm sendo utilizadas de forma crescente para o estudo das relações vírus-vetor e vírus-hospedeiro, ou mesmo para a compreensão de processos naturais dos vetores (Savage e Zhang, 2020). Na literatura, encontra-se alguns estudos que já abordaram fosfoproteínas do vetor *Ae. aegypti*. Em 1980, Borovsky e Van Handel estudaram proteínas que compõem os ovos produzidos pelas fêmeas após o repasto sanguíneo, já que o processo vitelogenico pode ser cronometrado com precisão após a alimentação. Entre as proteínas que se acumulam na gema estão as vitelogeninas (produzidas pelo tecido adiposo) e outras proteínas produzidas pelo ovário, sendo que todas apresentaram fosforilação. Hansen e colaboradores (2005), também estudando a maturação dos ovos, descobriram que a quinase S6 (S6K) precisa ser fosforilada em sua treonina 388 para que possa atuar na via de produção de vitelogenina. Ao reprimir a expressão da S6K, reduziu-se a expressão da vitelogenina, antes induzida pelos aminoácidos provenientes do repasto sanguíneo, e interrompeu-se o desenvolvimento dos ovos. Em 2013, Keating et al. mostraram em mosquitos infectados com DENV que a quinase PKG de *Ae. aegypti*, ao fosforilar a proteína viral NS5, resultou em aumento da atividade das asas desses mosquitos em períodos naturais de atividade crepuscular. Tal interação pode potencializar a transmissão viral a outros hospedeiros. Em 2016, Trujillo-Ocampo e colegas identificaram e caracterizaram as proteínas 14-3-3 $\epsilon$  (épsilon) e 14-3-3 $\zeta$  (zeta) em diferentes tecidos do mosquito *Ae. aegypti*. Além de possuírem sítios de fosforilação, elas são moduladoras que interagem com uma série de outras proteínas que possuem resíduos fosforilados de

serina e treonina, estando envolvidas em processos vitais como ciclo celular e resposta a estresse.

De forma mais abrangente, Jablonka et al. (2011) estudaram a fosforilação diferencial de tirosinas na transição de mosquitos *Ae. aegypti* de pupa para adulto. Foi verificada uma diminuição na abundância de tirosinofosfatases, condizente com um aumento na detecção de tirosinas fosforiladas. Kandel e colaboradores (2022) testaram, para as condições de repouso *versus* repasto sanguíneo, os túbulos de Malpighi de mosquitos fêmeas, que são os responsáveis por desidratar rapidamente o sangue ingerido. Foram detectadas mudanças nos padrões de fosforilação de proteínas que estão relacionadas à via de imunidade inata *target of rapamycin* (mTOR), ao transporte vesicular de proteínas, V-ATPases e a aquaporinas.

Outros trabalhos também já exploraram o papel da fosforilação na interação com diferentes hospedeiros em resposta a diversos vírus. Em 2017, Shobahah e colaboradores investigaram células do inseto *Bombyx mori* infectadas com baculovírus. Entre as proteínas identificadas e quantificadas, foram identificados 25 sítios com fosforilação diferencial negativa e 81 sítios com fosforilação diferencial positiva, incluindo hiperfosforilação em sítios de proteínas virais como P6.9, 39 K, LEF-6 e BRO-D. Em células Vero de mamífero infectadas com SARS-CoV-2, houve fosfoativação das quinases caseína II (CK2) e p38 MAPK, assim como a inibição de quinases envolvidas no ciclo celular, provocando a paralização das etapas do ciclo celular Bouhaddou et al. (2020). Liu e colegas (2020), ao estudar o Canine Influenza virus H3N2 infectando pulmão de cachorros, encontraram proteínas fosforiladas nos resíduos de serina e treonina, mas não em tirosinas. O enriquecimento dessas fosfoproteínas por termos anotados as classificou como envolvidas no processamento de RNAs, na estrutura do núcleo e em funções como ligação a actina e citoesqueleto.

Pode-se notar que os estudos fosfoproteômicos vêm contribuindo de forma significativa para compreensão molecular das complexas interações originadas a partir de infecções virais. Apesar disso, o conhecimento a respeito de PTMs em *Ae. aegypti* infectado com arbovírus ainda é bastante escasso. Portanto, o estudo do padrão e da modulação das fosforilações em células Aag-2 de *Ae. aegypti*, antes e após infecção com os alfavírus MAYV e CHIKV, poderá trazer novos conhecimentos a respeito dos aspectos

biológicos da interação vírus-vetor a nível fosfoproteômico.

### 1.11. Objetivo geral e hipótese geral

Levando em consideração o tudo o que foi exposto até aqui, o objetivo geral desse trabalho é aprofundar os conhecimentos moleculares a respeito da interação vírus-vetor (mais especificamente, das células Aag-2 de *Ae. aegypti* com os vírus MAYV e CHIKV) a nível de proteínas, visando propor possíveis alvos para o desenvolvimento futuro de novas estratégias de contenção arboviral.

Nesse sentido, a hipótese geral proposta é que de haverá modulação da expressão proteica e das vias metabólicas da célula hospedeira em resposta à infecção viral, visto que os vírus dependem da célula hospedeira para se replicar.

### 1.12. Escopo da tese

A presente tese aborda estudos proteômicos e fosfoproteômicos de células Aag-2 de *Ae. aegypti* infectadas com arbovírus, como uma forma de aprofundamento dos temas apresentados na dissertação “Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de *Alphavirus* (CHIKV e MAYV)”, defendida em fevereiro de 2019. Objetiva-se elucidar a modulação da abundância proteica de células Aag-2 infectadas com MAYV e CHIKV usando as abordagens proteômica (nas 48 h iniciais de infecção) e fosfoproteômica (nas 12 h iniciais de infecção). A análise proteômica de células Aag-2 infectadas com o MAYV foi um trabalho experimentalmente iniciado durante o Mestrado (Biologia Molecular – Universidade de Brasília), escrito e publicado durante o Doutorado (ANEXOS). Já a mesma análise em relação à infecção causada pelo CHIKV foi inteiramente realizada durante o Doutorado e será apresentada em forma de artigo científico (**Capítulo 2**). A análise fosfoproteômica de células Aag-2 infectadas com os vírus MAYV e CHIKV (**Capítulo 3**) conta com uma predição *in silico* e uma parte experimental que está em fase final de desenvolvimento. Por fim, o **Capítulo 4** traz considerações finais dos dois capítulos experimentais e perspectivas para o estudo dos arbovírus e seus vetores.

## Capítulo 2.

### Modulação do proteoma de células Aag-2 de *Aedes aegypti* em resposta à infecção pelo vírus Chikungunya

#### 2.1. Resumo

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um vírus de RNA senso positivo e fita simples que pertence ao gênero Alphavirus. Esse vírus zoonótico é transmitido a humanos em ambientes urbanos por picadas de fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectadas. Em seres humanos, o CHIKV geralmente causa sintomas dolorosos durante os estágios agudo e crônico da infecção, podendo levar até à morte. Por outro lado, a interação vírus-vetor não diminui o *fitness* do mosquito, permitindo o estabelecimento de uma infecção persistente. No presente trabalho, estudou-se a infecção de cultura de células Aag-2 de *Ae. aegypti* por CHIKV em multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 ao longo de 48 h por meio de análise proteômica quantitativa *label-free* e de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Imagens da MET mostraram uma alta carga viral intracelular às 48 horas pós-infecção (h p.i.), bem como uma morfologia mitocondrial alongada incomum. Tal morfologia pode indicar um desequilíbrio na rede mitocondrial relacionada à fusão, devido ao estresse energético causado pelo vírus. A análise do proteoma por espectrometria de massas revelou 196 grupos de proteínas modulados após a infecção, os quais estão relacionados à síntese protéica, ao metabolismo energético e apoptose. Estas proteínas de células Aag-2 moduladas durante a infecção por CHIKV podem ter papéis em mecanismos pró e antivirais, estabelecendo um equilíbrio entre a propagação viral e a sobrevivência das células hospedeiras, possivelmente levando à infecção persistente.

#### 2.2. Artigo científico

O presente trabalho, apresentado a seguir, foi publicado em 2022 na revista científica *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.



# *Aedes aegypti* Aag-2 Cell Proteome Modulation in Response to Chikungunya Virus Infection

Anna Fernanda Vasconcellos<sup>1,2†</sup>, Reynaldo Magalhães Melo<sup>1†</sup>, Samuel Coelho Mandacaru<sup>3</sup>, Lucas Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Athos Silva de Oliveira<sup>2</sup>, Emily Caroline dos Santos Moraes<sup>3</sup>, Monique Ramos de Oliveira Trugilho<sup>3</sup>, Carlos André Ornelas Ricart<sup>1</sup>, Sônia Nair Bão<sup>4</sup>, Renato Oliveira Resende<sup>2\*</sup> and Sébastien Charneau<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Fabio Gomes,  
Federal University of Rio de Janeiro,  
Brazil

### Reviewed by:

Marcos Sorgine,  
Federal University of Rio de Janeiro,  
Brazil  
Anil Pant,  
Kansas State University, United States

### \*Correspondence:

Sébastien Charneau  
charneau@unb.br  
Renato Oliveira Resende  
rresende@unb.br

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share  
first authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Virus and Host,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and  
Infection Microbiology

Received: 14 April 2022

Accepted: 18 May 2022

Published: 15 June 2022

### Citation:

Vasconcellos AF, Melo RM,  
Mandacaru SC, de Oliveira LS,  
de Oliveira AS, Moraes ECS,  
Trugilho MRO, Ricart CAO, Bão SN,  
Resende RO and Charneau S (2022)  
*Aedes aegypti* Aag-2 Cell Proteome  
Modulation in Response to  
Chikungunya Virus Infection.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:920425.  
doi: 10.3389/fcimb.2022.920425

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup> Laboratory of Virology, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>3</sup> Laboratory of Toxinology and Center for Technological Development in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>4</sup> Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

Chikungunya virus (CHIKV) is a single-stranded positive RNA virus that belongs to the genus *Alphavirus* and is transmitted to humans by infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* bites. In humans, CHIKV usually causes painful symptoms during acute and chronic stages of infection. Conversely, virus-vector interaction does not disturb the mosquito's fitness, allowing a persistent infection. Herein, we studied CHIKV infection of *Ae. aegypti* Aag-2 cells (multiplicity of infection (MOI) of 0.1) for 48 h through label-free quantitative proteomic analysis and transmission electron microscopy (TEM). TEM images showed a high load of intracellular viral cargo at 48 h postinfection (hpi), as well as an unusual elongated mitochondria morphology that might indicate a mitochondrial imbalance. Proteome analysis revealed 196 regulated protein groups upon infection, which are related to protein synthesis, energy metabolism, signaling pathways, and apoptosis. These Aag-2 proteins regulated during CHIKV infection might have roles in antiviral and/or proviral mechanisms and the balance between viral propagation and the survival of host cells, possibly leading to the persistent infection.

**Keywords:** CHIKV, mosquito cell culture, label-free quantification, mass spectrometry, protein synthesis, apoptosis, RNA helicases, mitochondrion

## INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) is an Old World mosquito-borne virus that belongs to the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae* (Cunha et al., 2020). This virus is transmitted to humans mainly by infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* blood meal bites, causing large epidemics worldwide (Lee et al., 2013). The word *chikungunya* means “the one that bends” in the Kimakonde African language (Azevedo et al., 2015) since CHIKV fever causes fatigue, rash, muscle pain, and severe polyarthralgia during the acute phase (World Health Organization, 2017). However, the infection can achieve a chronic stage, causing long-lasting painful and debilitating symptoms in the joints

(Galán-Huerta et al., 2015). The lack of approved vaccines and specific antivirals against this arbovirus makes CHIKV fever an important public health issue (Cunha et al., 2020). Furthermore, environmental changes and the increasing number of world travelers in viremia also led to a significant expansion of CHIKV reaching area during the 2010s (Weaver, 2013). In Brazil, the first CHIKV autochthonous transmission occurred in 2014 in the Northern region, related to the Asian lineage. Soon after, the East–Central–South African (ECSA) lineage was detected in the Northeast, and it spread to all Brazilian regions in the following years, causing outbreaks in several states (Cunha et al., 2020).

CHIKV single-stranded positive RNA genome has approximately 11.8 kb, with polyA-tail and 5' cap, and it exists as a single copy in each virion. It encodes two polyproteins that are cleaved in the course of infection by host and viral proteases (Strauss and Strauss, 1994). This generates four non-structural proteins 1–4 (nsP1–4) (Solignat et al., 2009) from the infectious genomic RNA, and five structural proteins (capsid, E3, E2, 6k, and E1) from a subgenomic RNA (Burt et al., 2017).

Virion entry in mammalian and Aedine cells can occur through clathrin-mediated endocytosis (Lee et al., 2013), and the surface protein receptor prohibitin has been associated with this process in human cells. Prohibitin has also been reported to facilitate *Dengue virus 2* (DENV2) entrance in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* cells (Kuadkitkan et al., 2010; Wintachai et al., 2012).

Both RNA replication and virion assembly take place in the cytoplasm of host cells (Strauss and Strauss, 1994). Non-structural proteins, such as RNA-dependent RNA polymerase (nsP4) and protease (nsP2), are translated before the structural ones (Kumar et al., 2021).

Structural proteins compose the ~65-nm-diameter, quasi-icosahedral, and enveloped CHIKV particle. E1/E2 glycoprotein dimers are arranged in 80 trimeric viral spikes on the mature virion membrane; while inside, the capsid is constituted by monomers of the capsid protein (CP) organized in a T = 4 geometry (Sharma et al., 2018). Spikes are essential structures for binding and fusion to the cell membrane. Since CHIKV can infect different types of cells, the use of multiple conserved receptors is required for recognizing and entering cells (Schnierle, 2019).

Historically, it has been extremely difficult to perform control of arbovirus vectors as a mitigation strategy (Achee et al., 2019). Thus, it is important to understand the biological mechanisms behind CHIKV persistent infection in *Aedes* spp. mosquitoes. Previous studies have addressed the proteomics of whole *Ae. aegypti* mosquitoes and their specific organs, such as midgut and salivary glands, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (MS) (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2012; Shrinet et al., 2018; Cui et al., 2020; Chowdhury et al., 2021). The knowledge produced by proteomics may provide insights into molecular tools to diminish the vector competence for CHIKV. In this study, we aimed to perform a label-free quantitative proteomic analysis of CHIKV-infected *Ae. aegypti* Aag-2 cells to give an overview of the protein abundance profile changes in

time points 0, 12, and 48 h postinfection (hpi). Proteomics and microscopy data revealed several regulated proteins that are possibly involved in host cell metabolic shifts that could assist viral replication.

## MATERIAL AND METHODS

### Cells and Virus

*Ae. aegypti* Aag-2 cells (RRID : CVCL\_Z617) were kindly provided by Gorben Pijlman, PhD (Wageningen University & Research, Netherlands) and cultured in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml of penicillin/streptomycin at 28°C. *Ae. albopictus* C6/36 cells were maintained in TC-100 medium (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brazil) supplemented with 10% FBS at 28°C. African green monkey kidney-derived Vero cells were grown in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS and 100 U/ml of penicillin/streptomycin in an incubator at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Cell passages were performed once a week. The CHIKV isolate (strain Cuiabá-MT, Brazil, National Center for Biotechnology Information (NCBI) accession number MH823667) was supplied by the Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF).

### Virus Recovery and Propagation

The CHIKV isolate was recovered from an infected patient's blood sample and inoculated in Vero cells, which present a clear cytopathic effect (CPE) during CHIKV infection. Three days postinfection (dpi), the onset of CPE was noted, and the supernatant was collected. Viral RNA was extracted from Vero cells using TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and replication was confirmed by RT-PCR. SuperScript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) was used for cDNA synthesis, while PCR was performed with Platinum Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). The primers forward 5'-CGAAGAGTGGAGTCTKGCATYCCAG-3' and reverse 5'-GCCTCYTGGTATGTGGCCGCTTTAGC-3' amplified the set of E3–E2 genes, generating an amplicon about 1.5 kb. Then, *Ae. albopictus* C6/36 cells were infected with virus-containing supernatant from Vero culture to increase the virus titer, since these mosquito cells have a defective antiviral RNAi machinery, being advantageous for arbovirus propagation (Brackney et al., 2010). C6/36 cell culture supernatant was collected for the following steps.

### Chikungunya Virus Titration

Viral titer was obtained by End-Point Dilution Assay in Terasaki plates. Confluent Vero cells grown in a T25 flask were detached with 1 ml of trypsin-EDTA and diluted in 4 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and 100 U/ml of penicillin/streptomycin. The cells in suspension were incubated with serial dilutions (from  $1 \times 10^{-1}$  to  $1 \times 10^{-9}$ ) of virus stocks in a 1:1 volume ratio (90  $\mu$ l cell suspension:90  $\mu$ l virus dilution).

In 60-well Terasaki plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), 10  $\mu\text{l}$  per well was added in 6 replicates per dilution. The CHIKV titration was achieved based on CPE visualized by light microscopy at 3 dpi and TCID<sub>50</sub> calculation. Each condition was titrated twice, and the mean number of viral particles was considered.

## Growth Kinetics in Aag-2 Cells

To explore changes in CHIKV-infected Aag-2 cells at the protein level, the culture harvesting times were determined according to the highest virus titer. Multiplicities of infection (MOIs) of 0.1 and 1 were used to infect Aag-2 cells in 6-well plates in biological triplicates. After 90 min, the supernatant was replaced with fresh Schneider's medium supplemented with FBS and 100 U/ml of penicillin/streptomycin. The CHIKV-infected supernatants were titrated at 24, 48, and 72 hpi by End-Point Dilution Assay. The virus growth curve was set, and the harvesting time points 0, 12, and 48 hpi were determined for the following experiments, with a chosen MOI of 0.1.

## Transmission Electron Microscopy

Aag-2 cells were grown in three independent T25 flasks and cultured in Schneider's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS and 100 U/ml of penicillin/streptomycin at 28°C. Each flask was harvested at a different time point: 0 (uninfected control), 12, and 48 hpi. The samples were transferred to 15-ml tubes and centrifuged at 1,200  $\times g$  for 3 min. After two rounds of phosphate-buffered saline (PBS) washing, pellets were transferred to microtubes, and fixation occurred overnight at 4°C in a solution containing 2% (v/v) paraformaldehyde, 2% (v/v) glutaraldehyde, and 0.1 M of sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Next, whole preparations were post-fixed, for 30 min in 2% (w/v) osmium tetroxide, 1.6% potassium ferricyanide, and 10 mM of  $\text{CaCl}_2$  in 0.2 M of sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Samples were washed in distilled water and stained in a block with 0.5% (w/v) uranyl acetate for 24 h at 4°C. The material went through dehydration in a graded acetone series (50%–100%) for 10 min each, and it was embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were obtained using an ultramicrotome UC6 (Leica, Wetzlar, Germany) that were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The final step was to examine and photograph the sections under a Jeol 1011 transmission electron microscope (TEM; Jeol 1011, Tokyo, Japan) at 80 kV.

## Sample Preparation for Mass Spectrometry

In T25 flasks,  $2 \times 10^6$  Aag-2 cells were seeded. After 16 h, cells were infected with CHIKV stock at MOI of 0.1 in biological triplicates. Mock cells (with Schneider's medium only) were harvested at  $t = 0$  h (uninfected), and CHIKV-infected cells were harvested at 12 and 48 hpi. Aag-2 pellets were lysed with 8 M of urea in 20 mM of ammonium bicarbonate, pH 7.9, containing a complete mixture of protease and phosphatase inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). Then, 100  $\mu\text{g}$  of protein was reduced with 5 mM of dithiothreitol (DTT) for 1 h at 32°C and alkylated with 14 mM of iodoacetamide for 40 min at room temperature in the dark. Samples were then applied to a filter

(Centrifugal Filters Ultracel, 3 kDa) and centrifuged for 10 min at 14,000  $\times g$ . Next, a washing step was performed with 8 M of urea followed by centrifugation for 10 min at 14,000  $\times g$ . A total of 2  $\mu\text{g}$  of modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA) was used for tryptic digestion following the proportion ratio of 1:50 (enzyme:substrate) for 18 h at 37°C under 600-rpm agitation. Tryptic peptides were acidified by adding trifluoroacetic acid (TFA) to a final concentration of 0.1% (v/v), desalted with POROS R2 resin (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and packaged in micropipette tips. Desalted peptides were vacuum dried and suspended in 0.1% (v/v) formic acid (FA), and aliquots corresponding to 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  were used for MS analysis.

## Mass Spectrometry

Tryptic digests were analyzed by reversed-phase nanoscale liquid chromatography coupled to high-resolution nano-electrospray ionization MS. Chromatography was performed using a Dionex Ultimate 3000 RSLCnano system coupled to the HF-X Orbitrap MS (Thermo Fisher Scientific). All samples (1  $\mu\text{g}$  per run) were initially applied to a 2-cm guard column, followed by fractionation on a 25.5-cm PicoFrit™ Self-Pack column (New Objective) packed with 1.9- $\mu\text{m}$  silica, ReproSil-684 Pur 120 Å C18-AQ (Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany). Each sample was loaded in 0.1% (v/v) FA and 2% (v/v) acetonitrile (ACN) onto the trap column at 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ , while chromatographic separation occurred at 200 nl/min. Mobile phase A consisted of 0.1% (v/v) FA in water, while mobile phase B consisted of 0.1% (v/v) FA in ACN. Peptides were eluted with a linear gradient from 2% to 40% eluent B over 32 min, followed by up to 80% B in 4 min. Lens voltage was set to 60 V. Full-scan MS mode was acquired with a resolution of 60,000 (FWHM at  $m/z$  200 and automatic gain control (AGC) set to  $3 \times 10^6$ ). The 20 most abundant precursor ions from each scan ( $m/z$  350–1,400) were sequentially subjected to fragmentation by higher-energy collisional dissociation (HCD). Fragment ions were analyzed at a resolution of 15,000 using an AGC set to  $1 \times 10^5$ . Data were acquired using Xcalibur software (version 4.2.47).

## Label-Free Protein Quantification and Identification

Protein quantification and identification were performed by using MetaMorpheus (Solntsev et al., 2018), which takes advantage of a modified version of Morpheus (Wenger and Coon, 2013) for identification and FlashLFQ (Millikin et al., 2017) for quantification. Briefly, raw files and a FASTA file containing the UniProt reference proteomes of CHIKV (UP000000569) and *Ae. aegypti* (UP000008820), with one protein sequence per gene, were loaded into MetaMorpheus. Both FASTA files were downloaded in May 2021. Then, calibration was performed with default values, with file-specific tolerances set to each MS run. Next, global post-translational modification discovery (G-PTM-D) was used to search for common biological, common artifacts, and metal modifications in the files. Identification and quantification were done allowing a maximum of two missed cleavages, two modifications per peptide, and a peptide minimum length of 7. Carbamidomethylation



of cysteine and selenocysteine was set as fixed modifications. Oxidation of methionine was set as a variable modification. Protein parsimony was applied, two peptides were required to identify a protein group, and modified peptides were treated as different peptides to remove ambiguities in the quantification of proteins. Quantification was performed without match between runs (MBR), and results were normalized by FlashLFQ. Peptide-spectrum matches (PSMs) were considered valid if the q-value <0.01 and the MetaMorpheus minimum score was set to 5.

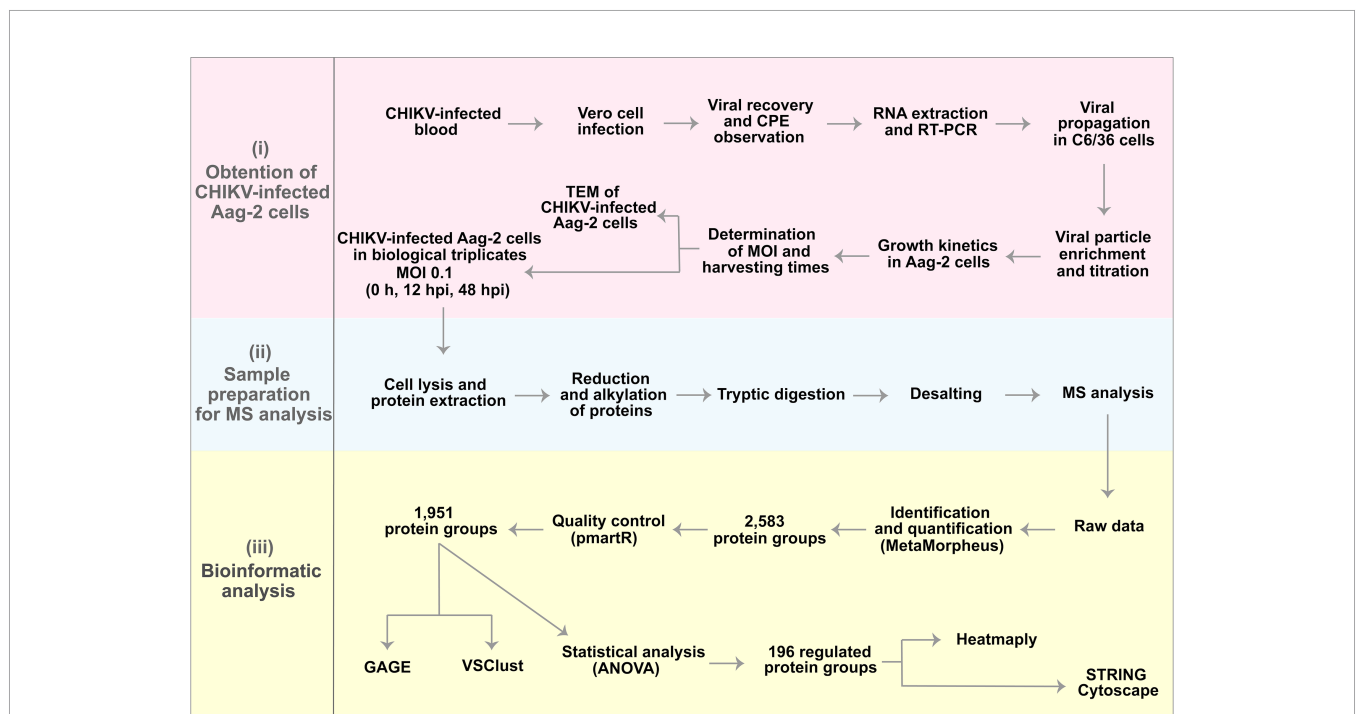
### Quality Control, Statistical Analysis, and Functional Annotation

The resulting protein groups were imported into the R environment (R Core Team, 2019), within RStudio (RStudio Team, 2021). The quality control and statistical analysis were performed using psmartR (Stratton et al., 2019) with the assistance of the following packages: heatmaply (Galili et al., 2017), dendextend (Galili, 2015), ggplot2 (Wickham, 2016), and GAGE (Luo et al., 2009). First, proteins with less than two unique peptides were filtered out, and protein abundance was log2 transformed. Subsequently, filters were applied according to the number of missing values. Proteins were required to have at least three quantified values in the total replicates and two quantified values per group. The resulting protein groups were analyzed by robust Mahalanobis distance using correlations, median absolute deviations, skewness, and proportion of missing values to verify the presence of extreme outliers. ANOVA and *post-hoc* Bonferroni multiple test correction with

a p-value <0.05 cutoff were used to identify proteins and peptides regulated between groups. CHIKV peptides were related to the mature proteins through a comparison of their position in the CHIKV protein sequence and annotation of the structural polyprotein (Q8JUX5) of the CHIKV strain S27-African prototype. Variance-sensitive clustering through VSclust (Schwämmle and Jensen, 2018) and heatmap clustering were done by using proteins without missing values. Furthermore, the optimal number of clusters was defined by minimum centroid distance. To perform enrichment analysis, UniProt protein AC was converted to Entrez GeneID using UniProtKB (The UniProt Consortium, 2021) and db2db (Mudunuri et al., 2009). The resulting 984 Entrez GeneID with their corresponding abundances were analyzed by Generally Applicable Gene-set Enrichment (GAGE) against the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) gene set of *Ae. aegypti*. Pathways were considered enriched if q-value <0.1. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by using STRING (Szklarczyk et al., 2019) without text mining, and Cytoscape StringApp (Doncheva et al., 2019) with the help of yfiles layout algorithms app.

### RESULTS

To study the *Ae. aegypti* Aag-2 cell response to CHIKV infection, we designed an experimental label-free quantitative proteomic procedure supported by microscopy analysis (**Figure 1**).

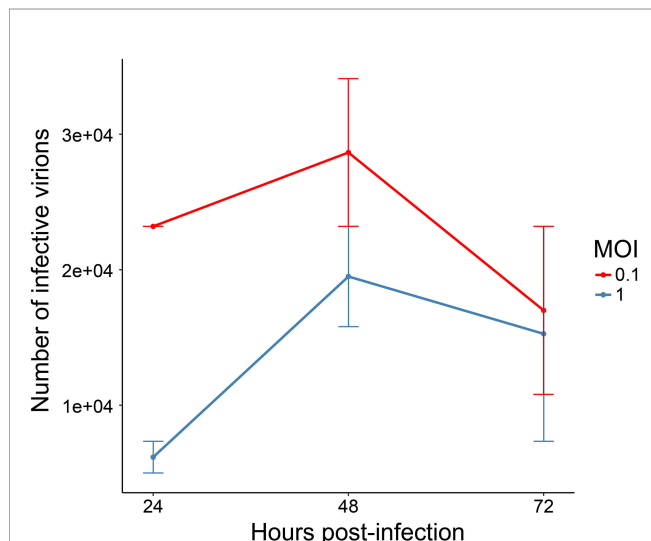


**FIGURE 1** | Experimental design and preliminary results. (i) Obtention of chikungunya virus (CHIKV)-infected Aag-2 cells, which consisted of the determination of multiplicity of infection (MOI) (1), harvesting times (0, 12, and 48 hpi), and microscopy analysis. (ii) Sample preparation for mass spectrometry (MS) analysis. (iii) Bioinformatics analysis that resulted in 196 proteins statistically significant as upregulated or downregulated.

## Determination of Multiplicity of Infection and Harvesting Time Points for Chikungunya Virus-Infected Aag-2 Cells

A growth kinetics curve in infected Aag-2 cells was performed to identify the time point with the highest production of viral particles and the most suitable CHIKV MOI for *Ae. aegypti* cells. Initially, we performed a CHIKV infection using MOI of 1 in Vero cells, since those cells allow a distinguishable CPE. As infection control, we used isolates of DENV2 and *Mayaro virus* (MAYV), also using MOI of 1. As a negative control, we used mock-infected Vero cells. From these assays, we could notice that our CHIKV isolate was more virulent than the other arboviruses, producing higher levels of CPE (syncytia formation) and cell death (**Supplementary Figure 1**). The CHIKV isolate (NCBI accession number MH823667) used in this study was sequenced and phylogenetically clustered with isolates of the ECSA (Vasconcellos et al., 2019). This lineage is known to be more virulent than other CHIKV lineages since ECSA isolates can interfere with the innate immune system by impairing interferon activation (Figueiredo and Figueiredo, 2014; Langsjoen et al., 2018). For this reason, CHIKV MOIs of 0.1 and 1 were tested to infect Aag-2 cells to establish growth kinetics.

We determined the times 24, 48, and 72 hpi to harvest supernatant and perform viral titration. As expected, the growth kinetics showed a higher CHIKV particle production at all harvesting times using MOI of 0.1, which was chosen for the next steps. Supernatant titration showed a slightly higher viral particle production at 48 hpi ( $2.86 \times 10^4$ /ml) rather than at 24 hpi ( $2.32 \times 10^4$ /ml) and at 72 hpi ( $1.7 \times 10^4$ /ml) (**Figure 2**). Very similar results were obtained in a previous work, when CHIKV-infected Aag-2 cells achieved higher titrations at 48 hpi, using



**FIGURE 2** | Growth kinetics of chikungunya virus (CHIKV)-infected Aag-2 cells. The multiplicities of infection (MOIs) of 0.1 and 1 were used to infect mosquito cells, and the supernatant was collected at three different time points (24, 48, and 72 hpi). Titration of infective CHIKV particles was performed with EndPoint Dilution Assay. The chosen MOI was 0.1, and the harvesting time points 12 and 48 hpi were selected.

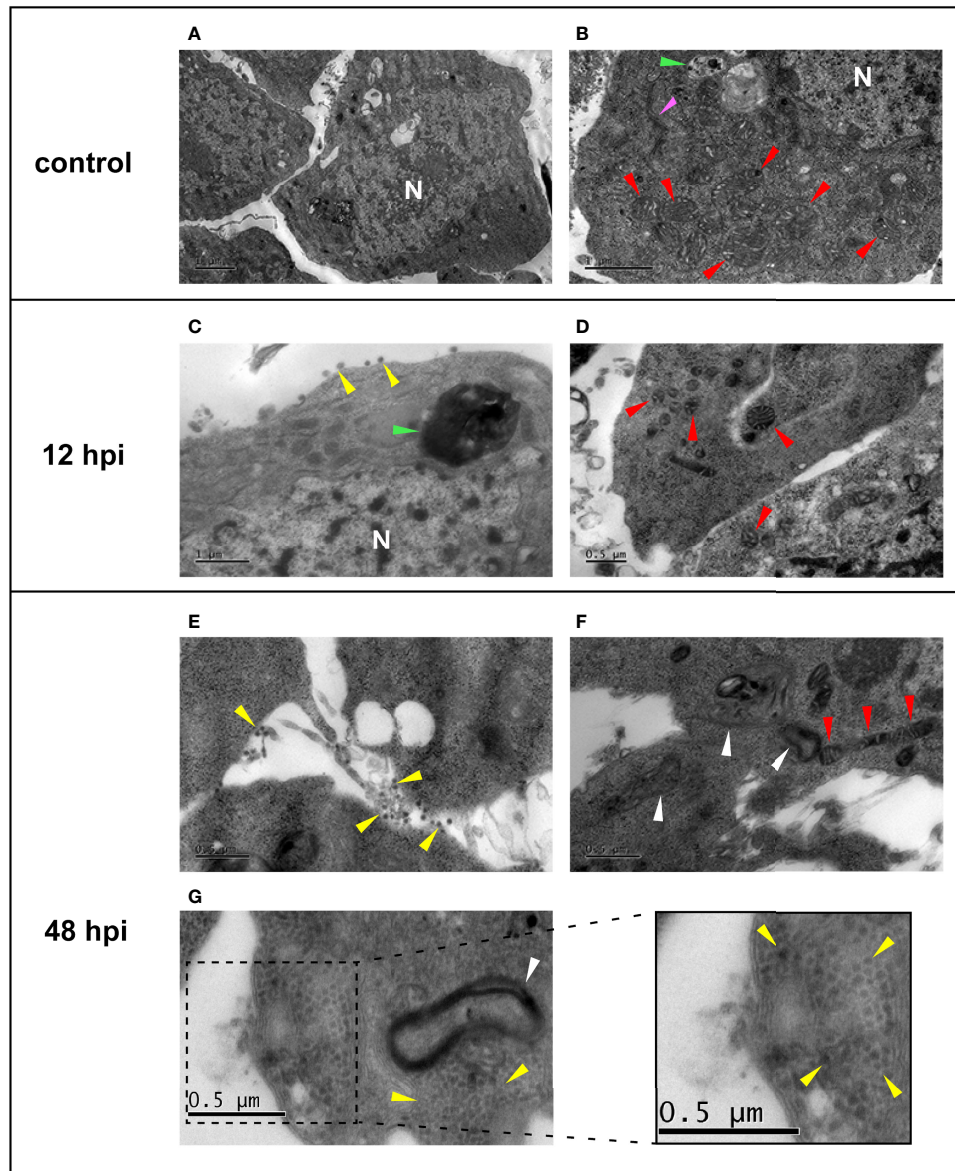
both MOIs of 0.1 and 1 (Kumar et al., 2021). Accordingly, 48 hpi was established as the final harvesting time point. In addition, considering the enhanced virulence aspect of our CHIKV isolate, we also decided to choose an intermediate harvesting time point of 12 hpi. An earlier harvesting time point could shed light on interesting biological aspects in the protein abundance of CHIKV-infected Aag2 cells, presented in our proteomic analysis (see below). Therefore, we established the CHIKV MOI of 0.1 to infect *Ae. aegypti* cells, for further analysis at 0 (uninfected), 12, and 48 hpi.

## Transmission Electron Microscopy of Chikungunya Virus-Infected Aag-2 Cells

TEM analysis was performed using the established MOI of 0.1 and the harvesting time points 0, 12, and 48 hpi, to visually support the biological effects of CHIKV infection. Uninfected Aag-2 cells (Control) presented a well-defined morphology, with apparently intact mitochondria, nucleus, autophagosome vesicle, and a structure that appears to be a Golgi complex (**Figures 3A, B**). At 12 hpi, a small number of viral particles in the extracellular space were observed, although the integrity of the plasmatic membrane and organelles, such as the nucleus and mitochondria, seem to remain preserved (**Figures 3C, D**). Conversely, an apparent CPE is observed in Aag-2 cells at 48 hpi. Degraded fragments of membranes can be seen, possibly from cytoplasmic membranes and membranous organelles (**Figures 3E, F**). Moreover, mitochondria present a suggestive abnormal elongated morphology at 48 hpi (**Figure 3F**). Considering our TEM images, viral particles can be found in both intracellular and extracellular environments. However, a surprisingly elevated number of virions in the intracellular space of the mosquito cell at 48 hpi are observed in **Figure 3G**. According to our observations, despite that viral production had already been verified at 12 hpi, a significant cell integrity loss and virion production could be only noticed at 48 hpi, in agreement with the growth kinetics (**Figure 2**). This pattern is also observed for other arboviruses, such as MAYV (Vasconcellos et al., 2020).

## Proteomic Analysis

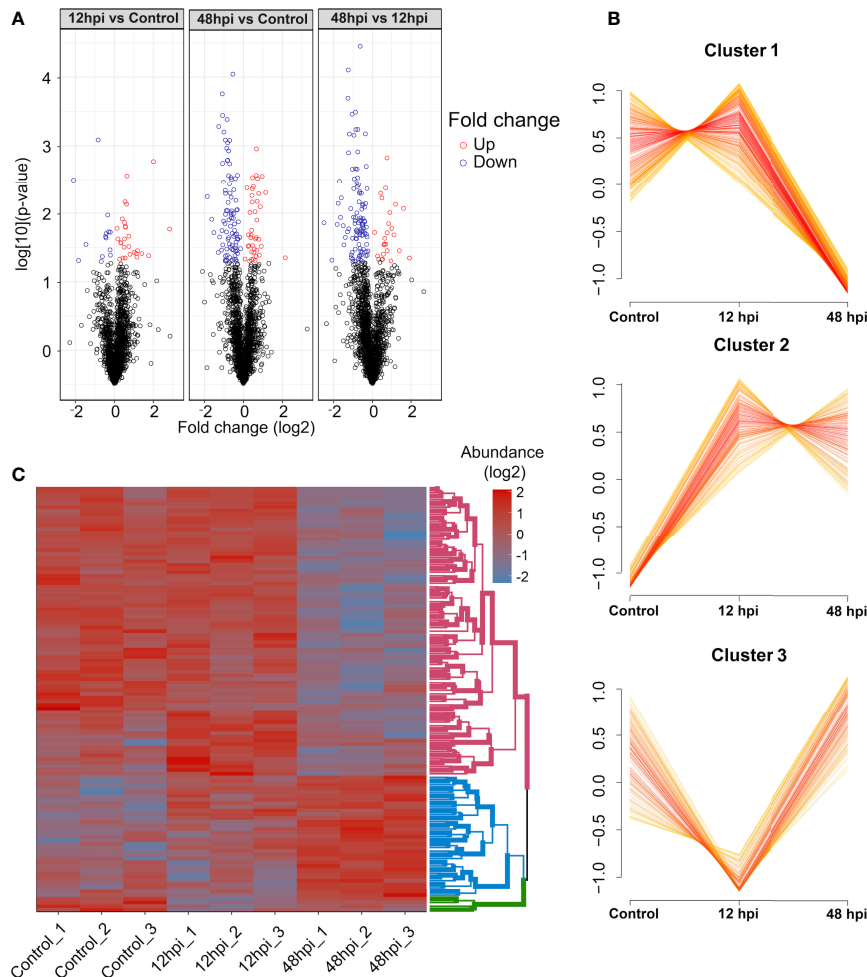
A total of 2,583 protein groups with at least two unique peptides were identified (**Supplementary Table 1**). The efficiency of the normalization of protein group abundances was assessed by boxplot and histogram, exhibiting a bell-shaped distribution (**Supplementary Figures 2A, B**). We also applied filters to ensure the use of more confident protein groups in quantifications. First, protein groups with more than three missing values in the total replicates were removed, resulting in 2,296 protein groups (**Supplementary Figure 2C**). Then, to perform ANOVA, protein groups with less than two quantified values per condition were removed, resulting in 1,951 protein groups (**Supplementary Figure 2D**). These protein groups were submitted to robust Mahalanobis distance analysis to evaluate the presence of extreme outliers, and none could be observed (**Supplementary Figure 2E**). Moreover, we performed a probabilistic principal component analysis (PPCA) to demonstrate the grouping of the replicates among conditions (**Supplementary Figure 2F**).



**FIGURE 3** | Electron micrographs of uninfected (**A, B**) and chikungunya virus (CHIKV)-infected (**C–G**) Aag-2 cells. (**A, B**) Uninfected cells showing the mitochondria (red arrows), autophagic vesicle (green arrow), a possible Golgi complex (pink arrow), and the nucleus (N). (**C, D**) Aag-2 cells infected with CHIKV using multiplicities of infection (MOIs) of 0.1 at 12 hpi. (**C**) Possible released viral particles can be seen in the extracellular space (yellow arrows), and the proposed autophagic vesicle is darker (green arrow). Mitochondria (red arrows) and the nucleus (N) membranes are apparently still preserved. (**E–G**) Aag-2 cells infected with CHIKV at 48 hpi using MOI of 0.1 showing possible virions (yellow arrows) found in both extracellular (**E**) and intracellular spaces (**G**), inset, while mitochondria present a suggestive abnormal elongated morphology (red arrows) (**F**), and membrane residues are observed (white arrows), probably associated with cytopathic effect (CPE) (**F, G**). Bars represent 1  $\mu\text{m}$  in (**A–C**) and 0.5  $\mu\text{m}$  in all other images.

Next, the 1,951 protein groups were tested by one-way ANOVA, which resulted in 196 protein groups with a difference in the abundance quantification between the conditions analyzed (**Supplementary Table 2**). By comparing the abundance fold-change (FC) of these protein groups observed between 12 hpi vs. Control, 48 hpi vs. Control, and 48 vs. 12 hpi, it is possible to notice that the 12 hpi vs. Control comparison presents a fewer number of differentially abundant

protein groups (**Figure 4A**). Conversely, the other two comparisons, 48 hpi vs. Control and 48 vs. 12 hpi, presented a greater number of regulated protein groups, comprising 130 and 128, respectively. Moreover, a variance-sensitive clustering (VSclust) analysis was performed, resulting in three clusters of *Ae. aegypti* protein groups. This analysis clustered 738 protein groups, comprising 365, 215, and 158 protein groups, in clusters 1, 2, and 3, respectively (**Supplementary Table 3**). Protein



**FIGURE 4** | Quantitative overview of abundance variation of protein groups during chikungunya virus (CHIKV) infection of *Aedes aegypti* Aag-2 cells. **(A)** Volcano plot highlighting regulated protein groups analyzed by one-way ANOVA with *post-hoc* Bonferroni multiple test correction ( $p$ -value < 0.05) from 1,951 protein groups analyzed. **(B)** Clusters of abundance profiles of 1,129 protein groups were obtained in VSclust. **(C)** Heatmap of 116 protein groups without missing values clustered according to their abundance patterns.

abundance in cluster 1 decreased along with the 48 hpi compared to Control (**Figure 4B**). Conversely, in cluster 2, the abundance during the course of infection (12 and 48 hpi) was greater than in Control. Cluster 3 showed a lower abundance at 12 hpi and an abundance recovery at 48 hpi.

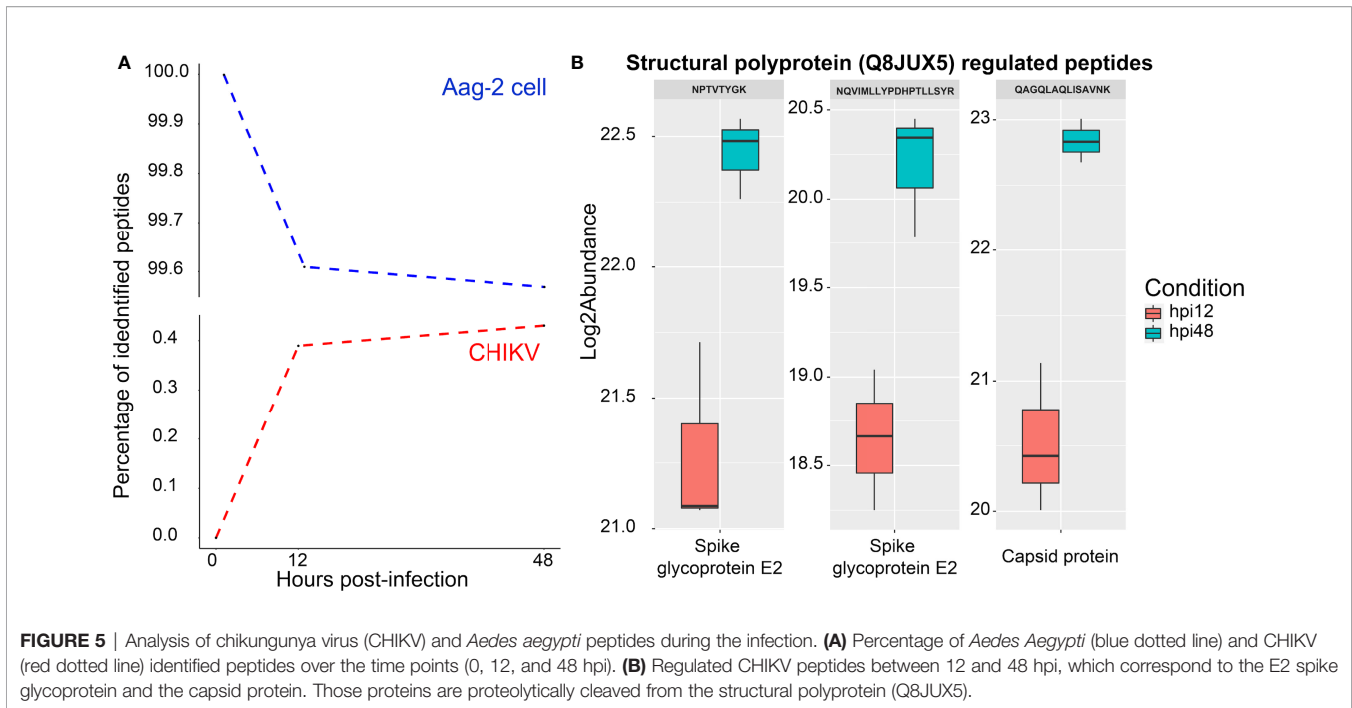
From those 196 regulated protein groups, tested by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple test correction, 116 did not present any missing values. These protein groups were submitted to clustering in a heatmap analysis (**Figure 4C**). Consistently with VSclust analysis (**Figure 4B**), two consistent patterns of protein modulation in the CHIKV-infected Aag-2 cells are exhibited, especially considering clusters 1 (pink nodes) and 2 (blue nodes): i) predominantly decreased abundance the last time postinfection (48 hpi) compared to Control and 12 hpi and ii) increased abundance in the last time postinfection (48 hpi) compared to Control and 12 hpi. In contrast, cluster 3 presented a different abundance pattern. Protein abundance abruptly decreased at 12 hpi compared to the control and

drastically increased from 12 to 48 hpi. Despite 158 protein groups in cluster 3, only four protein groups were present in the heatmap analysis (**Figures 4B, C**).

### Abundance of Chikungunya Virus Peptides Throughout Infection

Since growth kinetics and TEM showed an increase of viral particles until 48 h (**Figure 2**), the percentage of identified CHIKV peptides was expected to increase during the course of infection, as observed in **Figure 5**, reaching only about 0.4% of all identified peptides at 48 hpi. It is noteworthy to mention that an MOI of 0.1 was used to infect Aag-2 cells. A previous study developed by our group used MOI of 1 to infect mosquito cells with MAYV, and a higher percentage of viral peptides was observed (Vasconcellos et al., 2020).

Two CHIKV proteins were identified at 12 and 48 hpi, referring to P1234 (Q8JUX6) and structural (Q8JUX5) polyproteins. None of them were found to be regulated. Both



polyproteins are proteolytically cleaved along the viral infectious cycle into non-structural (nsP1–4) and structural proteins (CP, E3, E2, 6k, and E1) (Solignat et al., 2009). Regarding CHIKV peptides, three of them were differentially abundant (**Figure 5B**), all part of the structural polyprotein (Q8JUX5). Two peptides (NPTVTYGK and NQVIMLLYPDHPHTLLSYR) were identified in the region of the spike glycoprotein E2 and one (QAGQLAQLISAVNK) as part of the CP (**Figure 5B**).

## Bioinformatics

Volcano plot (**Figure 4A**) and PPCA (**Supplementary Figure 2F**) showed a more similar abundance pattern of protein groups between 12 hpi and the uninfected condition, rather than 48 hpi. In agreement, no enriched pathway was found between the 12 hpi vs. Control by GAGE enrichment analysis (data not shown), while the time point comparisons encompassing 48 hpi displayed a difference in the protein abundance related to several pathways. Eight KEGG sets were enriched: ribosome (aag03010), biosynthesis of amino acids (aag01230), carbon metabolism (aag01200), metabolic pathways (aag01100), propionate metabolism (aag00640), valine, leucine and isoleucine degradation (aag00280), citrate cycle (tricarboxylic acid (TCA) cycle) (aag00020), and glycolysis/gluconeogenesis (aag00010) (**Figure 6**). Interestingly, the ribosome (aag03010) set was the only gene set to present a negative level change, suggesting the presence of proteins more abundant in the Control compared to 48 hpi. In contrast, carbon metabolism was enriched in both comparisons, with a great positive level change in 48- compared to 12-hpi comparison. Moreover, other pathways presented a positive level change in both comparisons, and some of these sets could be related to energy metabolic processes, such as the citrate cycle (TCA cycle) (aag00020), glycolysis/gluconeogenesis (aag00010), and

metabolic pathways (aag01100) (**Figure 6**). These observations suggest an enhanced carbon metabolism and a decreased abundance in proteins related to ribosomes at 48 hpi.

Regulated proteins at 48 hpi compared to Control (**Figure 7A**) and at 48 compared to 12 hpi (**Figure 7B**) were submitted to STRING analysis to predict the PPI network to highlight regulated biological processes. The main biological terms encountered in the PPI clusters were related to carbon metabolic processes and protein synthesis as observed by GAGE analysis (**Figure 6**). Overall, in the two pairwise comparisons, PPI clusters with Gene Ontology (GO) terms related to energetic metabolism presented predominantly positive FC in the PPI network at 48 hpi. Conversely, PPI clusters with terms related to protein synthesis were mostly represented by proteins with lower FC in the PPI network at 48 hpi.

## DISCUSSION

### *De Novo* Synthesis of the Virus Over 48 h

Higher demand for structural proteins for *de novo* synthesis of virions could explain the progressive detection of viral structural components over 48 h (**Figures 3, 5**). In an alphaviral particle, 240 monomers of CP protein are structured together to form the capsid, in which about 80 trimeric E1/E2 proteins called spikes are inserted (Brown et al., 2018). Therefore, 240 CP and approximately 240 E2 proteins (80 ×3) are required to assemble a single CHIKV particle. E2 belongs to the immunoglobulin superfamily, and its cytosolic domain interacts with CP; thus, E2-CP interaction is needed for viral particle assembly and budding (Cunha et al., 2020). CP itself is responsible for the packaging of viral genomic RNA. Together, they form the nucleocapsid (Brown et al., 2018).

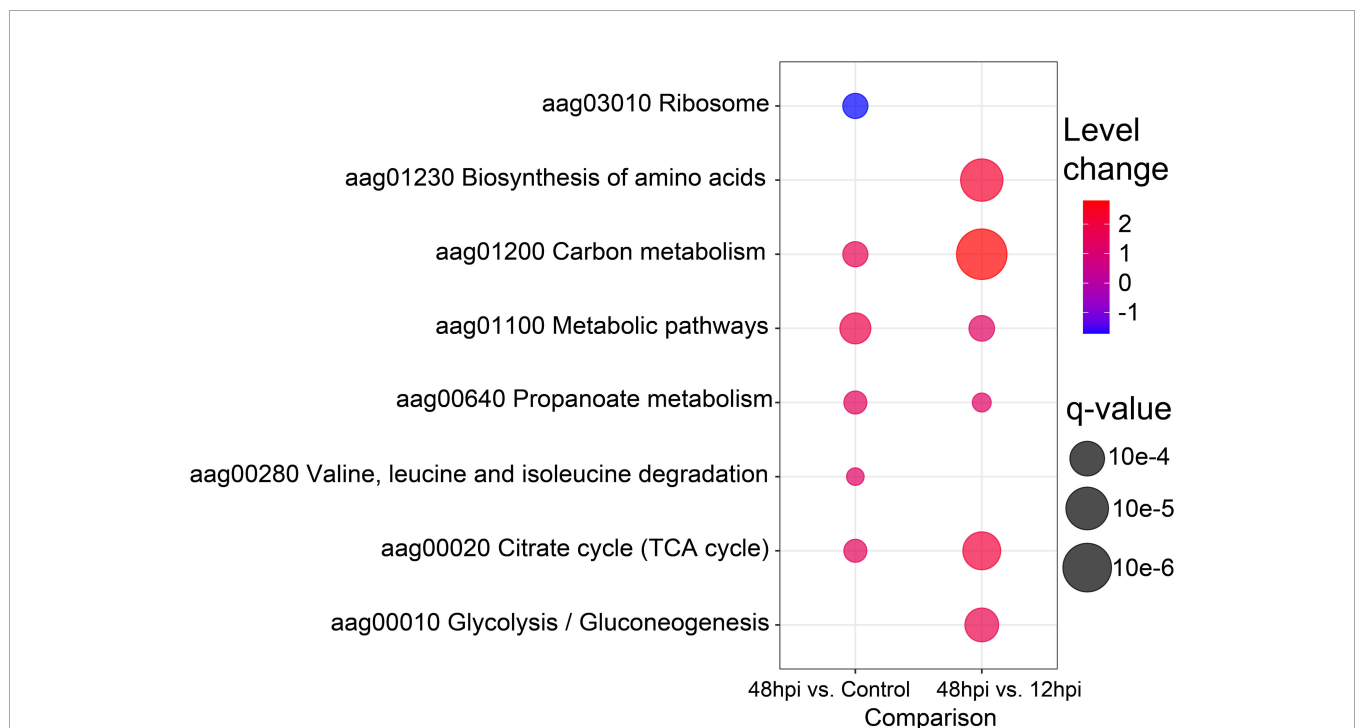
## Protein Synthesis Inhibition of Chikungunya Virus-Infected Aag-2 Cells at 48 hpi

Since viruses are intracellular parasites that carry only their genomes and specific proteins; they depend on recruiting several host proteins to replicate, such as ribosomal proteins (RPs) (Petit and Shah, 2019). RPs may cause different effects in a virus life cycle: enhancing viral proliferation, translating viral proteins, or even inhibiting viral infection. Usually, after viral infection, host mRNA translation is suppressed (Li, 2019). In this study, we could identify several proteins related to protein syntheses, such as proteins of Spliceosome, Ribonucleoprotein complex, Cytoplasmic translation, and Ribosome. These proteins were predominantly downregulated over 48 h in all analyses performed. Specifically, in VSclust analysis, cluster 1 proteins were overrepresented with GOs related to protein synthesis (Supplementary Figure 3), while differentially abundant proteins related to protein metabolism are present in the PPI networks (Figure 7), and the enrichment analysis of the KEGG pathway ribosome gene set is enriched with negative level change at 48 hpi (Figure 6). Previous reports revealed a widespread translational shutoff of human fibroblasts in the late stages of CHIKV infection (White et al., 2011). Despite the translational shutoff, the translation of CPs remained active (White et al., 2011). Moreover, Cui et al. (2020) observed that CHIKV-infected *Ae. aegypti* mosquitoes had protein synthesis perturbed/inhibited from 24 to 96 hpi. Other viruses, such as poxvirus, influenza viruses, and hantaviruses, are also known to inhibit

host protein synthesis. In these cases, inhibition is performed by affecting the cap of host mRNA and its interactions with eukaryotic initiation factor 4 (eIF4). On the other hand, measles virus, rabies virus, and foot-and-mouth disease virus target eukaryotic initiation factor 3 (eIF3), also resulting in host protein translation inhibition (Walsh and Mohr, 2011). In the present study, we detected three downregulated subunits of the eIF3 at 48 hpi when compared to 12 hpi and/or Control: eIF3 subunit C (Q17Q06, FC 48 hpi vs. Control  $-0.43$ , Cluster 1), eIF3 subunit M (Q17D30, FC 48 hpi vs. Control  $-0.28$ , Cluster 1), and eIF3 subunit G (Q1HQ4, FC 48 hpi vs. Control  $-1.22$ , FC 48 vs. 12 hpi  $-1.61$ , Cluster 1). eIF3 subunits interact with mRNA, eIF4, and the 40S ribosomal subunit. These results suggest that CHIKV induces a protein synthesis shutoff of host proteins in Aag-2 cells, in the same manner as observed before in human cells.

## A Higher Energy Metabolism Demand Is Required for Chikungunya Virus-Infected Aag-2 Cells at 48 hpi

Proteomics revealed that proteins related to energy metabolism processes such as the TCA cycle, glycolysis/gluconeogenesis, and carbon metabolism were more abundant at 48 hpi rather than uninfected and 12 hpi in KEGG enrichment (Figure 6). Supporting this observation, STRING PPI analysis showed four *Ae. aegypti* ATP synthesis-related proteins with an elevated abundance at 48 hpi (Figure 7). The Rieske subunit of the ubiquinol-cytochrome b-c1 reductase (CIII mitochondrial)



**FIGURE 6** | Bubble plot of enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. The eight enriched KEGG pathways by Generally Applicable Gene-set Enrichment (GAGE) analysis ( $q$ -value  $< 0.1$ ) are shown in a bubble plot according to their  $q$ -values and level changes, where level changes represent the magnitude of KEGG pathway variation, and  $q$ -value the significance for each gene-set enrichment.

(Q17EQ1, FC 48 hpi vs. Control +0.43, Cluster 2) acts by transferring electrons from ubiquinol to cytochrome *c* (cyt *c*) as part of electron transport chain step of oxidative phosphorylation. This protein complex is essential for the respiratory chain functioning (Zara and Conte, 2011), and it allows a proton gradient across the mitochondrial membrane for ATP production by ATP synthase (Shi et al., 2018). The mitochondrial ATP synthase (Q1HR38, FC 48 vs. 12 hpi +0.95, Cluster 3) and ATP synthase gamma subunit (Q16XK3, FC 48 vs. 12 hpi +0.48, Cluster 3) presented an elevated FC at 48 hpi. Considering the comparison of 48 hpi vs. Control, the ATP synthase alpha subunit (Q1HRQ7, FC 48 hpi vs. Control +0.18, Cluster 2) was also more abundant.

Interestingly, two putative mitochondrial RPs were more abundant at 48 hpi. Although mitochondria have derived from endosymbiotic bacteria, mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) have strongly diverged in structure and function (Greber and Ban, 2016). Mitoribosomes became specialized in synthesizing membrane proteins, such as important complexes of the mitochondrial respiratory chain (Greber and Ban, 2016). In this study, the putative mitochondrial RP L48 (Q16W93, FC 48 hpi vs. Control +0.86, 48 vs. 12 hpi +0.89) and the putative mitochondrial RP S18A (Q172K6, FC 48 hpi vs. control +0.26) were upregulated at 48 hpi. As long as mitoribosomes are specialized in the mitochondrial protein synthesis, which may include proteins associated with metabolic pathways, this phenomenon could support this higher demand of energy production by host cells for the establishment of CHIKV infection. The mitochondrial metabolic pathway to generate energy on CHIKV-infected Aag-2 cells is overrepresented over 48 h of infection, in agreement with previous CHIKV-infected mosquito cell studies (Lee and Chu, 2015; Vasconcellos et al., 2020; Cui et al., 2020).

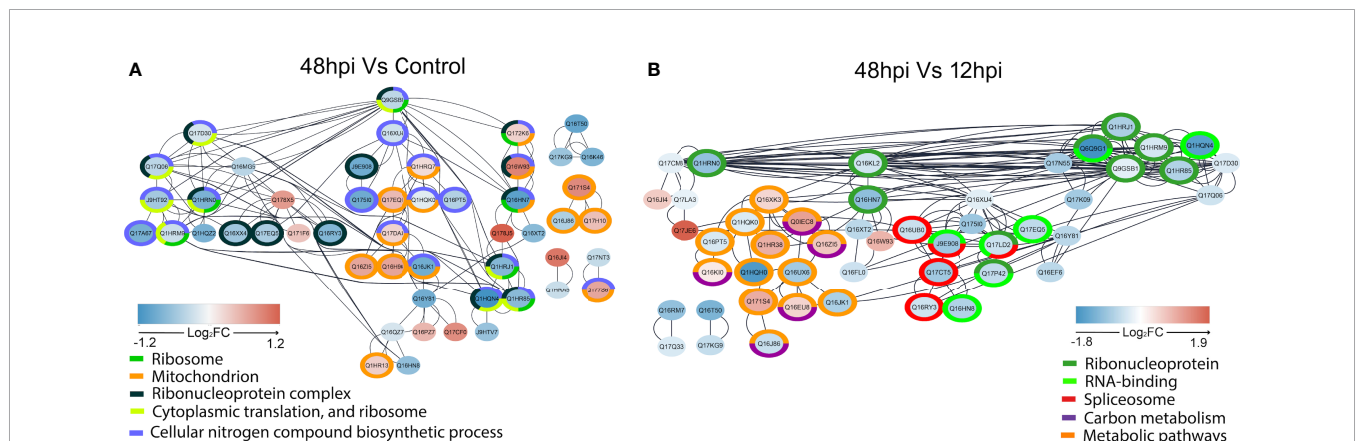
Additionally, TEM images exhibited at late-stage infection some mitochondria with an unexpected elongated morphology (Figure 3F), as observed in mammalian cells infected with DENV and Zika virus (ZIKV). The same phenomenon was not

observed for other *Flaviviridae* members such as West Nile virus (WNV) and hepatitis C virus (HCV) (Chatel-Chaix et al., 2016). In healthy cells, mitochondria form a dynamic net with repeated fission and fusion events that aim to exclude damaged cells by mitophagy, ensuring homeostasis (Tiku et al., 2020). The virus-derived mitochondrial elongation causes an imbalance in this fission and fusion dynamics, allowing damaged or non-efficient mitochondria to stay active in the net (Kim et al., 2017). It has also been observed that infections caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and HIV are also linked to a shift in mitochondrial dynamics toward fusion (elongation), while other viruses cause a shift toward fission (Kim et al., 2017; Tiku et al., 2020). This imbalance could potentially impair energy metabolism and, consequently, lead to glycolysis activation in order to reset energy levels.

In *Influenza*-infected mammalian cells, a mitochondrial membrane disruption with a consequent decrease in ATP levels has been observed, requiring glycolysis activation (Ritter et al., 2010). Moreover, the enhancement of the glycolytic pathway using drugs allowed for higher *Influenza* replication levels (Ren et al., 2021). Other viruses such as DENV, murine norovirus (MNV), human cytomegalovirus (HCMV), and herpes simplex virus 1 (HSV1) also induce increased levels of glycolysis in their host cells (Passalacqua et al., 2019; Thaker et al., 2019). Herein, we suggest that this higher energy demand at a later infection time point could possibly occur due to CHIKV particle production and release, but also due to the consequences of the stress-associated attempt of Aag-2 cells to recover homeostasis. Since energy-related metabolic pathways are host factors that can determine the outcome of a viral infection, they are frequently manipulated by viruses, in different ways, to favor their replication.

### Prohibitins Are Likely Important for Chikungunya Virus Infection in Aag-2 Cells

Prohibitins (PHBs) form a highly evolutionary conserved family of proteins that can act in different cell compartments,



**FIGURE 7** | STRING network interaction analysis of regulated proteins in 48 hpi vs. Control (A) and 48 vs. 12 hpi (B). Interactions of regulated proteins analyzed by one-way ANOVA with *post-hoc* Bonferroni multiple test correction ( $p$ -value < 0.05) were assessed by STRING without text mining and imported to the Cytoscape, where overrepresentation analysis of biological terms was performed. The overrepresented terms are indicated by different colors in the legends, and the proteins that belong to these terms are circled in the respective colors.  $\text{Log}_2\text{FC}$  are represented by filled colors (red for upregulated and blue for downregulated), and smaller node distances correspond to higher protein–protein interaction scores.

such as the plasmatic membrane, nucleus, and inner mitochondrial membrane, having specific site-associated functions (Mishra et al., 2006; Merkwirth et al., 2007). Moreover, these proteins are ubiquitously expressed in animals, plants, and fungi (Chowdhury et al., 2014). In this study, two PHBs were upregulated at 48 hpi: A0A6I8TPE2 (FC 48 hpi vs. Control +0.42), which is generically classified as membranous in the UniProt database, and Q1HR13 (FC 48 hpi vs. Control +0.28). The second PHB is classified as a mitochondrial inner membrane protein in the UniProt database. In addition, it is also listed as an overrepresented mitochondrion gene set (orange) of the STRING PPI analysis when comparing 48 hpi vs. Control (**Figure 7A**). Mitochondrial PHBs have an important role in stabilizing the dynamin-related OPA1, a protein that promotes mitochondrial fusion (Merkwirth et al., 2007; Ban et al., 2017). These PHBs also contribute to the electron chain transport activity, to maintain the integrity of the mitochondrial inner membrane (Foo et al., 2021). Furthermore, previous studies on arboviruses have identified surface PHB as a receptor for DENV entrance in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* cells. The same mechanism is observed for CHIKV concerning different mammalian cell types (Hidari and Suzuki, 2011; Wintachai et al., 2012). A previous study from our group also showed that PHB abundance from MAYV-infected Aag-2 cells was increased over 48 hpi (Vasconcellos et al., 2020). Overall, PHBs could have two relevant roles for CHIKV infection in *Ae. aegypti* cells: to act as a surface receptor, allowing viral entrance, and to support the inner mitochondrial membrane and mitochondrial fusion. These mechanisms could explain the elongated mitochondrial morphology observed in the 48-hpi TEM image (**Figure 3F**).

### Mitochondrial Elongation May Be Related to Later Apoptosis During Chikungunya Virus Infection

In addition to bioenergetic metabolism, mitochondria also play a central role in innate immune signaling and cell survival (Kim et al., 2017). The fission and fusion imbalance possibly caused by the virus in the mitochondrial net can also impair host homeostasis and progression of the cell cycle, leading to apoptosis activation (Tiku et al., 2020). In a viral replication cycle, early activation of programmed cell death may not be advantageous if higher amounts of viral particles are ready to be released during later infection time points. Thus, postponing host cell death is a signal of a well-succeeded infection (Datan et al., 2016). It has been reported that during CHIKV infection, reactive oxygen species (ROS)-activated autophagy mediates a signaling cascade that delays apoptotic cell death in mammalian cells (Joubert et al., 2012), a scenario that benefits viral propagation. While DENV and ZIKV also manipulate host autophagy to improve their replication levels (Datan et al., 2016), apoptotic blebs containing CHIKV particles have been observed (Joubert et al., 2012). Furthermore, proteins of viruses such as HCV and HIV have been shown to interact with host mitochondrial membranes to increase ROS production and benefit viral replication (Foo et al., 2021).

Two significant cell sites for ROS production are the mitochondrial Complexes I and III of the electron transport chain (Chen et al., 2003; Foo et al., 2021). In the present study,

the Aag-2 Rieske subunit of the ubiquinol-cytochrome b-c1 reductase (CIII) mitochondrial complex (Q17EQ1, FC 48 hpi vs. Control +0.43, Cluster 2) was more abundant at 48 hpi rather than at 12 hpi and Control. This complex acts by transferring electrons to cyt *c*, another compound well known to trigger apoptosis (Jiang and Wang, 2004). Moreover, cyt *c* also has dual functions in energy metabolism and cell death (Cai et al., 1998). When released from mitochondria, cyt *c* interacts with the apoptotic protease activating factor 1 (Apaf1) to form a complex that activates caspase 9, which is cleaved into caspases 3 and 7 (Bratton and Salvesen, 2010). Then, this cyt *c*-dependent release of the caspases 3 and 7 triggers protein degradation and apoptosis in host cells (Jiang and Wang, 2004). In this study, we propose that CHIKV might create a mitochondrial net imbalance in *Ae. aegypti* cells to delay apoptosis in a ROS-dependent fashion and, consequently, earn some proliferation time.

### Different Aag-2 RNA Helicases Were Modulated

We have observed 8 host RNA helicases that presented a differential abundance in the proteomic dataset. Three of them were upregulated over time points: QOIEJ1 (FC 12 hpi vs. Control +1.19, Cluster 2), A0A1S4E2S3 (FC 12 hpi vs. Control +0.55 and FC 48 hpi vs. Control +0.66, Cluster 2), and Q178X5 (FC 12 hpi vs. Control +0.49 and FC 48 hpi vs. Control +0.69). The rest of them were downregulated over time points: A0A1S4F0V4 (FC 12 hpi vs. Control -0.43 and FC 48 hpi vs. Control -0.71), Q16XX4 (FC 48 hpi vs. Control -0.62), Q16RY3 (FC 48 hpi vs. Control -0.81 and FC 48 vs. 12 hpi -0.48, Cluster 1), A0A6I8TAB4 (FC 48 vs. 12 hpi -0.28, Cluster 1), and Q17CT5 (FC 48 vs. 12 hpi -0.91) (**Supplementary Table 2**). In agreement with UniProt database predictions, six RNA helicases (QOIEJ1, A0A1S4E2S3, Q178X5, A0A1S4F0V4, Q16XX4, and Q16RY3) presented three conserved motifs: Q-motif, helicase ATP-binding, and helicase C-domain. The remaining two RNA helicases (A0A6I8TAB4 and Q17CT5) have no Q-motif. From these predictions, it was also observed that all RNA helicases in our study are classified as members of the DEAD/DEAH box helicases family (Schmid and Linder, 1992; Tanner and Linder, 2001; Caruthers and McKay, 2002; Tanner et al., 2003). Recent reports have shown that DEAD/DEAH box RNA helicases are also important for the recognition of foreign nucleic acids and modulation of viral infection, possibly acting as sensors for innate immune mechanisms that will influence viral replication (Fullam and Schröder, 2013; Taschuk and Cherry, 2020; Ali, 2021).

Frequently, DEAD/DEAH box RNA helicases are also referred to as DDX (Fullam and Schröder, 2013; Ali, 2021). For hepatitis B virus (HBV) in human cells, DDX3 binds to HBV reverse transcriptase, activating a signaling cascade that impairs IFN-regulatory factors (IRF) and IFN- $\beta$  promoter activity, facilitating viral replication (Wang and Ryu, 2010). However, at later infection stages, DDX3 is required to contain HBV reverse transcription, therefore hampering its replication (Wang et al., 2009). These proviral and antiviral patterns related to DDX are similarly found during infection by other arboviruses. *Ae. aegypti*



DDX6 has antiviral properties against ZIKV and WNV. In both cases, DDX6 binds to the 3' UTR subgenomic flavivirus RNA (sfRNA), inhibiting viral replication in Aag-2 cells (Göertz et al., 2019). During DENV infection, DDX3X supposedly interacts with viral capsid to inhibit DENV replication (Kumar et al., 2018). For CHIKV infection, the *Ae. aegypti* DEAD-box helicase RM62F was found to interact with the viral protein nsP3 in Aag-2 cells, leading to suppression of RNAi pathway for gene silencing (Kumar et al., 2021). It is noteworthy to mention that the interfering RNA mechanism for post-transcriptional gene silencing is an antiviral conserved hallmark for hosts such as nematodes, insects, fungi, and plants (Chang et al., 2012; Gammon et al., 2017; Vogel et al., 2019; Schuster et al., 2019).

Overall, different classes of host DEAD/DEAH box RNA helicases can contribute to immune-modulatory mechanisms or even be hijacked by viruses to support their replication. Therefore, these proteins may act in a proviral fashion and as antiviral effectors (Ali, 2021). It is tempting to suppose that the 8 DEAD/DEAH box RNA helicases that displayed a differential abundance could support both cellular mechanisms in CHIKV-infected Aag-2 cells. Possibly, a preparation phase for CHIKV viral particle production before programmed cell death would require the three DEAD/DEAH box RNA helicases found as upregulated in our dataset (Q0IEJ1, A0A1S4E2S3, and Q178X5). However, once CHIKV infection is established, the five remaining downregulated RNA helicases (A0A1S4F0V4, Q16XX4, Q16RY3, A0A6I8TAB4, and Q17CT5) could reflect a suggestive inhibition strategy of antiviral mechanisms, such as RNAi, to support viral replication. In fact, it has been already shown that Ago2, a component of the RNAi machinery, was downregulated at 48 hpi in CHIKV-infected Aag-2 cells (Kumar et al., 2021). Since we have observed a significant count of viral particles in the Aag-2 cells at 48 hpi (**Figure 3G**) and an increasing abundance percentage of CHIKV peptides throughout the infection (**Figure 4**), we suggest that DEAD/DEAH box RNA helicases could be involved in both pro- and antiviral host strategies to promote the propagation.

## Conclusions

The present report brings an analysis of the molecular aspects of *Ae. aegypti* cells infected with CHIKV, by which 196 Aag-2 proteins were modulated upon CHIKV infection. Mainly, our study has shown that these host proteins are associated with protein synthesis, signaling pathways, energy metabolism, and apoptosis. The notorious viral count produced by mosquito cells over 48 h observed by our TEM analysis probably has influenced the host energy metabolism, in order to produce more ATP, as revealed by the label-free quantitative proteomic analysis. It would be interesting to study if glycolysis in Aag-2 cells could be activated upon viral infection to increase cell ATP levels and sustain virus replication, by analyzing the effect of glycolysis inhibitors, such as 2-deoxy-D-glucose (2DG). Moreover, the mitochondrial elongated morphology observed at 48 hpi may reflect a mitochondrial net imbalance that could affect energy metabolism and regulate apoptosis timing. It is widely accepted that different virus species modulate

mitochondrial bioenergetics to enhance viral replication. As part of a central role in the viral replication and oxidative stress, the (dys)function of host mitochondria seems to be an essential element for many viruses (El-Bacha and Da Poian, 2013). For instance, an enhanced level of ROS inhibits DENV infection (Khan et al., 2021). In the ZIKV, this ROS imbalance is associated with mitochondrial and DNA damage in human astrocytes (Ledur et al., 2020). In both cases, the use of fluorescent probes against free radicals, such as 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) and dihydroethidium (DHE), were respectively used (Ledur et al., 2020; Khan et al., 2021). Perhaps novel studies regarding free radicals production upon CHIKV infection could cast a glance on whether the same phenomena could take place in Aag-2 insect cells. Based on what is observed in other vector-borne viruses, these classes of proteins may be acting in a pro- and antiviral fashion to support the balance between viral propagation and the survival inside host cells, leading to the persistent infection. Additionally, metabolomics studies would provide complementary information regarding subtle metabolic shifts (Tounta et al., 2021). Overall, our data may contribute to a better comprehension of the adaptive molecular mechanisms of *Ae. aegypti* concerning CHIKV infection.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The name of the repository and accession number can be found below: ProteomeXchange via the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2018) database; PXD032321.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AV, SM, AO, SC, and RR designed the study. AV and AO performed the infection experiments. SC and RR supervised the experiments. SM, EM, and MT performed the LC-MS/MS analysis. RM performed the bioinformatics analysis. AV, RM, LO, and SC interpreted the data, designed the figures, and wrote the manuscript. SB performed electron microscopy. All authors revised and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by grants and fellowships awarded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF, 0193.000417/2016 and 00193-00000779/2021-40), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 23038.013502/2020-21), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, INCT-MCTI/CNPq/FAPs 16/2014), and Fiocruz (INOVA Program). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gorben Pijlman, PhD (Wageningen University and Research, Netherlands), for providing Aag-2 cells and the Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF) for providing our CHIKV isolate.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.920425/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1 |** Optical microscopy of infection tests using Vero cells. Vero cells were mock-infected (A) and infected with Dengue virus 2 (DENV2) (B), Mayaro virus (MAYV) (C) and Chikungunya virus (CHIKV) (D), separately, using MOI

## REFERENCES

- Achee, N. L., Grieco, J. P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., et al. (2019). Alternative Strategies for Mosquito-Borne Arbovirus Control. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, 1–22. doi: 10.1371/journal.pntd.0006822
- Ali, M. A. M. (2021). DEAD-Box RNA Helicases: The Driving Forces Behind RNA Metabolism at the Crossroad of Viral Replication and Antiviral Innate Immunity. *Virus Res.* 296, 198352. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198352
- Azevedo, R. S. S., Oliveira, C. S., and Vasconcelos, P. F. C. (2015). Chikungunya Risk for Brazil. *Rev. Saúde Pública* 49, 1–6. doi: 10.1590/S0034-8910.2015049006219
- Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., et al. (2017). Molecular Basis of Selective Mitochondrial Fusion by Heterotypic Action Between OPA1 and Cardiolipin. *Nat. Cell Biol.* 19, 856–863. doi: 10.1038/ncb3560
- Brackney, D. E., Scott, J. C., Sagawa, F., Woodward, J. E., Miller, N. A., and Schilkey, F. D. (2010). C6/36 *Aedes Albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 24–27. doi: 10.1371/journal.pntd.0000856
- Bratton, S. B., and Salvesen, G. S. (2010). Regulation of the Apaf-1-Caspase-9 Apoptosome. *J. Cell Sci.* 123, 3209–3214. doi: 10.1242/jcs.073643
- Brown, R. S., Wan, J. J., and Kielian, M. (2018). The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses* 10, 1–21. doi: 10.3390/v10020089
- Burt, F. J., Chen, W., Miner, J. J., Lenschow, D. J., Merits, A., Schnettler, E., et al. (2017). Chikungunya Virus: An Update on the Biology and Pathogenesis of This Emerging Pathogen. *Lancet Infect. Dis.* 17, e107–e117. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30385-1
- Cai, J., Yang, J., and Jones, D. P. (1998). Mitochondrial Control of Apoptosis: The Role of Cytochrome C. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1366, 139–149. doi: 10.1016/S0005-2728(98)00109-1
- Caruthers, J. M., and McKay, D. B. (2002). Helicase Structure and Mechanism. *Cur. Opin. Struct. Biol.* 12, 123–133. doi: 10.1016/S0959-440X(02)00298-1
- Chang, S. S., Zhenyu, Z., and Liu, Y. (2012). RNA Interference Pathways in Fungi: Mechanisms and Functions. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 305–323. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150138
- Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C. J., Fischl, W., et al. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* 20, 342–356. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.008
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., and Lesnfsky, E. J. (2003). Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Central Role of Complex III. *J. Biol. Chem.* 278, 36027–36031. doi: 10.1074/jbc.M304854200
- Chowdhury, I., Thompson, W. E., and Thomas, K. (2014). Prohibitins Role in Cellular Survival Through Ras-Raf-MEK-Erk Pathway. *J. Cell Physiol.* 229, 998–1004. doi: 10.1002/jcp.24531
1. Visually, the CHIKV isolate was more virulent, leading to a higher degree of cytopathic effect (formation of syncytia and cell death) than DENV2 and MAYV isolates. Vero cells are fixed in culture and produce an extracellular matrix that is degraded after cell death. Then, cells become rounded.
- Supplementary Figure 2 |** Quality control of protein group identification and quantification. (A) Boxplot of log<sub>2</sub> protein group abundances. (B) Histogram of log<sub>2</sub> protein groups abundances. (C) Number of valid values according to the number of replicates, cut-off of three replicates was used in this analysis, represented by the dashed line. (D) filter for ANOVA and g-test analysis, only ANOVA filter was used, set by two replicates per group, represented by the dashed line. (E) robust Mahalanobis distance analysis considering Correlation, median absolute deviation, skewness and proportion of missing values, suggesting the absence of extreme outliers (p-value = 1e-04). (F) probabilistic principal component analysis of protein group abundances according to each replicate.
- Supplementary Figure 3 |** Bubble plot of enriched biological process GO terms in VSclust clusters. GO terms enrichment values are represented by colored circumferences. A clear predominance of translation GO terms can be seen in the enriched terms of Cluster 1, mainly in those with eneRatio values.
- Chowdhury, A., Modahl, C. M., Missé, D., Kini, R. M., and Pompon, J. (2021). High Resolution Proteomics of *Aedes Aegypti* Salivary Glands Infected With Either Dengue, Zika or Chikungunya Viruses Identify new Virus Specific and Broad Antiviral Factors. *Sci. Rep.* 11, 1–12. doi: 10.1038/s41598-021-03211-0
- Conte, L., and Zara, V. (2011). The Rieske Iron-Sulfur Protein: Import and Assembly Into the Cytochrome Bc1 Complex of Yeast Mitochondria. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2011, 1–9. doi: 10.1155/2011/363941
- Cui, Y., Liu, P., Mooney, B. P., Franz, A. W. E., Gehrke, C. W., and States, U. (2020). Quantitative Proteomic Analysis of Chikungunya Virus-Infected *Aedes Aegypti* Reveals Proteome Modulations Indicative of Persistent Infection. *J. Proteome Res.* 19, 2443–2456. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00173. Quantitative
- Cunha, M. S., Costa, P. A. G., Correa, I. A., de Souza, M. R. M., Calil, P. T., da Silva, G. P. D., et al. (2020). Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. *Front. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.01297
- Datan, E., Roy, S. G., Germain, G., Zali, N., McLean, J. E., Golshan, G., et al. (2016). Dengue-Induced Autophagy, Virus Replication and Protection From Cell Death Require ER Stress (PERK) Pathway Activation. *Cell Death Dis.* 7, e2127. doi: 10.1038/cddis.2015.409
- Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., and Jensen, L. J. (2019). Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J. Proteome Res.* 18, 1623–1632. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00702
- El-Bacha, T., and Da Poian, A. T. (2013). Virus-Induced Changes in Mitochondrial Bioenergetics as Potential Targets for Therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 41–46. doi: 10.1016/j.biocel.2012.09.021
- Figueiredo, M. L. G., and Figueiredo, L. T. M. (2014). Review Article Emerging Alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* 47, 677–683. doi: 10.1590/0037-8682-0246-2014
- Foo, J., Bellot, G., Pervaiz, S., and Alonso, S. (2021). Mitochondria-Mediated Oxidative Stress During Viral Infection. *Trends Microbiol.* 30, 1–14. doi: 10.1016/j.tim.2021.12.011
- Fullam, A., and Schröder, M. (2013). DEXD/H-Box RNA Helicases as Mediators of Anti-Viral Innate Immunity and Essential Host Factors for Viral Replication. *BBA* 854–865. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.03.012
- Galán-Huerta, K. A., Rivas-Estilla, A. M., Fernández-Salas, I., Farfan-Ale, J. A., and Ramos-Jiménez, J. (2015). Chikungunya Virus: A General Overview. *Med. Univ.* 17, 175–183. doi: 10.1016/j.rmu.2015.06.001
- Galili, T. (2015). Dendextend: An R Package for Visualizing, Adjusting and Comparing Trees of Hierarchical Clustering. *Bioinformatics* 31, 3718–3720. doi: 10.1093/bioinformatics/btv428
- Galili, T., O'Callaghan, A., Sidi, J., and Sievert, C. (2017). Heatmaply: An R Package for Creating Interactive Cluster Heatmaps for Online Publishing. *Bioinformatics* 34, 1600–1602. doi: 10.1093/bioinformatics/btx657
- Gammon, D. B., Ishidate, T., Li, L., Gu, W., Silverman, N., and Mello, C. C. (2017). The Antiviral RNA Interference Response Provides Resistance to Lethal

- Arbovirus Infection and Vertical Transmission in *Caenorhabditis Elegans*. *Curr. Biol.* 176, 139–148. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.004
- Göertz, G. P., van Bree, J. W. M., Hiralal, A., Fernhout, B. M., Steffens, C., Boeren, S., et al. (2019). Subgenomic Flavivirus RNA Binds the Mosquito DEAD/H-Box Helicase ME31B and Determines Zika Virus Transmission by *Aedes Aegypti*. *PNAS* 116, 19136–19144. doi: 10.1073/pnas.1905617116
- Greber, B. J., and Ban, N. (2016). Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 103–132. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014343
- Hidari, K. I. P. J., and Suzuki, T. (2011). Dengue Virus Receptor. *Trop. Med. Heal.* 39, 37–43. doi: 10.2149/tmh.2011-S03
- Jiang, X., and Wang, X. (2004). Cytochrome C-Mediated Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 87–106. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706
- Joubert, P. E., Werneke, S. W., Calle, C., Guivel-Benhassine, F., Giadini, A., Peduto, L., et al. (2012). Chikungunya Virus-Induced Autophagy Delays Caspase-Dependent Cell Death. *J. Exp. Med.* 209, 1029–1047. doi: 10.1084/jem.20110996
- Khan, N. A., Kar, M., Panwar, A., Wangchuk, J., Kumar, S., Das, A., et al. (2021). Oxidative Stress Specifically Inhibits Replication of Dengue Virus. *J. Gen. Virol.* 102, 1–14. doi: 10.1099/JGV.0.001596
- Kim, S. J., Ahn, D. G., Syed, G. H., and Siddiqui, A. (2017). The Essential Role of Mitochondrial Dynamics in Antiviral Immunity. *Mitochondrion* 41, 21–27. doi: 10.1016/j.mito.2017.11.007
- Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., and Smith, D. R. (2010). Identification and Characterization of Prohibitin as a Receptor Protein Mediating DENV-2 Entry Into Insect Cells. *Virology* 406, 149–161. doi: 10.1016/j.virol.2010.07.015
- Kumar, R., Singh, N., Abdin, M. Z., Patel, A. H., and Medigeshi, G. R. (2018). Dengue Virus Capsid Interacts With DDX3X-A Potential Mechanism for Suppression of Antiviral Functions in Dengue Infection. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00542
- Kumar, R., Srivastava, P., Mathur, K., Shrinet, J., Dubey, S. K., Chinnappan, M., et al. (2021). Chikungunya Virus Non-Structural Protein Nsp3 Interacts With *Aedes Aegypti* DEAD-Box Helicase RM62F. *Virus Dis.* 32, 657–665. doi: 10.1007/s13337-021-00734-y
- Langsjoen, R. M., Haller, S. L., Roy, C. J., Vinet-Oliphant, H., Bergren, N. A., and Erasmus, J. H. (2018). Chikungunya Virus Strains Show Lineage-Specific Variations in Virulence and Cross-Protective Ability in Murine and Nonhuman Primate Models. *MBio* 9, 1–13. doi: 10.1128/mBio.02449-17
- Ledur, P. F., Karmirian, K., Pedrosa, C. S. G., Souza, L. R. Q., Assis-de-Lemos, G., Martins, T. M., et al. (2020). Zika Virus Infection Leads to Mitochondrial Failure, Oxidative Stress and DNA Damage in Human iPSC-Derived Astrocytes. *Sci. Rep.* 10, 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-57914-x
- Lee, R. C. H., and Chu, J. J. H. (2015). Proteomics Profiling of Chikungunya-Infected *Aedes Albopictus* C6/36 Cells Reveal Important Mosquito Cell Factors in Virus Replication. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–20. doi: 10.1371/journal.pntd.0003544
- Lee, R. C. H., Hapuarachchi, H. C., Chen, K. C., Hussain, K. M., Chen, H., Low, S. L., et al. (2013). Mosquito Cellular Factors and Functions in Mediating the Infectious Entry of Chikungunya Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–17. doi: 10.1371/journal.pntd.0002050
- Li, S. (2019). Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Cells* 8, 508. doi: 10.3390/cells8050508
- Luo, W., Friedman, M. S., Shedden, K., Hankenson, K. D., and Woolf, P. J. (2009). GAGE: Generally Applicable Gene Set Enrichment for Pathway Analysis. *BMC Bioinform.* 10, 1–17. doi: 10.1186/1471-2105-10-161
- Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Löwer, B., Wunderlich, F. T., et al. (2007). Prohibitins Control Cell Proliferation and Apoptosis by Regulating OPA1-Dependent Cristae Morphogenesis in Mitochondria. *Genes Dev.* 22, 476–488. doi: 10.1101/gad.460708.derstood
- Millikin, R. J., Solntsev, S. K., Shortreed, M. R., and Smith, L. M. (2017). Ultrafast Peptide Label-Free Quantification With FlashLFQ. *J. Prot. Res.* 17, 386–391. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00608
- Mishra, S., Murphy, L. C., and Murphy, L. J. (2006). The Prohibitins: Emerging Roles in Diverse Functions. *J. Cell Mol. Med.* 10, 353–363. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00404.x
- Mudunuri, U., Che, A., Yi, M., and Stephens, R. M. (2009). Biobdnet: The Biological Database Network. *Bioinformatics* 25, 555–556. doi: 10.1093/bioinformatics/btn654
- Passalacqua, K. D., Lu, J., Goodfellow, I., Kolawole, A. O., Arche, J. R., Maddox, R. J., et al. (2019). Glycolysis is an Intrinsic Factor for Optimal Replication of a Norovirus. *MBio* 10, 1–18. doi: 10.1128/mBio.02175-18
- Perez-riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-linares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D., et al. (2018). The PRIDE Database and Related Tools and Resources in 2019: Improving Support for Quantification Data. *Nucleic Acids Res.* 47, 442–450. doi: 10.1093/nar/gky1106
- Petit, M. J., and Shah, P. S. (2019). Mapping Arbovirus-Vector Interactions Using Systems Biology Techniques. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fcimb.2018.00440
- R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>.
- Ren, L., Zhang, W., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, H., Zhu, Y., et al. (2021). Influenza A Virus (H1N1) Infection Induces Glycolysis to Facilitate Viral Replication. *Virology* 36, 1532–1542. doi: 10.1007/s12250-021-00433-4
- Ritter, J. B., Wahl, A. S., Freund, S., Genzel, Y., and Reichl, U. (2010). Metabolic Effects of Influenza Virus Infection in Cultured Animal Cells: Intra- and Extracellular Metabolite Profiling. *BMC Syst. Biol.* 4, 1–22. doi: 10.1186/1752-0509-4-61
- RStudio Team (2021). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA. Available at: <http://www.rstudio.com/>.
- Schmid, S. R., and Linder, P. (1992). D-E-A-D Protein Family of Putative RNA Helicases. *Mol. Microbiol.* 6, 283–292. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01470.x
- Schnierle, B. S. (2019). Cellular Attachment and Entry Factors for Chikungunya Virus. *Viruses* 11, 1–9. doi: 10.3390/v11111078
- Schuster, S., Miesen, P., and van Rij, R. P. (2019). Antiviral RNAi in Insects and Mammals: Parallels and Differences. *Viruses* 11, 1–32. doi: 10.3390/v11050448
- Schwämmle, V., and Jensen, O. N. (2018). VSCLust: Feature-Based Variance-Sensitive Clustering of Omics Data. *Bioinformatics* 34, 2965–2972. doi: 10.1093/bioinformatics/bty224
- Sharma, R., Kesari, P., Kumar, P., and Tomar, S. (2018). Structure-Function Insights Into Chikungunya Virus Capsid Protein: Small Molecules Targeting Capsid Hydrophobic Pocket. *Virology* 515, 223–234. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.020
- Shi, S., Zuo, H., Gao, L., Yi, X., and Zhong, G. (2018). Silencing of Rieske Iron-Sulfur Protein Impacts Upon the Development and Reproduction of Spodoptera Exigua by Regulating ATP Synthesis. *Front. Phys.* 9. doi: 10.3389/fphys.2018.00575
- Shrinet, J., Srivastava, P., Kumar, A., Dubey, S. K., Sirisena, P. D. N. N., Srivastava, P., et al. (2018). Differential Proteome Analysis of Chikungunya Virus and Dengue Virus Coinfection in *Aedes Mosquitoes*. *J. Proteome Res.* 17, 3348–359. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00211
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., and Devaux, C. (2009). Replication Cycle of Chikungunya: A Re-Emerging Arbovirus. *Virology* 393, 183–197. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.024
- Solntsev, S. K., Shortreed, M. R., Frey, B. L., and Smith, L. M. (2018). Enhanced Global Post-Translational Modification Discovery With MetaMorpheus. *J. Proteome Res.* 17, 1844–1851. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00873
- Stratton, K. G., Webb-Robertson, B. J. M., McCue, L. A., Stanfill, B., Claborne, D., and Godinez, I. (2019). PmartR: Quality Control and Statistics for Mass Spectrometry-Based Biological Data. *J. Proteome Res.* 18, 1418–1425. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00760
- Strauss, J. H., and Strauss, E. G. (1994). The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 491–562. doi: 10.1128/mmbr.58.3.491-562.1994
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., et al. (2019). STRING V11: Protein-Protein Association Networks With Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome-Wide Experimental Datasets. *Nucleic Acids Res.* 47, D607–D613. doi: 10.1093/nar/gky1131
- Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doëre, M., and Linder, P. (2003). The Q Motif: A Newly Identified Motif in DEAD Box Helicases may Regulate ATP Binding and Hydrolysis. *Mol. Cell* 11, 127–138. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00006-6
- Tanner, N. K., and Linder, P. (2001). DEX/DH Box RNA Helicases: From Generic Motors to Specific Dissociation Functions. *Mol. Cell* 8, 251–262. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00329-X
- Taschuk, F., and Cherry, S. (2020). DEAD-Box Helicases: Sensors, Regulators and Effectors for Antiviral Defense. *Viruses* 12, 181–96. doi: 10.3390/v12020181

- Tchankouo-Nguetcheu, S., Bourguet, E., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A., and Choumet, V. (2012). Infection by Chikungunya Virus Modulates the Expression of Several Proteins in *Aedes Aegypti* Salivary Glands. *Parasites Vectors* 5, 1–11. doi: 10.1186/1756-3305-5-264
- Thaker, S. K., Ch'ng, J., and Christofk, H. R. (2019). Viral Hijacking of Cellular Metabolism. *BMC Biol.* 17, 59. doi: 10.1186/s12915-019-0678-9
- The UniProt Consortium (2021). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D480–D489. doi: 10.1093/nar/gkaa1100
- Tiku, V., Tan, M. W., and Dikic, I. (2020). Mitochondrial Functions in Infection and Immunity. *Trends Cell Biol.* 30, 263–275. doi: 10.1016/j.tcb.2020.01.006
- Tounta, V., Liu, Y., Cheyne, A., and Larrouy-Maumus, G. (2021). Metabolomics in Infectious Diseases and Drug Discovery. *Mol. Omi.* 17, 376–393. doi: 10.1039/d1mo00017a
- Vasconcellos, A. F., Mandacaru, S. C., De Oliveira, A. S., Fontes, W., Melo, R. M., De Sousa, M. V., et al. (2020). Dynamic Proteomic Analysis of *Aedes Aegypti* Aag-2 Cells Infected With Mayaro Virus. *Parasit. Vectors* 13, 1–12. doi: 10.1186/s13071-020-04167-2
- Vasconcellos, A. F., Silva, J. M. F., de Oliveira, A. S., Prado, P. S., Nagata, T., and Resende, R. O. (2019). Genome Sequences of Chikungunya Virus Isolates Circulating in Midwestern Brazil. *Arch. Virol.* 164, 1205–1208. doi: 10.1007/s00705-019-04174-4
- Vogel, E., Santos, D., Mingels, L., Verdonck, T. W., and Broeck, J. V. (2019). RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. *Front. Phys.* 10. doi: 10.3389/fphys.2018.01912
- Walsh, D., and Mohr, I. (2011). Viral Subversion of the Host Protein Synthesis Machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 860–875. doi: 10.1038/nrmicro2655
- Wang, H., Kim, S., and Ryu, W. S. (2009). DDX3 DEAD-Box RNA Helicase Inhibits Hepatitis B Virus Reverse Transcription by Incorporation Into Nucleocapsids. *J. Virol.* 83, 5815–5824. doi: 10.1128/jvi.00011-09
- Wang, H., and Ryu, W. S. (2010). Hepatitis B Virus Polymerase Blocks Pattern Recognition Receptor Signaling via Interaction With DDX3: Implications for Immune Evasion. *PLoS Pathog.* 6, 1–11. doi: 10.1371/journal.ppat.1000986
- Weaver, S. C. (2013). Diseases: Mechanisms and Potential Strategies for Prevention. *Trends Microbiol.* 21, 360–363. doi: 10.1016/j.tim.2013.03.003
- Wenger, C. D., and Coon, J. J. (2013). A Proteomics Search Algorithm Specifically Designed for High-Resolution Tandem Mass Spectra. *J. Proteome Res.* 12, 1377–1386. doi: 10.1021/pr301024c
- White, L. K., Sali, T., Alvarado, D., Gatti, E., Pierre, P., Streblow, D., et al. (2011). Chikungunya Virus Induces IPS-1-Dependent Innate Immune Activation and Protein Kinase R-Independent Translational Shutoff. *J. Virol.* 85, 606–620. doi: 10.1128/jvi.00767-10
- Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (New York: Springer-Verlag).
- Wintachai, P., Wikan, N., Kuadkitkan, A., Jaimipuk, T., Ubol, S., Pulmanasahakul, R., et al. (2012). Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein. *J. Med. Virol.* 84, 521757–521770. doi: 10.1002/jmv.23403
- World Health Organization (2017). “Chikungunya In The European Region,” in *Fact-Sheet*. Available at: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/Climate-change/publications/2014/fact-sheets-world-health-day-2014-vector-borne-diseases/fact-sheet-chikungunya-in-the-who-european-region>.

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Vasconcellos, Melo, Mandacaru, de Oliveira, de Oliveira, Moraes, Trugilho, Ricart, Bão, Resende and Charneau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Capítulo 3.

### **Análise fosfoproteômica de células Aag-2 de *Aedes aegypti* infectadas com os arbovírus MAYV e CHIKV**

#### **3.1. Panorama geral**

Os vírus Mayaro (MAYV) e Chikungunya (CHIKV) são dois alfavírus transmitidos pelo vetor *Aedes aegypti*, que é encontrado em todos os estados brasileiros apesar de décadas de esforços para sua erradicação (Instituto Oswaldo Cruz). Além de ineficaz a longo prazo, o uso de inseticidas selecionou populações de *Ae. aegypti* resistentes a compostos como o DDT, o temefós e a deltametrina (Braga e Valle, 2007). A grande maioria dos inseticidas já utilizados afetam componentes do sistema nervoso que fazem parte de vias de sinalização nas quais atuam diversas quinases e fosfatases, sendo prejudiciais a muitas espécies animais e vegetais, incluindo os seres humanos (Araújo et al., 2023). Para o desenvolvimento de novas formas de combate às arboviroses, pesquisadores têm se dedicado a compreender em detalhes as bases moleculares da interação entre arbovírus e seus vetores. Alguns trabalhos de proteômica do nosso grupo de pesquisa já foram publicados, utilizando as células Aag-2 de *Ae. aegypti* infectadas com MAYV e CHIKV (Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022). Além de uma modulação clara em relação ao metabolismo geral das células Aag-2, uma observação que nos chamou a atenção foi a aparente susceptibilidade diferencial das células Aag-2 às infecções virais, ou, possivelmente, diferentes intensidades de virulência dos vírus em si. Resultados progressos de viabilidade celular, sugerem que o MAYV é menos virulento do que CHIKV (Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022), no entanto, não se sabe se isso ocorre devido às células hospedeiras ou por características biológicas dos vírus. Sabe-se que grande parte da sinalização celular para orquestrar desde processos básicos para a vida até a reagir a situações de estresse envolve cascatas de fosforilação de diferentes proteínas (McCance e Huether, 2014). Levando em consideração o tempo para completar um ciclo replicativo dos alfavírus, cerca de 4 h (Oliveira Mota et al., 2015), objetiva-se aqui realizar uma análise fosfoproteômica de células Aag-2 de *Ae. aegypti* infectadas com os alfavírus MAYV e CHIKV ao longo de 12 h de infecção. Utilizaremos uma multiplicidade de infecção (MOI) idêntica para ambos os vírus, afim de verificar a influência da infecção viral na homeostase da célula hospedeira. Ao final, pretende-se desvendar o que de fato se altera a nível molecular e de sinalização celular das células Aag-2 frente à infecção por dois alfavírus

com aparente virulências diferenciais. Assim, com um conhecimento mais aprofundado a respeito das vias de sinalização que estão envolvidas tanto na defesa antiviral quanto na progressão da infecção, poder-se-á surgir novos *insights* para usar a natureza da interação vírus-vetor como uma forma de combate às arboviroses e seus vetores.

### 3.2. Justificativa

As arboviroses são constantes ameaças em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais, tendo se tornado uma grande preocupação para a gestão da saúde pública. No Brasil, já vivenciamos epidemias tanto de MAYV quanto de CHIKV, tendo esse último vírus causado milhares de casos na última década. Diferentemente do vírus da febre amarela, para o qual existem vacinas aprovadas e eficazes, no caso de infecções por MAYV e CHIKV ainda não há vacinas nem antivirais específicos, o que faz com que a população corra constante risco de infecção. Além disso, o mosquito vetor *Ae. aegypti*, capaz de transmitir ambos os vírus, pode ser encontrado em todo o território brasileiro. Grande parte dos esforços no combate das arboviroses é limitado à erradicação do vetor mosquito, com estratégias de eliminação de focos de oviposição e o uso de inseticidas. Contudo, além de demandar esforços intensos e constantes da população e dos governantes, há o grande risco de desenvolvimento de resistência aos inseticidas, como aconteceu com o *Ae. aegypti* em relação a diversos inseticidas organofosforados, organoclorados e piretroides. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias que abordassem outros aspectos do vetor, dos vírus, ou mesmo da interação vírus-vetor, para diminuir os níveis de transmissão das arboviroses. Como exemplo, bactérias *Wolbachia* spp. foram transfectadas em *Ae. aegypti*, pois elas reduzem a suscetibilidade dos mosquitos a infecções virais, assim como diminuem a taxa de reprodução do vetor. Mosquitos OX513A geneticamente modificados também foram liberados, pois sua prole, a princípio, não deve sobreviver a partir do estágio larval. Contudo, há uma série de questões éticas envolvidas nesse processo. Alternativamente, muitos estudos vêm se dedicando à compreensão da interação vírus-vetor a nível molecular, na busca por identificar fatores essenciais para a replicação e a transmissão viral. Ainda assim, grande parte do conhecimento fisiológico-molecular a respeito de insetos disponível atualmente foi observado em espécies de *Drosophila*, que não são vetores arbovirais. Nesse sentido, o presente trabalho se propõe a estudar a influência da fosforilação diferencial de proteínas de células Aag-2 (de *Ae. aegypti*) ao longo da infecção pelos alfavírus MAYV e CHIKV. Esse conhecimento, em conjunto com resultados de diversos outros

estudos, poderão futuramente facilitar o desenvolvimento de novas formas de controle vetorial e/ou de transmissão viral. Identificar o padrão fosforilativo de células de *Ae. aegypti*, tanto não-infectadas quanto infectadas com alfavírus, se faz ainda mais relevante levando em consideração que alguns dos inseticidas atualmente disponíveis no mercado têm como alvos componentes de vias de transdução de sinal que envolvem eventos de fosforilação, como por exemplo a enzima acetilcolinesterase no sistema colinérgico.

### **3.3. Objetivo e metas**

#### **3.3.1. Objetivo**

O objetivo principal deste capítulo é identificar alvos e vias metabólicas envolvidos em processos fosforilativos e que sejam importantes para a interação vírus-vetor. A partir deles, auxiliar no desenvolvimento de técnicas para restringir a dispersão arboviral e seus efeitos prejudiciais para a população humana.

#### **3.3.2. Metas**

As metas para elucidar a modulação fosfoproteômica de cultura de células Aag-2 de *Aedes aegypti* ao longo das primeiras horas do processo de infecção pelos arbovírus CHIKV e MAYV são:

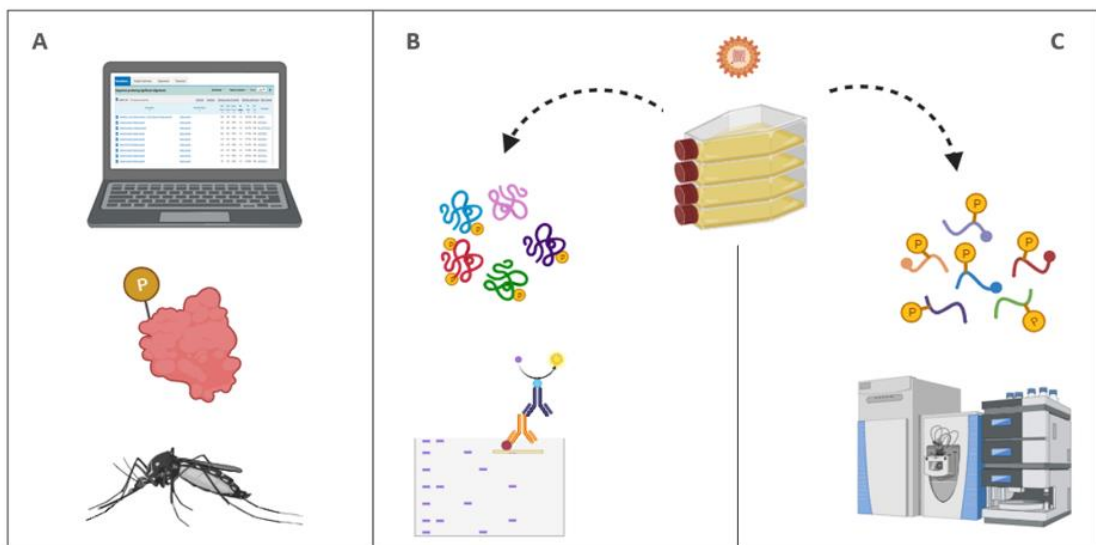
- Realizar a predição *in silico* de proteínas fosforiladas de *Ae. aegypti* por homologia com organismos modelo eucarióticos (**Figura 3.1, A**).

- Caracterizar a modulação fosfoproteômica de cultura de células Aag-2 de *Ae. aegypti* durante as primeiras 12 horas do processo de infecção por CHIKV e MAYV. Para tanto, são necessários(as):

- determinar os tempos de coleta que serão utilizados na análise fosfoproteômica, com MOI igual para cada vírus;

- verificar o padrão de fosforilação das proteínas de células Aag-2 infectadas com MAYV e CHIKV por *Western Blot*, por meio da detecção com anticorpos anti-fosfossítios (**Figura 3.1, B**);

- enriquecer fosfopeptídeos derivados das células Aag-2 infectadas com MAYV e CHIKV por cromatografia de afinidade com TiO<sub>2</sub> (**Figura 3.1, C**);
- analisar as amostras processadas dos fosfopeptídeos enriquecidos por LC-MS/MS;
- interpretar a modulação das proteínas fosforiladas/defosforiladas nas vias de transdução de sinal das células hospedeiras durante a infecção viral.



**Figura 3.1. Metas do estudo proposto no Capítulo 3.** **A:** predição *in silico* de proteínas fosforiladas de *Aedes aegypti*; **B:** *Western Blots* com anticorpos anti-fosfatos; **C:** análise fosfoproteômica de células Aag-2 infectadas com os alfavírus MAYV e CHIKV por espectrometria de massa. Imagem criada no BioRender.

### 3.4. Materiais e métodos

**3.4.1. Predição *in silico* de proteínas fosforiladas de *Aedes aegypti* por homologia com organismos modelo eucarióticos:** no banco de dados de proteínas UniProt (<https://www.uniprot.org/>), na opção *Advanced*, foram baixados os arquivos completos FASTA de proteínas de *Ae. aegypti* (*taxid* 7159, entrada UP000008820) e das proteínas anotadas como fosforiladas dos organismos: *Sacharomyces cereviseae* (*taxid* 559292, proteoma UP000002311), *Caenorhabditis elegans* (*taxid* 6239, proteoma UP000001940), *Drosophila melanogaster* (*taxid* 7227, proteoma UP000000803), *Mus musculus* (*taxid* 10090, proteoma UP000000589) e *Homo sapiens* (*taxid* 9606, proteoma



UP000005640). A seguir, no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), a ferramenta BLASTp (Sayers et al., 2022) foi utilizada para identificar proteínas de *Ae. aegypti* com homologia às proteínas fosforiladas dos organismos citados. Para a triagem manual dessas proteínas, foram utilizados simultaneamente os seguintes critérios de *cutoff*: mínimo de 50 % de cobertura, mínimo de 50 % de identidade, E-value o mais próximo de zero e existência de código UniProt para essa proteína. Posteriormente, uma tabela foi criada no Excel comparando os valores de cobertura, E-value e identidade das proteínas restantes de *Ae. aegypti* com as respectivas fosfoproteínas anotadas de *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* e *H. sapiens*. Todas as proteínas resultantes foram submetidas à plataforma NetPhos 3.1 (Blom et al., 2004) para predição de fosfossítios com *score* > 0.9. As plataformas STRING (Szklarczyk et al., 2015), BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016) PathView (Luo e Brouwer, 2013) e Cytoscape v3.9.1 (Shannon et al., 2003) foram utilizadas para a formação de clusters de interação proteína-proteína e enriquecimento de vias metabólicas a partir das fosfoproteínas preditas de *Ae. aegypti*.

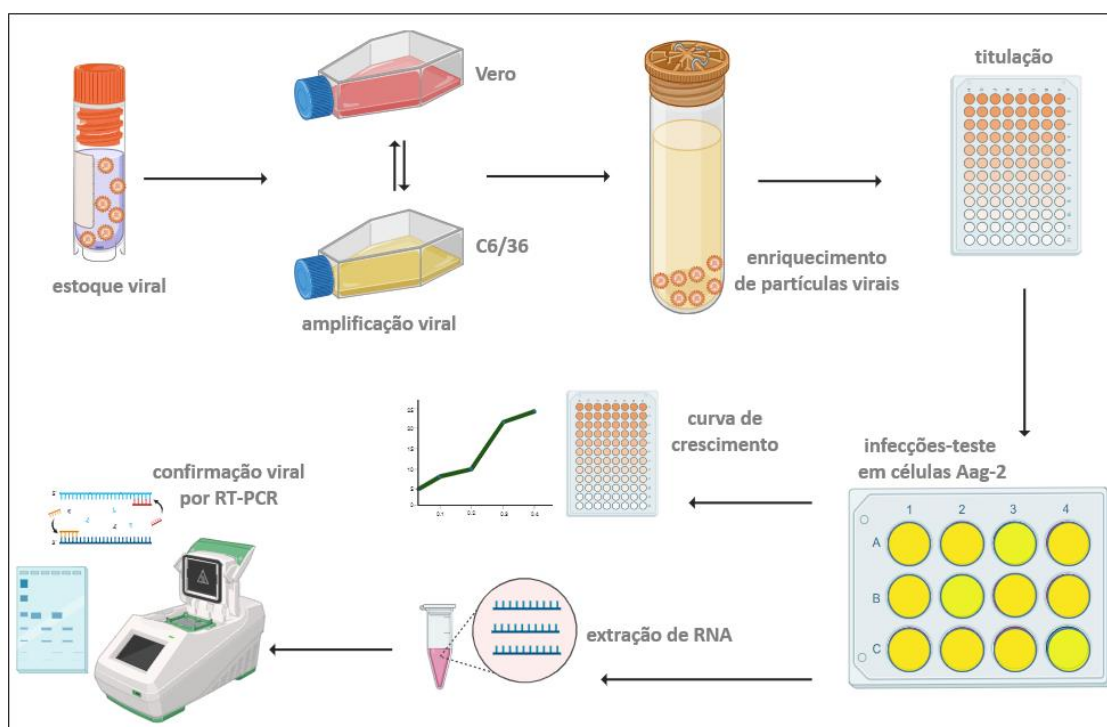
**3.4.2. Cultura celular:** as células Aag-2 (embrião de *Ae. aegypti*) foram mantidas em meio de cultura Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) e penicilina + estreptomicina 100 U/mL (PenStrep). Já a linhagem C6/36 (larva de *Ae. albopictus* com deficiência na maquinaria de iRNA) (Blair e Olson, 2015) foi cultivada em meio TC100 suplementado com 10 % (v/v) FBS (Vitrocell Embriolife). Ambas as células de mosquito foram cultivadas a 28 °C e foi utilizado o *cell scraper* para a passagem celular. A linhagem de células Vero (rim de macaco-verde africano) foi mantida em meio DMEM *High Glucose* (Sigma) suplementado com 10 % (v/v) FBS (Vitrocell Embriolife) e PenStrep 100 U/mL a 37 °C, com suprimento de CO<sub>2</sub> a 5 %.

**3.4.3. Vírus:** os isolados de CHIKV e MAYV (Peru, 1988) foram gentilmente cedidos pela Dr<sup>a</sup> Ana Bispo, chefe do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro. No nosso laboratório, também havíamos recebido do Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro uma outra amostra de MAYV (Brasil, 2015) há alguns anos, isolado esse que tinha sido utilizado em trabalhos anteriores. A amostra de CHIKV foi isolada em 2021, no Brasil, enquanto os dois isolados de MAYV foram utilizados em diferentes etapas do projeto. MAYV (Peru, 1988) foi utilizado na cinética de crescimento

e MAYV (Brasil, 2015) foi utilizado na infecção de células Aag-2, a partir da qual foram realizados *Western Blots* e o processamento para análise fosfoproteômica. Ambos os alfavírus, de forma separada, foram usados para infectar células Vero e C6/36, alternadamente e em ciclos consecutivos, para evitar que o vírus se adaptasse a determinada linhagem celular. Ao final da amplificação, um enriquecimento viral dos sobrenadantes infectados foi realizado por colchão de sacarose a 25 % (m/v) com 90 min de ultracentrifugação a 24.000 rpm a 8 °C. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão fosfato (PBS) ou meio TC 100 e armazenados a -80 °C. A partir dos estoques virais, foi realizada titulação por *EndPoint Dilution Assay* em placas terasaki, utilizando células Vero em meio DMEM suplementado com 10% FBS (v/v) (Vitrocell Embriolife), PenStrep 100 U/mL e 25 mM do tampão HEPES. Após três dias de infecção e observação de efeito citopático em microscopia óptica invertida, a titulação (TCID<sub>50</sub>/mL) de cada vírus foi calculada de acordo com o método de Reed e Munch (Rovozzo e Burke, 1973). A manipulação de células infectadas e não-infectadas foi realizada em laboratório de biossegurança nível 2 (NB-2).

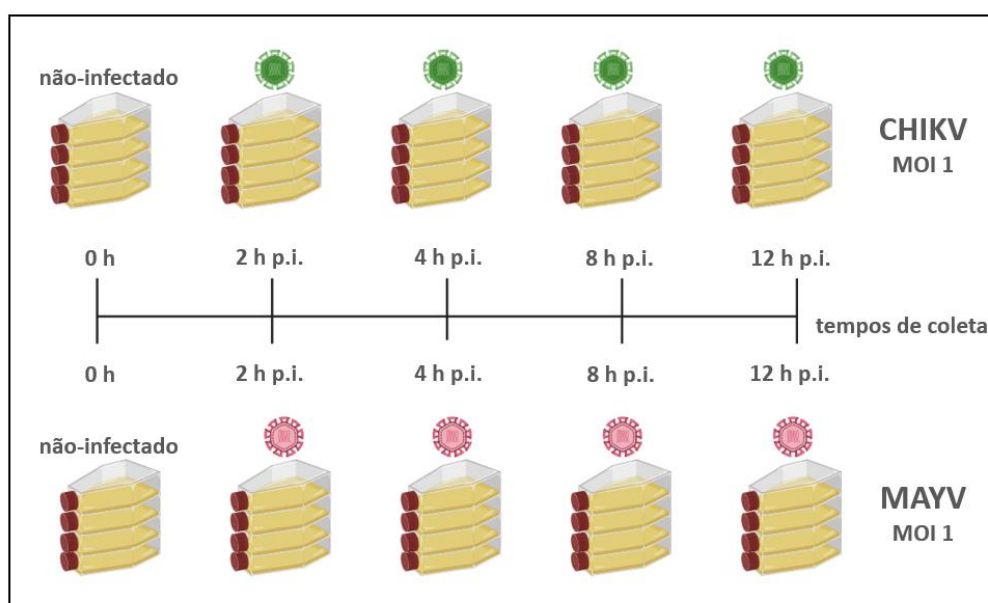
**3.4.4. Cinética de crescimento em células Aag-2:** a partir de estudos pregressos do nosso grupo (Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022), optou-se por manter o MOI 1 para MAYV e para CHIKV a fim de investigar as diferenças moleculares das células Aag-2 quanto à potencial virulência diferencial destes vírus. Uma curva de crescimento foi realizada em células Aag-2 infectadas com os vírus MAYV (Peru, 1988) e CHIKV, separadamente. Placas para cultivo de 12 poços foram utilizadas para o *seeding* de 10<sup>5</sup> células por poço, em 500 µl de meio Schneider's suplementado com 10% (v/v) FBS e PenStrep 100 U/mL. Foram selecionados sete pontos de coleta (0 h, 4 h p.i., 8 h p.i., 12 h p.i., 24 h p.i., 36 h p.i. e 48 h p.i.) do sobrenadante das células infectadas e também das células que receberam apenas PBS (*mock-infected*). Nos tempos determinados: algumas fotos foram tiradas das células no microscópio óptico invertido com aumento 10 X; o meio de cultura foi coletado; as células foram suspensas em 500 µl de TRIzol (Invitrogen™). Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C. Os sobrenadantes foram titulados por *EndPoint Dilution Assay* em duplicata técnica e o TCID<sub>50</sub>/mL foi calculado (Rovozzo e Burke, 1973). O RNA genômico do MAYV (Peru, 1988) já havia sido confirmado no Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro por PCR em tempo real quantitativa anteriormente ao seu envio para a UnB. Em nosso laboratório, os oligonucleotídeos que vinham sendo utilizados para amplificar isolados brasileiros de

MAYV não amplificaram a sequência de 1988 do Peru. Para evitar dúvidas futuras, optou-se por recuperar o MAYV (Brasil, 2015) e utilizá-lo para a infecção das células Aag-2, a partir da qual seriam realizados os *Western Blots* e a análise fosfoproteômica. Assim, o RNA genômico do MAYV (Brasil, 2015) foi confirmado a partir do estoque viral. Já a confirmação da infecção por CHIKV se deu a partir das células utilizadas na cinética de crescimento. As células Aag-2 foram ressuspensas em TRIzol (Invitrogen™) e submetidas à extração de RNA, de acordo com as recomendações do fabricante. Para ambos os vírus, os RNAs foram utilizados em uma reação em cadeia da polimerase com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR) (Promega) com oligonucleotídeos randômicos. O cDNA resultante foi utilizado em uma PCR com oligonucleotídeos degenerados específicos para a região do envelope viral E3-E2 de cada vírus, gerando um *amplicon* de 1,5kb. Sequência 5'-3' dos oligonucleotídeos para MAYV: sentido 5'- GCR GCY YCG ACA GTG ACA GCY AT-3' com  $T_m = 69^\circ\text{C}$  e antisenso 5'-TGC ATG YGC TTT CGG TGC RC-3' com  $T_m = 65^\circ\text{C}$ . Sequência 5'-3' dos oligonucleotídeos para CHIKV: sentido 5'-CGA AGA GTG GAG TCT KGC CAT YCC AG-3' com  $T_m = 65^\circ\text{C}$  e antisenso 5'-GCC TCY TGG TAT GTG GCC GCT TTA GC-3' com  $T_m = 67^\circ\text{C}$ . Um esquema da metodologia utilizada do tópico 3.4.2 ao tópico 3.3.4 pode ser observada na **Figura 3.2**.



**Figura 3.2.** Preparo do material biológico e estabelecimento das condições que foram utilizadas na infecção de células Aag-2 para fosfoproteômica. Imagem criada no BioRender.

**3.4.5. Infecção das células Aag-2, coleta e extração das proteínas:** aproximadamente  $2 \times 10^6$  células Aag-2 foram infectadas com MAYV (Brasil, 2015) e com CHIKV com MOI 1 e coletadas nos tempos  $t = 0$  h (não-infectado), 2 h, 4 h, 8 h e 12 h (**Figura 3.3**). Todos os tempos de coleta foram realizados em quadruplicatas biológicas, resultando assim em 40 amostras. As amostras foram lavadas 2 vezes em PBS e lisadas com 350  $\mu$ l de tampão ureia 7M e tiourea 3M com o inibidor de protease e fosfatase MS SAFE (Sigma-Aldrich). Após quatro ciclos de sonicação (10 seg de lise a 40 % de potência, com intervalos de 50 seg de repouso) no gelo, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 20 min a 4 °C, resgatando-se apenas as proteínas do sobrenadante. Após quantificação das proteínas por Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) com o *kit* Qubit® Protein Assay, 100  $\mu$ g de cada extrato total de proteínas foi aliquoteado para ensaios de *Western Blot* e a quantidade restante foi submetida à digestão trípica.



**Figura 3.3.** Desenho experimental das infecções de células Aag-2 de *Aedes aegypti* com MAYV e CHIKV em quadruplicatas biológicas, com seus pontos de coleta em horas pós-infecção. Imagem criada no BioRender.

**3.4.6. Imunodeteção das proteínas fosforiladas por *Western Blot*:** um total de 10  $\mu$ g de cada uma das 40 amostras de células Aag-2 infectadas (20 com MAYV (Brasil, 2015) e 20 com CHIKV, nos tempos  $t = 0$  h – não infectado, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i.) foram carregados em gel SDS-PAGE desnaturante (gel concentrador a 4 % e gel separador a 12 % de acrilamida) com o marcador de proteínas Precision Plus Protein™

Standards Dual Color (BIO-RAD), as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose Protran™ Premium 0.45 µm NC (Amersham™) durante 1 h e 20 min a 100 V. Cada membrana foi corada com Ponceau para conferir a eficiência da transferência e, consecutivamente, bloqueada em TBS com 1 % (volume/volume) de Tween 20 (TBS-T) e 5 % (volume/peso) de leite em pó desnatado durante 90 min com agitação. Os anticorpos primários foram diluídos em TBS-T com 3 % de leite em pó desnatado e ficaram em contato com as membranas por 1 h com agitação. Além do anticorpo anti- $\alpha$  tubulina TAT1 (diluição 1:100) desenvolvido por Woods e colaboradores (1989), também foram utilizados os anticorpos primários anti-fosfoserina (P5747 Sigma-Aldrich, diluição 1:500), anti-fosfotreonina (P6623 Sigma-Aldrich, diluição 1:500) e anti-fosfotirosina (4G10® Merck, diluição 1:500 em amostras de CHIKV e 1:1.000 em amostras de MAYV) para observação do padrão de fosforilação das proteínas de células Aag-2 infectadas com alfavírus. Após 3 lavagens de 5 min em TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário *horseradish peroxidase goat anti-mouse* (HRP-GAM) (31430 Invitrogen, diluição 1:5.000) em TBS-T com 3 % de leite em pó desnatado por 1 h. Após 7 etapas de lavagem por 3 min cada em TBS-T, as membranas foram reveladas com o kit ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents (Amersham™) nos equipamentos L-PIX CHEMI (Loccus) ou Fusion Solo 6x Basic (Vilber).

**3.4.7. Preparo das amostras para espectrometria de massas:** as proteínas totais recuperadas de cada uma das 40 amostras foram diluídas 10 vezes em TEAB 25 mM para que a elevada concentração de ureia no tampão de lise não afetasse o funcionamento da tripsina posteriormente. Até a espectrometria de massas, todos os reagentes devem ter grau de pureza LC e serem diluídos, quando necessário, em água Milli-Q. Após redução em DTT 5 mM durante 25 min a 55 °C, as amostras foram alquiladas com iodoacetamida (IAA) 14 mM durante 40 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após uma nova adição de DTT 5 mM, as proteínas foram digeridas com *Sequencing Grade Modified Trypsin* (Promega) na proporção de 1 µg de tripsina a cada 50 µg de substrato durante 18 h a 37 °C. A reação de digestão foi parada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%.

**3.4.8. Dessalinização:** os peptídeos tripticos resultantes passaram por uma etapa de dessalinização em colunas Sep-PAK® Classic C 18 Cartridges (Waters) acopladas a seringas de 10 ml. Foram então passadas pela coluna as seguintes soluções, esperando-

se uma atravessar completamente a coluna para adição da solução seguinte:

- 5 ml de acetonitrila (ACN) 100 %
- 1 ml, 3 ml e 5 ml de Solvente A (TFA 0,1 %);
- amostra peptídica, que foi passada pela coluna 5 vezes;
- 5 ml e 3 ml de Solvente A (TFA 0,1 %);
- 2 ml de *Wash Buffer* (TFA 0,1 % e ACN 5 %);
- 1 ml de Solvente B (TFA 0,1 % e ACN 25 %);
- 2ml e 2ml de Solvente C (TFA 0,1 % e ACN 50 %);
- 2ml e 2ml de Solvente D (TFA 0,1 % e ACN 75 %);
- 1 ml de Solvente E (TFA 0,1 % e ACN 95 %).

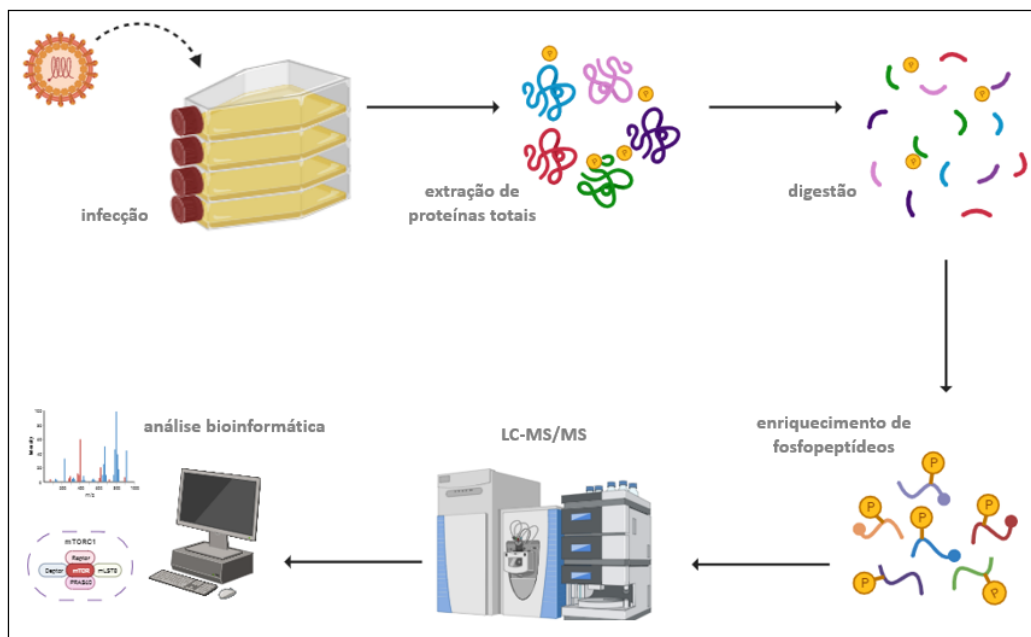
Os peptídeos eluídos (do Solvente B até o Solvente E) de cada amostra foram então liofilizados e ressuspensos em TEAB 25 mM para quantificação com o *kit* Qubit® Protein Assay. Após quantificação, os peptídeos foram liofilizados e submetidos ao enriquecimento em coluna de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>).

**3.4.9. Enriquecimento de fosfopeptídeos:** os fosfopeptídeos derivados das células Aag- 2 infectadas com MAYV e com CHIKV foram enriquecidos com uso do *kit* High-Select™ TiO<sub>2</sub> Phosphopeptide Enrichment Kit (A32993, Thermo Fisher Scientific). O mecanismo se baseia na cromatografia por afinidade dos grupamentos fosfato a óxido metálico e a metodologia a seguir foi adaptada a partir das recomendações do fabricante. As colunas foram inseridas em microtubos Lo-Binding 2ml (Eppendorf™) e preparadas com 40 µl de *Wash Buffer*, seguido por 40 µl de *Binding/Equilibration Buffer*. Após descarte do *flow-through*, foram adicionados os peptídeos previamente liofilizados, que foram ressuspensos em 300 µl de *Binding/Equilibration Buffer* durante 30 min em agitação. As amostras foram replicadas para maior ligação de peptídeos ao dióxido de titânio. Para lavagem, foram utilizadas duas etapas repetidas de adição de 40 µl de *Binding/Equilibration Buffer* seguidos por 40 µl de *Wash Buffer*. Antes de eluir, foi realizada uma última lavagem com 40 µl de água Milli-Q. Para eluição dos fosfopeptídeos que interagem com a coluna, foram adicionados 50 µl de *Phosphopeptide Elution Buffer*, que foram passados pela coluna 2 vezes para maior rendimento. Imediatamente depois, as amostras foram secas em *speed vac* e ressuspensas em 30 µl de ácido fórmico 0,1 %, pois o pH do tampão de eluição não é favorável à integridade das fosforilações. Após quantificação com o *kit* Qubit® Protein Assay, alíquotas de 2 µg de fosfopeptídeos enriquecidos de cada amostra foram feitas, secas em *speed vac* e

armazenadas a -80 °C para espectrometria de massas.

#### **3.4.10. Etapas futuras: espectrometria de massas e análise de bioinformática:**

um total de 2 µg de peptídeos totais e 1 µg de fosfopeptídeos enriquecidos por tempo e por réplica serão utilizados para análise por espectrometria de massas *label-free*. O sistema de cromatografia líquida Vanquish Neo UPLC (Thermo Fisher Scientific), com uma coluna do tipo *trap* de C18 e uma coluna C18 analítica. Os peptídeos serão eluídos diretamente para o espectrômetro de massas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific) por meio de ionização *eleto spray*. Os espectros serão adquiridos pelo modo *Data- Dependent Aquisition* (DDA) e os íons precursores mais abundantes serão fragmentados por dissociação por colisão de alta energia (*high energy collision dissociation*, HCD). Os fragmentos originados serão detectados em Orbitrap. Na análise bioinformática, alguns parâmetros serão estabelecidos: **(i)** tolerância de massa de peptídeo de 10 ppm, **(ii)** erro máximo de fragmentação MS de 0,05 Da e **(iii)** duas clivagens perdidas permitidas. Como modificação fixa será utilizada a carbamidometilação de cisteínas (+57,02). Como modificações variáveis serão fixadas: **(i)** acetilação N-terminal (+42,01), **(ii)** oxidação de resíduos de metionina (+15,99) e **(iii)** fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina (+79,96). A taxa de falso descobrimento será de até 1%. O *software* MaxQuant v2.1.4.0 (Cox e Mann, 2008) será utilizado para quantificação e identificação de peptídeos e proteínas, o ptmRS (Taus et al., 2011) para prever probabilisticamente os sítios de modificação pós-traducional, e o Perseus (Tyanova et al., 2016) será utilizado nas análises estatísticas. As plataformas Momo (Cheng et al., 2018), STRING (Szklarczyk et al., 2015), BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016), PathView (Luo e Brouwer, 2013) e Cytoscape v3.9.1 (Shannon et al., 2003) serão utilizadas para analisar os sítios de fosforilação, formar clusters de interação proteína-proteína e enriquecer vias metabólicas a partir das proteínas de *Ae. aegypti*. Uma simplificação da metodologia utilizada nos tópicos 3.4.5 e de 3.4.7 a 3.4.10 pode ser observada na **Figura 3.4**.



**Figura 3.4.** Pontos principais da metodologia para o estudo do fosfoproteoma de células Aag-2 infectadas com MAYV e CHIKV, após a obtenção das amostras biológicas. Imagem criada no BioRender.

## 3.5. Resultados

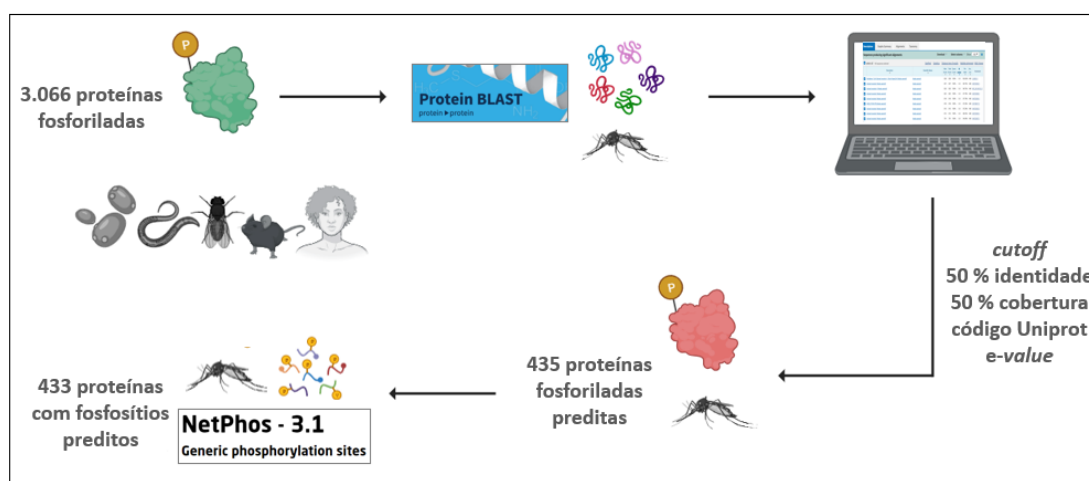
### 3.5.1. Predição *in silico* de proteínas fosforiladas de *Aedes aegypti* por homologia com organismos modelo eucarióticos

Inicialmente foi feita uma pesquisa por proteínas de *Ae. aegypti* anotadas como fosforiladas, contudo, obtivemos apenas três proteínas anotadas como resultado. Devido à escassez de dados fosfoproteômicos a respeito desse vetor, optou-se por uma predição *in silico* exploratória de proteínas potencialmente fosforiladas feita por homologia com proteínas fosforiladas anotadas dos organismos eucarióticos de referência *Sacharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*.

Ao total, foram listadas 117 proteínas fosforiladas de *S. cerevisiae*, 43 de *C. elegans*, 65 de *D.melanogaster*, 1.360 de *M. musculus* e 1.481 de *H. sapiens*. Essas 3.066 proteínas foram submetidas à ferramenta BlastP (*Basic Local Alignment Search* - NCBI) contra o proteoma de *Ae. aegypti*. Um total de 1.046 proteínas passaram pelos critérios de *cutoff* (cobertura mínima de 50 %, identidade mínima de 50 %, *E-value* mais próximo



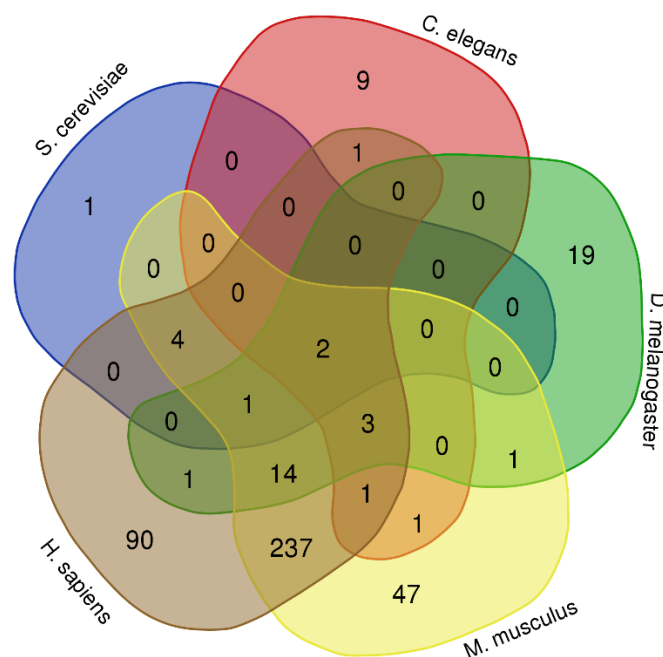
de zero e existência de código UniProt). Após excluir as redundâncias, as 435 proteínas resultantes, homólogas entre *Ae. aegypti* e ao menos um dos cinco organismos considerados, foram submetidas à predição de possíveis sítios de fosforilação na plataforma NetPhos 3.1 considerando o *score* > 0,9 (**Figura 3.5**). As 433 proteínas então resultantes foram reunidas na **Tabela suplementar S1**.



**Figura 3.5.** Metodologia e resultados da predição *in silico* de proteínas fosforiladas de *Aedes aegypti* a partir de cinco organismos modelo.

Um diagrama de Venn (**Figura 3.6**) foi construído a partir das 433 proteínas resultantes de forma a elucidar a contribuição de cada um dos organismos modelo no resultado encontrado. Para fornecer uma perspectiva geral foram selecionadas as proteínas de *Ae. aegypti* que apresentaram os critérios mínimos de homologia estabelecidos com proteínas de pelo menos três dos cinco organismos utilizados na comparação, resultando nas 27 proteínas listadas na **Tabela 1**.

A partir da lista de 433 proteínas homólogas de *Ae. aegypti*, foi realizada uma busca quanto a funções metabólicas nas plataformas BlastKOALA e PathView, por homologia com organismos eucarióticos. Como pode-se observar nos resultados do BlastKOALA (**Tabela suplementar S2**) há proteínas que estão classificadas em processos como vias de metabolismo (01100, com 39 proteínas), autofagia (04140, com 21 proteínas), proteólise mediada por ubiquitina (04120, com 13 proteínas) e as vias de sinalização MAPK (04010, com 27 proteínas), AMPK (04152, com 19 proteínas), Ras (04014, com 18 proteínas), mTOR (04150, com 18 proteínas) e JAK-STAT (04630, com 6 proteínas).



**Figura 3.6.** Diagrama de Venn com as 433 fosfoproteínas anotadas dos cinco organismos modelo que têm > 50% de cobertura e > 50% de identidade com as fosfoproteínas preditas de *Aedes aegypti*. Imagem gerada na plataforma Bioinformatics and Evolutionary Genomics (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

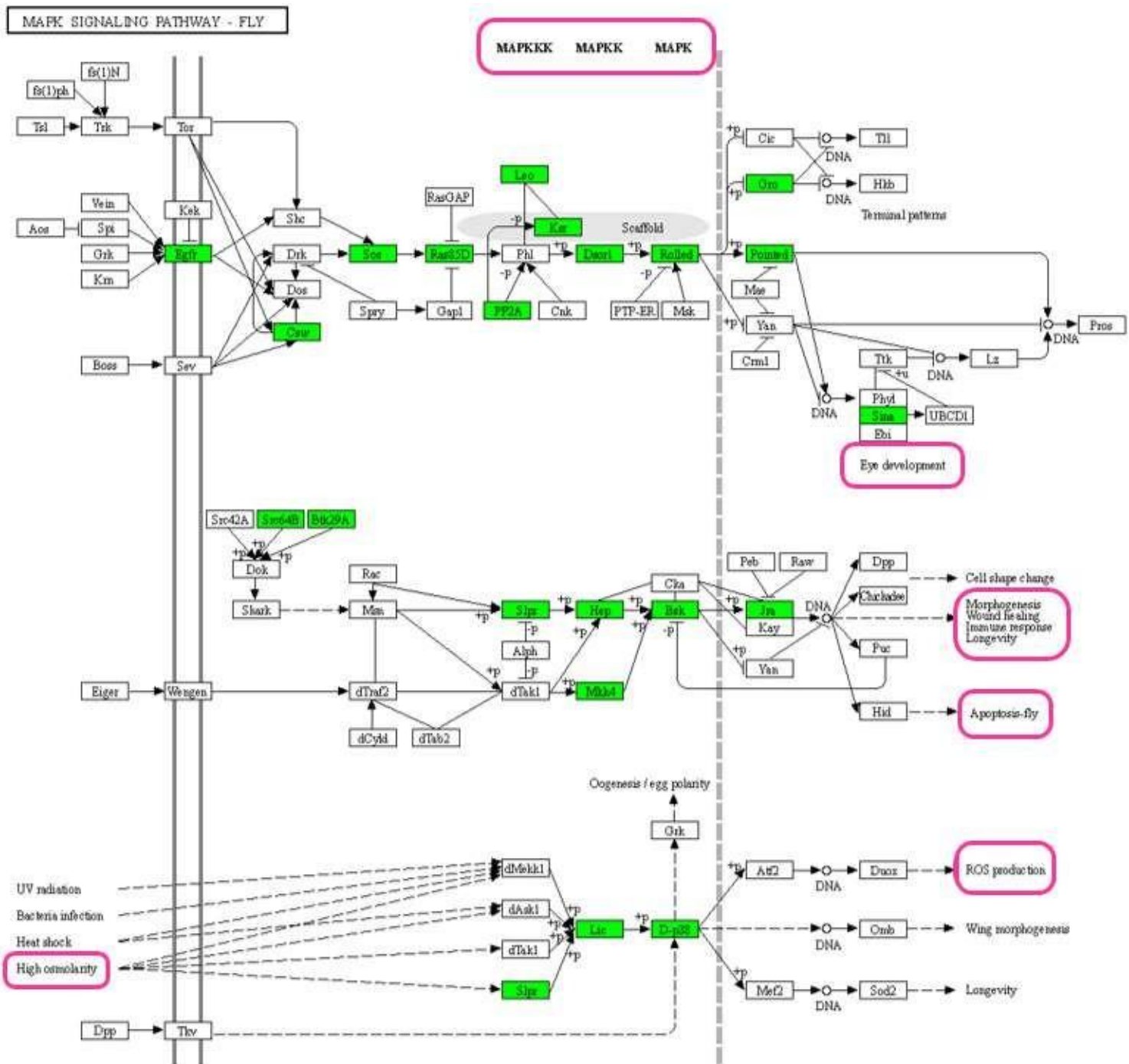
Em consonância com o BlastKOALA e dentro das limitações de enriquecimento do PathView, duas vias foram enriquecidas: a via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (dme04013) (**Figura 3.7**) e autofagia (map04140) (**Figura 3.8**). A complexa via de autofagia sofre influência de componentes das vias de sinalização AMPK (*AMP-activated protein kinase*), MAPK e mTOR (*target of rapamycin*). Na **Figura 3.7**, vemos que a via MAPK sofre influência de radiação e altas osmolaridades, enquanto influencia processos como apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio e morfogênese.

Com o uso das plataformas STRING e Cytoscape, que analisam interações proteína- proteína (IPPs), fez-se *upload* das 433 proteínas de *Ae. aegypti*. Os filtros *score* maior ou igual a 0,7 e apenas interações com evidência experimental foram aplicados, resultando em 150 nós (que correspondem às proteínas) e 187 arestas (que correspondem às IPPs) (**Figura 3.9**). Essas proteínas foram classificadas em cores de acordo com o processo biológico, o componente celular, a função molecular ou a via metabólica anotados. O grau de interação de cada proteína também está designado, quanto maior o número de interactantes que ela possui, maior o círculo utilizado na sua representação.

**Tabela 1. Proteínas de *Ae. aegypti* que apresentaram homologia com proteínas fosforiladas de pelo menos três dos cinco organismos estudados. Proteínas fosforiladas de *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* e *H. sapiens* foram submetidas à ferramenta blastp contra o proteoma de *Ae. aegypti*. As 27 proteínas de *Ae. aegypti* que passaram pelos critérios de cutoff e apresentaram homologia com proteínas de pelo menos três organismos estão listadas com seus valores de cobertura, E-value e identidade.**

ID das proteínas homólogas de <i>Ae. aegypti</i>	Descrição da proteína	<i>S. cerevisiae</i>			<i>C. elegans</i>			<i>D. melanogaster</i>			<i>M. musculus</i>			<i>H. sapiens</i>		
		cobertura	E-value	identidade	cobertura	E-value	identidade	cobertura	E-value	identidade	cobertura	E-value	identidade	cobertura	E-value	identidade
Q173V2	histone H2A [Aedes aegypti]	75%	2E-46	83%	78%	7E-49	93%	87%	1E-74	100%	76%	9E-63	93%	69%	8E-64	94%
J9HHP4	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 [Aedes aegypti]	83%	0.0	52%	85%	0.0	69%	80%	0	90%	77%	0.0	76%	77%	0.0	76%
Q17DG0	glycogen [starch] synthase [Aedes aegypti]	88%	0.0	54%	-	-	-	-	-	-	84%	0.0	62%	83%	0.0	60%
A0A6I8TCV3	flap endonuclease 1 [Aedes aegypti]	-	-	-	90%	1E-155	65%	100%	0	74%	91%	1E-151	66%	93%	3E-171	65%
Q16IG9	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 [Aedes aegypti]	93%	4E-93	55%	-	-	-	81%	2E-144	77%	88%	2E-119	68%	92%	7E-126	68%
Q16Y76	cyclin-dependent kinase 5 homolog [Aedes aegypti]	96%	4E-114	57%	-	-	-	-	-	-	98%	0.0	84%	98%	0.0	84%
A0A0P6IXU9	mitogen-activated protein kinase 1 isoform X1 [Aedes aegypti]	98%	1E-117	50%	-	-	-	-	-	-	95%	0.0	87%	90%	0.0	85%
Q17EW3	eukaryotic translation initiation factor 6 [Aedes aegypti]	100%	4E-129	69%	-	-	-	-	-	-	100%	2E-136	73%	100%	4E-141	76%
Q16UJ8	aurora kinase C [Aedes aegypti]	-	-	-	84%	3E-101	54%	-	-	-	76%	4E-113	57%	77%	4E-104	57%
Q16N56	histone H3 [Aedes aegypti]	-	-	-	100%	6E-94	97%	100%	9E-97	100%	100%	1E-95	99%	100%	1E-95	99%
Q0IFN2	elongation factor 2 isoform X1 [Aedes aegypti]	-	-	-	100%	0.0	81%	100%	0	92%	100%	0.0	78%	100%	0.0	78%
Q177E2	histone H3.3 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	-	-	100%	2E-96	100%	100%	2E-96	100%	86%	6E-68	83%
Q0IEA3	DNA topoisomerase 2 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	-	-	89%	0	72%	75%	0.0	65%	75%	0.0	64%
Q17GS9	armadillo segment polarity protein isoform X1 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	-	-	99%	0	84%	98%	0.0	67%	98%	0.0	67%

ID das proteínas homólogas de <i>Ae. aegypti</i>	Descrição da proteína	<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. elegans</i>		<i>D. melanogaster</i>		<i>M. musculus</i>		<i>H. sapiens</i>	
		cobertura	E-value	cobertura	E-value	cobertura	E-value	cobertura	E-value	cobertura	E-value
Q16XC3	myosin regulatory light chain sqh isoform X1 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	100%	2E-104	92%	2E-95	92%	2E-95
A0A6R5I3N1	protein mothers against dpp isoform X1 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	100%	0	98%	0.0	98%	0.0
Q1L0R1	mitogen-activated protein kinase 14B isoform X1 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	98%	4E-128	95%	0.0	95%	0.0
Q16IE4	histone H4 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	79%	1E-53	79%	1E-53	79%	1E-53
Q16L96	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase dSOR1 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	100%	0	86%	7E-170	86%	9E-171
Q16U21	MOB kinase activator-like 1 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	99%	5E-149	99%	1E-143	99%	7E-144
Q16IV6	transcription elongation factor SPT5 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	87%	0	88%	0.0	88%	0.0
A0A6I8U8Q1	protein draper isoform X3 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	96%	0	-	-	-	-
Q17NG8	glycogen phosphorylase [Aedes aegypti]	-	-	-	-	100%	0	97%	0.0	98%	0.0
A0A6I8TPJ5	protein sarah isoform X2 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	78%	4E-107	-	-	-	-
Q17MM5	probable elongation factor 1-beta [Aedes aegypti]	-	-	-	-	100%	1E-97	100%	4E-62	100%	4E-72
Q0C741	40S ribosomal protein S6 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	86%	7E-123	79%	3E-111	79%	3E-111
Q17AP0	glycogen synthase kinase-3 beta isoform X2 [Aedes aegypti]	-	-	-	-	66%	0	71%	0.0	72%	0.0



**Figura 3.7.** Via de sinalização MAPK (em moscas) enriquecida por homologia a partir das fosfoproteínas preditas de *Aedes aegypti* por meio do PathView. Os retângulos verdes representam as proteínas enriquecidas e classificadas dentro da cascata de sinalização MAPK. É possível observar os níveis da cascata (MAPK, MAPKK e MAPKKK), bem como os processos biológicos em que essas proteínas estão envolvidas. São esses processos apoptose, resposta imune, desenvolvimento dos olhos, regulação osmótica e produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), circulado em rosa.

AUTOPHAGY - ANIMAL

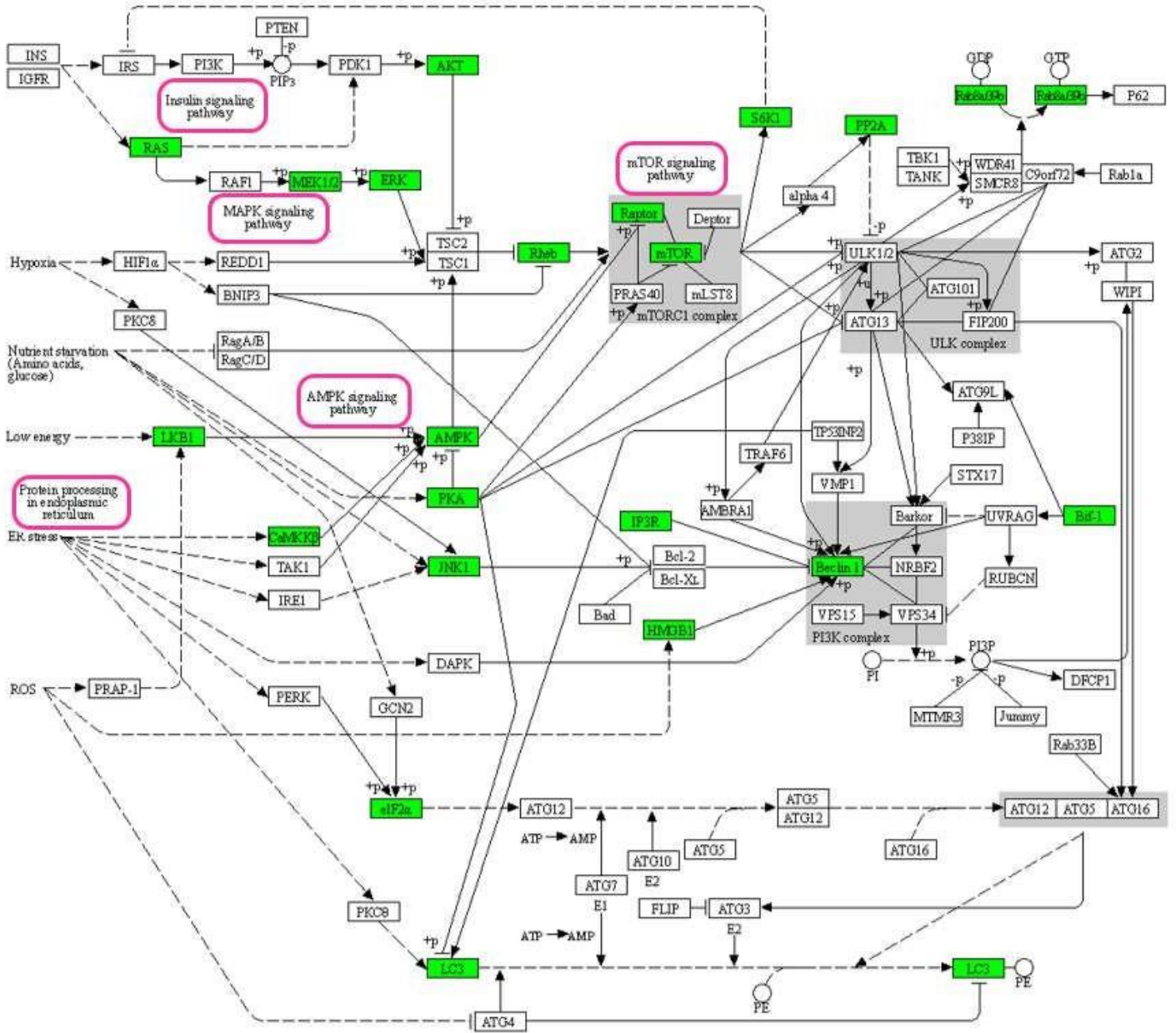
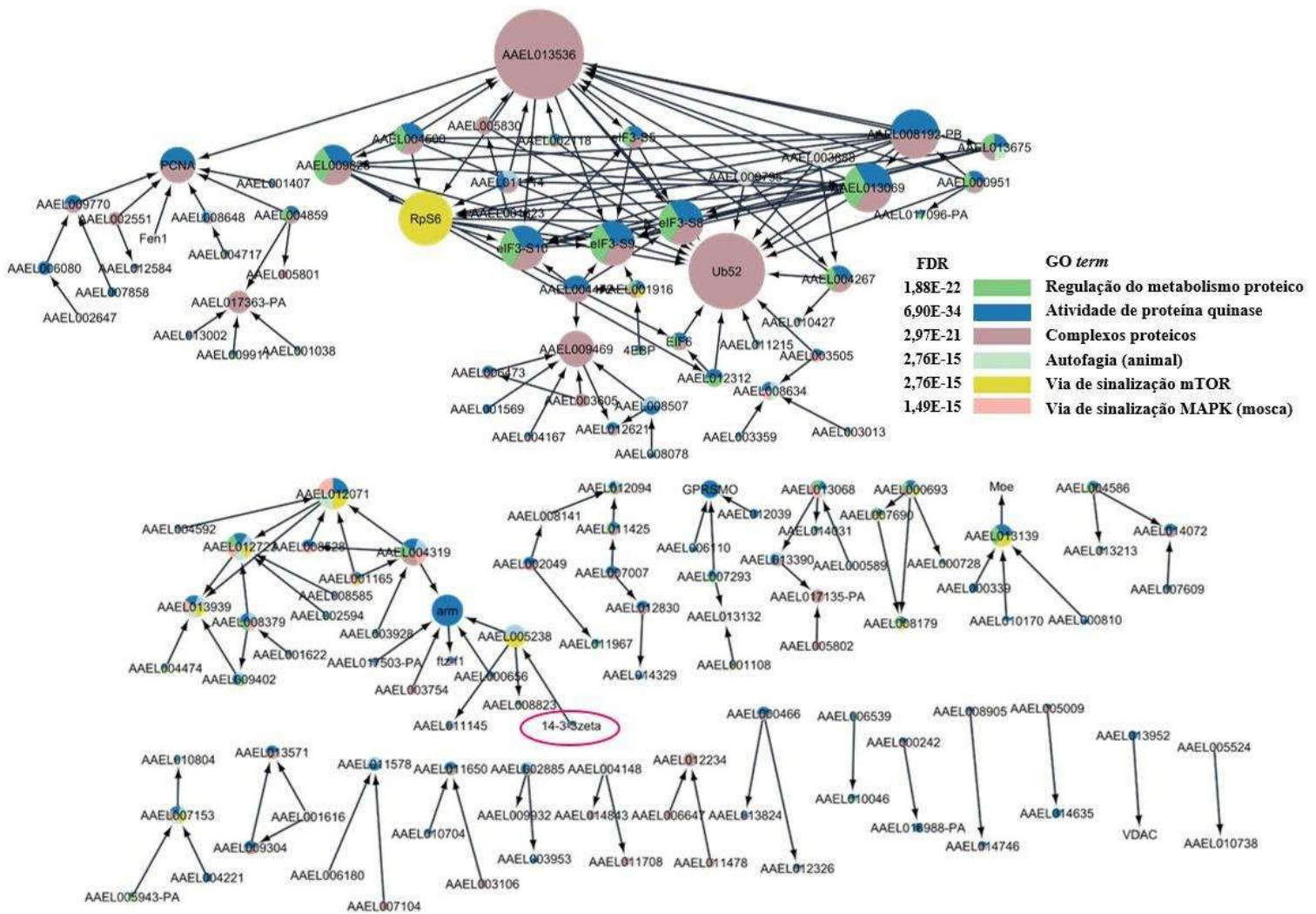


Figura 3.8. Via de sinalização da autofagia (em animais) enriquecida por homologia a partir das fosfoproteínas preditas de *Aedes aegypti* por meio do PathView. Os retângulos verdes representam as proteínas enriquecidas e classificadas dentro da cascata de sinalização autofágica. Observa-se a interseção de componentes dessa via com proteínas de vias como MAPK, AMPK (AMP-activated protein kinase), mTOR (mammalian target of rapamycin) e a via de sinalização de insulina (circulado em rosa). As proteínas sinalizadas também estão envolvidas no processamento proteico no retículo endoplasmático.



**Figura 3.9.** Mapa de IPPs das proteínas de *Aedes aegypti* fosforiladas previstas por homologia. Das 433 proteínas previstas, apenas 150 apresentaram interação dentro dos critérios estabelecidos de *score* mínimo 0,7 e utilizando apenas evidências experimentais. Quanto mais interactantes uma proteína possuir, maior será o seu grau de interação, portanto, maior o círculo da sua representação. A legenda de cores mostra a quais processos biológicos essas proteínas pertencem. Quanto mais próxima de zero a taxa de descobrimento falso (FDR), maior a confiabilidade da classificação. A fosfoproteína prevista 14-3-3 ζ (zeta), circulada em rosa escuro, já foi caracterizada experimentalmente com três fosfossítios em mosquitos *Aedes aegypti* em 2016 por Trujillo-Ocampo e colaboradores.

Nessa análise de IPPs entre as fosfoproteínas de *Ae. aegypti* previstas (**Figura 3.9**), podemos identificar a proteína 14-3-3 ζ (zeta), que já foi estudada experimentalmente em detalhes por Trujillo-Ocampo e colegas (2016). A família de proteínas 14-3-3 é presente em todos os seres eucarióticos e abriga proteínas adaptadoras que se ligam a resíduos fosforilados de serina e treonina em mais de 200 proteínas parceiras, em diferentes organismos (Aitken, 2011; Trujillo-Ocampo et al., 2016). Essas proteínas são ativadas apenas quando formam homo ou heterodímeros e mediam processos de sinalização que envolvem imunidade, diferenciação celular, tráfego de proteínas, resposta ao estresse e apoptose, entre outros (Fu et al., 2000; Rubio et al., 2004). Das suas sete isoformas já caracterizadas, apenas a 14-3-3ε (épsilon) e a 14-3-3 ζ já foram encontradas nos insetos,

e ambas possuem todas as características das proteínas dessa família. São elas: duas assinaturas proteicas (PS1 e PS2), nove segmentos formadores de alfa-hélice, um domínio anexina e possíveis fosfossítios. No caso da 14-3-3  $\zeta$  de *Ae. aegypti*, os resíduos de aminoácidos que podem receber fosforilações são os de número 58, 184 e 233 (Trujillo-Ocampo et al., 2016).

Ainda na **Figura 3.9**, as proteínas que apresentaram o maior número de interactantes foram as seguintes:

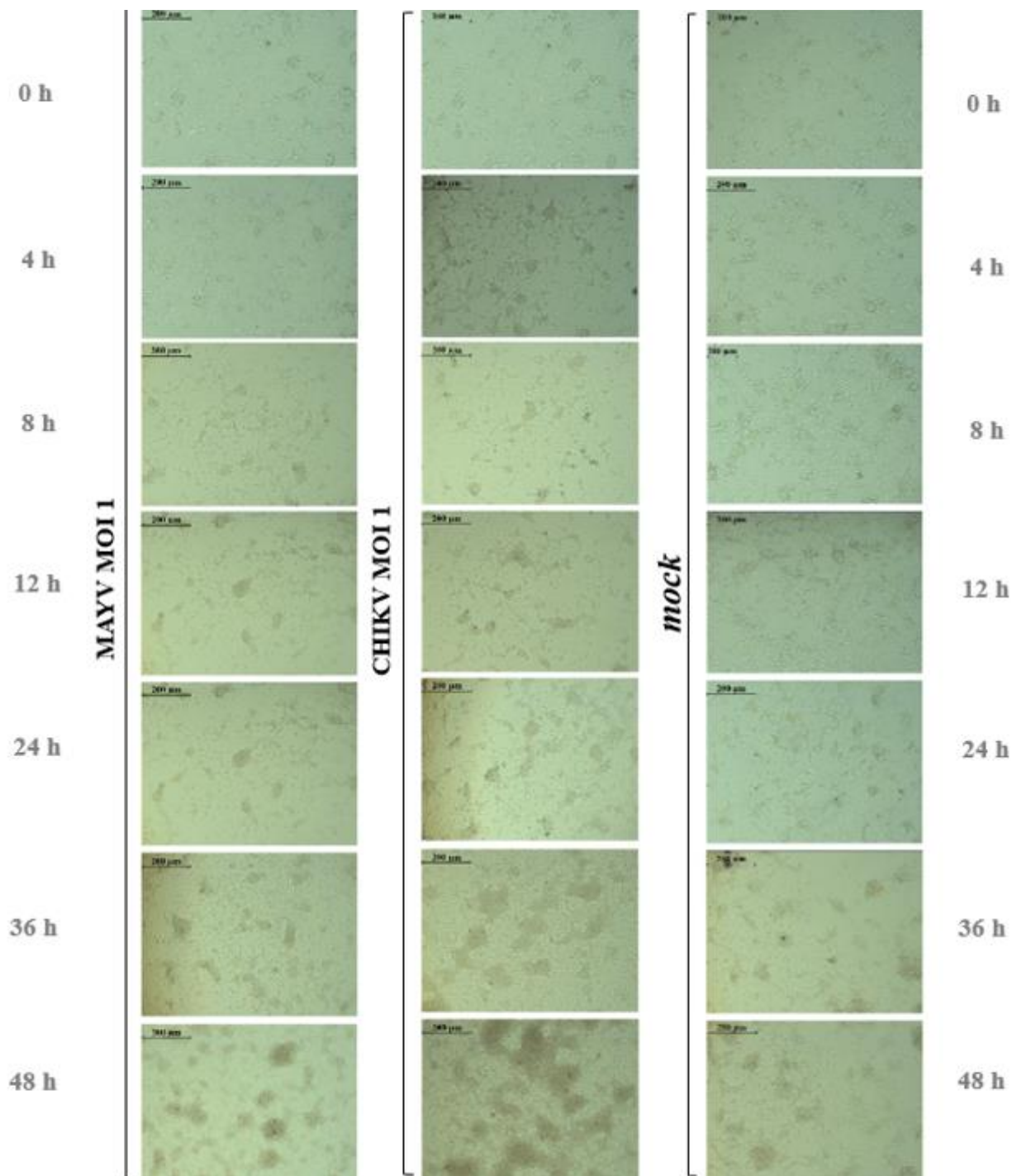
- AAEL013536 (Q16IV1, ubiquitina-40s proteína ribossomal S27a);
- Ub52 (Q7KF35, ubiquitina-60S proteína ribossomal L40);
- RpS6 (Q0C741, proteína 40S ribossomal S6);
- AAEL013069 (Q1HRQ2, subunidade beta-like da proteína de ligação a guanina);
- AAEL008192 (Q4F6X0, proteína 40S ribossomal S3);
- Fatores eucarióticos 3 de iniciação da tradução eIF3-S8 (Q17Q06, subunidade C), eIF3-S9 (Q0IEY3, subunidade B) e eIF3-S10 (Q173M7, subunidade A);
- AAEL009825 (Q16US7, proteína 60S ribossomal L13a);
- PCNA (Q4PKD7, antígeno nuclear de proliferação celular);
- AAEL012071 (Q16N58, GTPase HRas).

A mesma lista de proteínas preditas foi submetida ao processo de clusterização por *Markov cluster algorithm* (MCL) no Cytoscape e todos os 11 *clusters* com número de nós maior ou igual a quatro foram reunidos na **Figura suplementar S1**, com representação de função por cores e valores de FDR individuais.

### 3.5.2. Cinética de crescimento de MAYV e CHIKV em células Aag-2

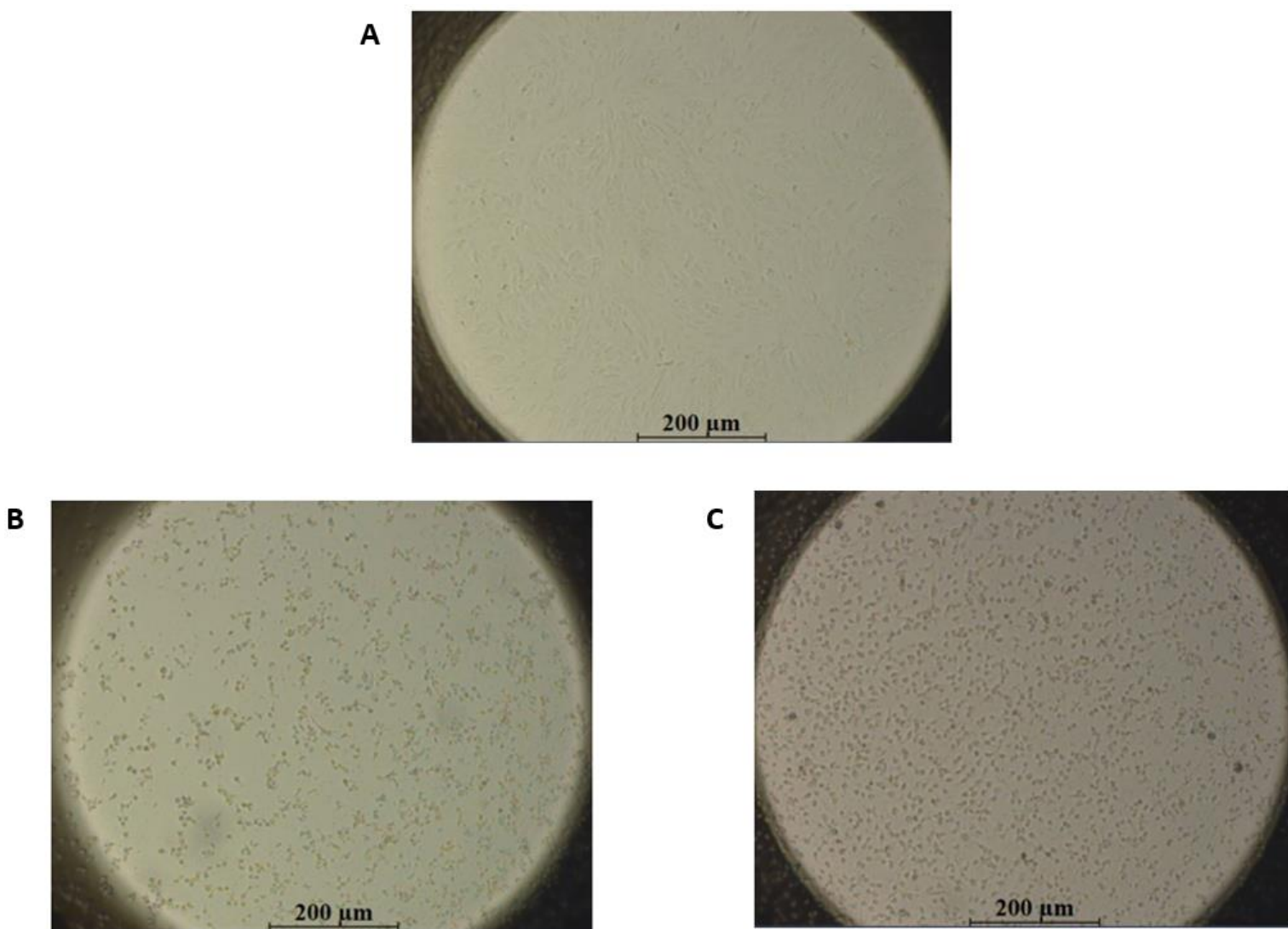
Em todos os tempos de coleta pré-determinados para a cinética de crescimento ( $t = 0$  h, 4 h p.i., 8 h p.i., 12 h p.i., 24 h p.i., 36 h p.i. e 48 h p.i.), algumas micrografias foram obtidas em um microscópio óptico invertido para o acompanhamento da evolução da morfologia celular após infecção por CHIKV e MAYV (Peru, 1988) (**Figura 3.10**). A questão de comparação morfológica visual (efeito citopático), são utilizadas células *mock-infected* (que receberam apenas PBS).





**Figura 3.10. Microscopia óptica da cinética de crescimento de MAYV e CHIKV em células Aag-2 em MOI 1.** Ao decorrer do tempo de infecção (0 h a 48 h), as células perdem a distribuição parecida com estrelas, se soltam do fundo do poço, ficam arredondadas e formam sincícios. **Mock:** células não-infectadas, à direita, que formam apenas grumos. Imagens obtidas com aumento de 10 X. Barras de escala: 200 µm.

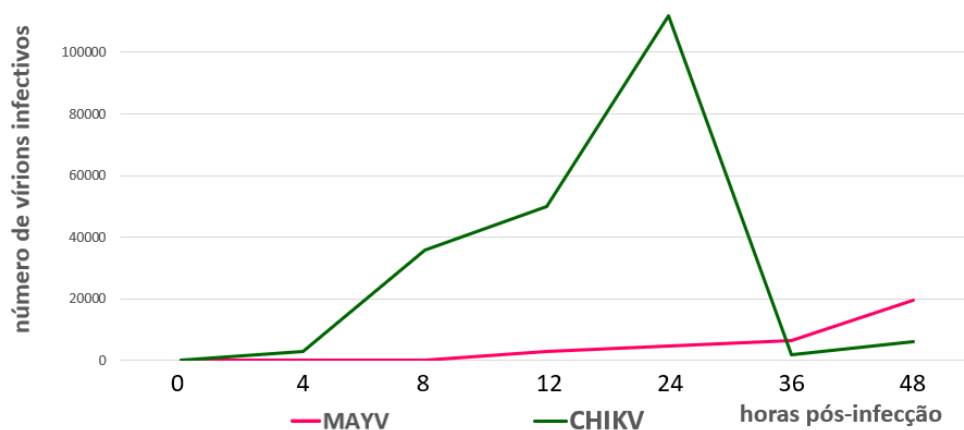
Os sobrenadantes coletados ao longo da curva de crescimento dos vírus MAYV e CHIKV em células Aag-2 foram titulados por *EndPoint Dilution Assay* em células Vero, pois estas permitem fácil visualização de efeito citopático (**Figura 3.11**). Os valores exatos da titulação em duplicata técnica são apresentados na **Tabela 2**, enquanto a tendência da produção de partículas alfavirais em células Aag-2 é apresentada no gráfico da **Figura 3.12**, plotado a partir das médias dos títulos virais ao longo dos tempos de infecção.



**Figura 3.11. Efeito citopático causado por MAYV e CHIKV em células Vero.** Células Vero foram utilizadas para titulação por *EndPoint Dilution Assay* por apresentarem morfologia muito diferente quando estão infectadas com **B:** MAYV ou **C:** CHIKV em relação a células **A:** não-infectadas. Nas células infectadas a matriz extracelular se degrada, as células se soltam da superfície e perdem a forma alongada. Todas as imagens estão com aumento 10 X.

**Tabela 2. Titulação dos vírus MAYV e CHIKV ao longo da cinética de crescimento em células Aag-2.** Placas de 12 poços foram semeadas com  $1 \times 10^5$  células em 500  $\mu$ l de meio de cultura. Após infecção, os sobrenadantes foram coletados nos tempos indicados e titulados em replicata técnica por *EndPoint Dilution Assay*. O TCID<sub>50</sub>/mL de cada amostra foi calculado de acordo com o método de Reed e Muench.

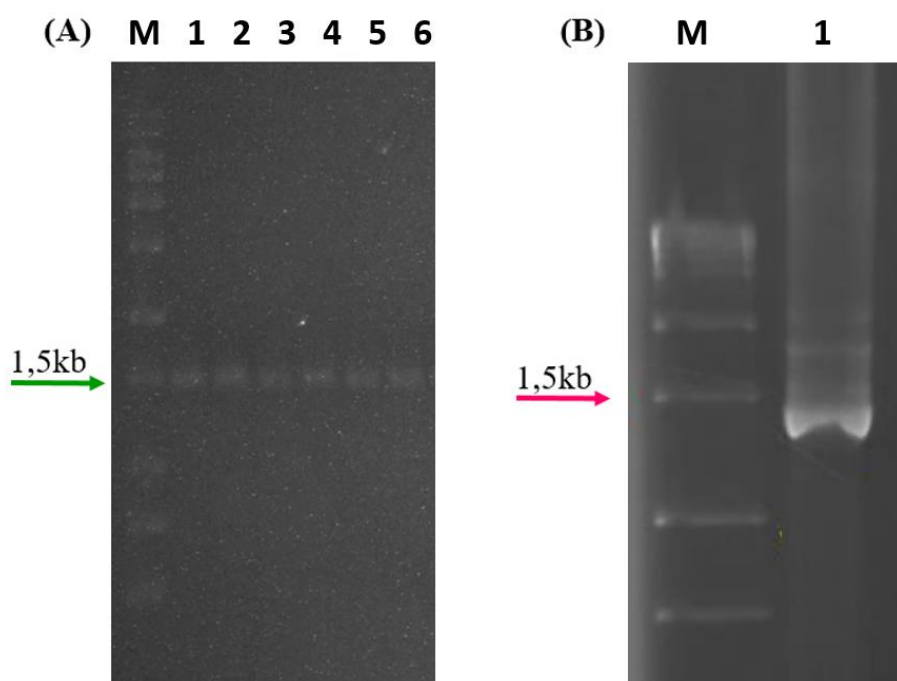
MAYV		tempo	CHIKV	
MOI 1 replicata a	MOI 1 replicata b		MOI 1 replicata a	MOI 1 replicata b
indetectável	indetectável	0 h	indetectável	indetectável
indetectável	indetectável	4 h	3,56E+03	7,04E+03
indetectável	indetectável	8 h	1,12E+04	6,00E+04
3,72E+03	2,00E+03	12 h	8,50E+04	1,50E+04
6,38E+03	2,86E+03	24 h	8,40E+04	1,40E+05
6,94E+03	5,70E+03	36 h	7,02E+03	2,90E+04
2,85E+04	1,08E+04	48 h	7,02E+03	5,00E+03



**Figura 3.12. Média do número de partículas infecciosas de MAYV e CHIKV produzidas por  $1 \times 10^5$  células Aag-2 ao longo dos tempos de infecção.** O MOI 1 foi usado para MAYV e para CHIKV. As amostras foram tituladas em duplicatas técnicas por *EndPoint Dilution Assay* e suas médias foram plotadas em um gráfico no Excel. Tempos de coleta: 0 h, 4 h p.i., 8 h p.i., 12 h p.i., 24 h p.i., 36 h p.i. e 48 h p.i.

Para confirmar a replicação viral intracelular, as células Aag-2 foram submetidas a extração de RNA, seguida da produção de cDNA por RT-PCR com oligonucleotídeos randômicos e PCR com oligonucleotídeos específicos para o envelope (E3-E2) de MAYV e CHIKV. As amostras de CHIKV (Brasil, 2015) mostraram *amplicon* com o

tamanho esperado de 1,5Kb (**Figura 3.13, A**), enquanto as amostras de MAYV (Peru, 1988), não. Na época, foram levantadas algumas hipóteses e algumas estratégias para seguimento do projeto. A hipótese principal era de que, por ser um vírus de RNA isolado há 35 anos, o genoma viral pode ter sofrido mutações suficientes para impedir o reconhecimento da sequência pelos oligonucleotídeos. Os vírus das famílias Flaviviridae, Togaviridae e Bunyaviridae têm sua replicação do RNA genômico em baixo nível de fidelidade (Huang et al., 2019) e os oligonucleotídeos usados na tentativa de amplificação foram desenhados a partir de isolados brasileiros da década de 2010. Na Fiocruz-RJ, tal isolado foi confirmado por um protocolo de PCR em tempo real utilizando oligonucleotídeos que deveriam ser ainda sintetizados para que nós pudéssemos utilizar. De acordo com as possibilidades de ação e com o tempo restante para a finalização do projeto, optou-se por seguir o trabalho com outra amostra de MAYV, que foi isolada no Brasil em 2015. Tal isolado foi confirmado por RT-PCR antes das infecções (**Figura 3.13, B**).

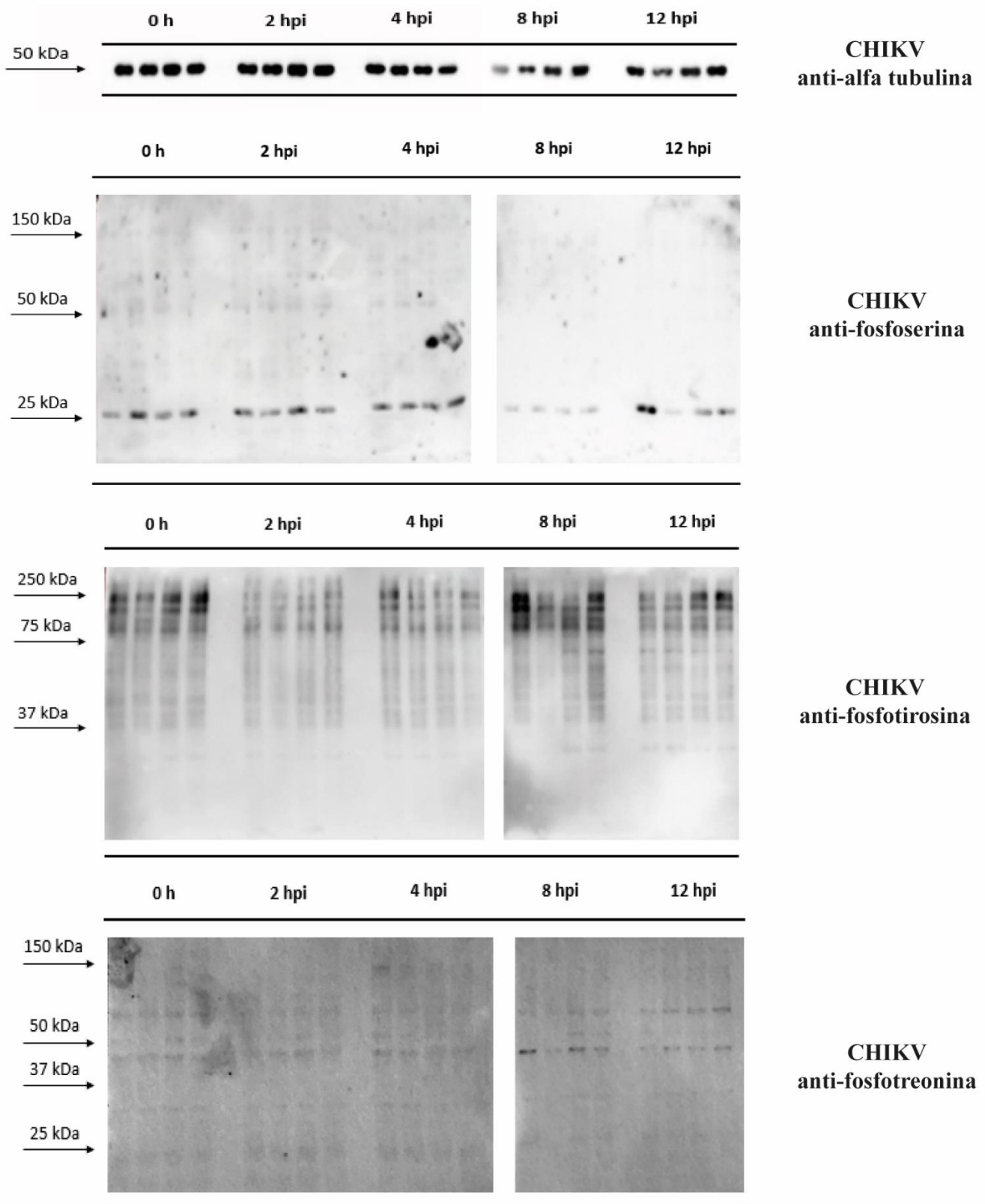


**Figura 3.13. Resultado da PCR para amplificação do envelope viral (E3-E2) a partir da cinética de crescimento em células Aag-2 (CHIKV) e do estoque viral (MAYV).** oligonucleotídeos específicos para amplificar a região (E3-E2) de CHIKV e MAYV foram utilizados, com *amplicon* de 1,5 kb. (A) é referente às amostras infectadas com CHIKV, confirmadas após a infecção. M. marcador molecular, 1. t = 4 h, 2. t = 8 h, 3. t = 12 h, 4. t = 24 h, 5. t = 36 h, 6. t = 48 h. (B) é referente ao isolado brasileiro de MAYV (1), confirmado (à direita do marcador) previamente à infecção em células Aag-2. Marcador molecular: Ludwig 1kb ladder.

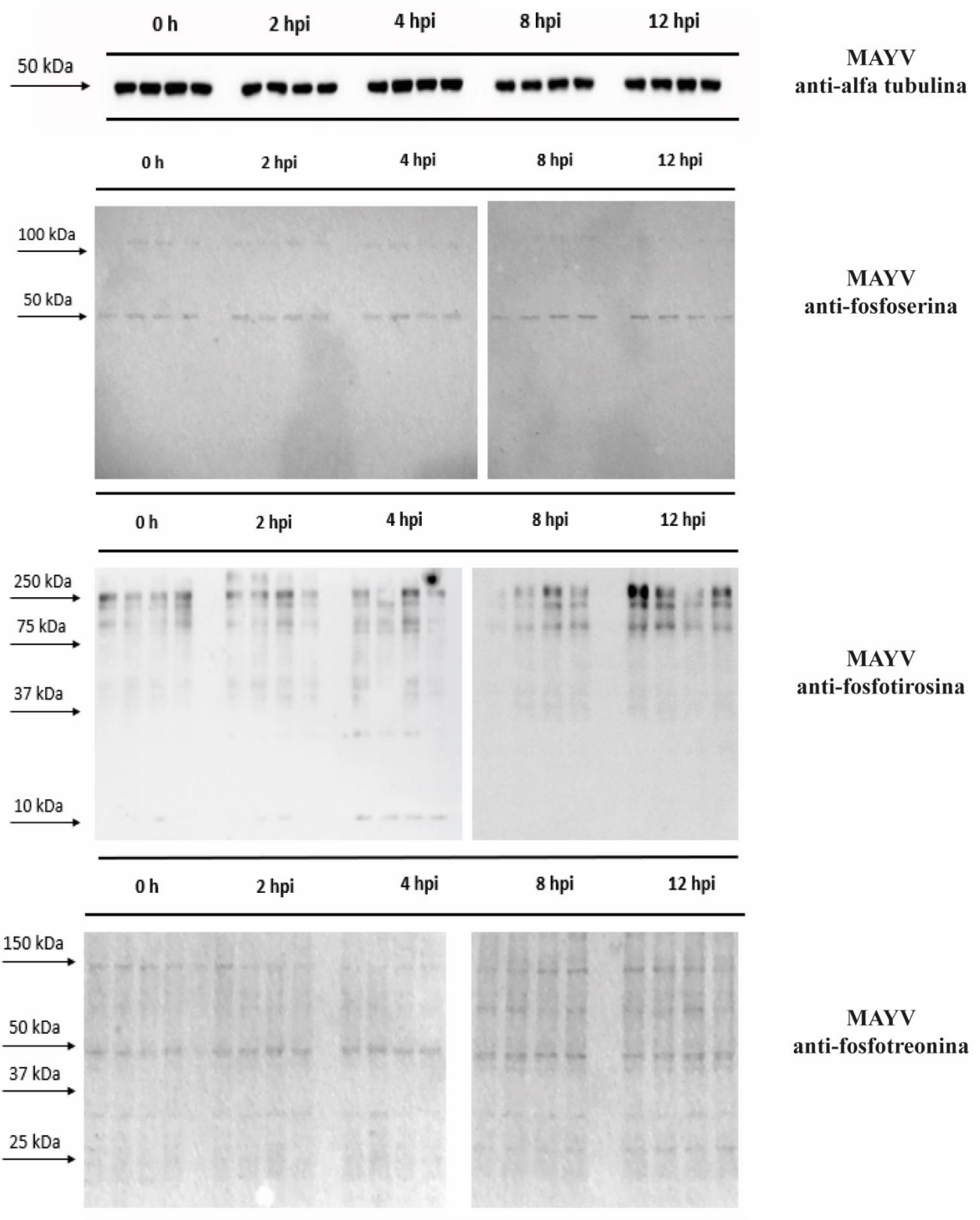
### 3.5.3. Imunodeteccção das proteínas fosforiladas por *Western Blot*

A partir das proteínas totais de células Aag-2 infectadas tanto com CHIKV e MAYV, foram corridos géis SDS-PAGE com 10 µg de cada uma das replicatas. Os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose que foram submetidas a *Western Blots* com anticorpos primários anti- $\alpha$  tubulina (controle endógeno de Aag-2) e anti-fosfósítios de serina, tirosina e treonina. Os imagens relacionadas às células infectadas com CHIKV estão na **Figura 3.14**, enquanto as infectadas com MAYV encontram-se na **Figura 3.15**.

Pode-se observar nas **Figuras 3.14 e 3.15** que a banda relativa à  $\alpha$ -tubulina de *Ae. aegypti* (Q1HR53) com 49 kDa, foi marcada com alta especificidade. Como esperado, os anticorpos anti-fosfósítios marcaram múltiplas bandas de proteínas, variando de 10 kDa até 250 kDa, conforme demonstrado pelo marcador utilizado. Esses anticorpos não marcam resíduos fosforilados em posições específicas, mas sim todas as serinas, tirosinas e treoninas fosforiladas às quais os anticorpos tiveram acesso. Em relação ao anticorpo anti-fosfotirosina, percebe-se uma marcação mais fraca das proteínas de células Aag-2 infectadas com MAYV em relação às proteínas das células infectadas por CHIKV. Em relação ao anti-fosfoserina, uma banda de 25 kDa foi fortemente marcada em células infectadas com CHIKV (**Figura 3.14**), enquanto o mesmo não foi observado para infecção por MAYV (**Figura 3.15**).



**Figura 3.14.** Imunodeteção por *Western Blot* de proteínas provenientes de células Aag-2 (*Aedes aegypti*) infectadas com CHIKV e coletadas em  $t = 0$  h, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i. Foram usados 4 anticorpos primários, de cima para baixo: anti- $\alpha$  tubulina, anti-fosfoserina, anti-fosfotirosina e anti-fosfotreonina. O marcador de proteínas utilizado como referência foi o Protein Dual Color Standards (Bio-Rad), que possui bandas proteicas com as seguintes massas moleculares em kDa: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250.



**Figura 3.15. Imunodeteccção por *Western Blot* de proteínas provenientes de células Aag-2 (*Aedes aegypti*) infectadas com MAYV e coletadas em  $t = 0$  h, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i.** Foram usados 4 anticorpos primários, de cima para baixo: anti- $\alpha$  tubulina, anti-fosfoserina, anti-fosfotirosina e anti-fosfotreonina. O marcador de proteínas utilizado como referência foi o Protein Dual Color Standards (Bio-Rad), que possui bandas proteicas com as seguintes massas moleculares em kDa: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 e 250.

## 3.6. Discussão

### 3.6.1. Predição *in silico* de proteínas fosforiladas de *Aedes aegypti* por homologia com organismos modelo eucarióticos

A busca por proteínas fosforiladas de *Ae. aegypti* no UniProt resultou em apenas três entradas, sendo duas referentes à endonuclease flap 1 (Q178M1 e A0A618TCV3) e outra referente à proteína nicotinato fosforibosiltransferase (Q16GY8). Assim, optou-se por realizar uma predição *in silico* por homologia de proteínas de *Ae. aegypti* com proteínas fosforiladas de cinco organismos eucarióticos bem estudados, sendo: *Sacharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*. Após todas as etapas de triagem, obtivemos 433 proteínas homólogas de *Ae. aegypti*, as quais foram listadas na **Tabela suplementar S1** com os valores de cobertura, *E-value* e identidade em relação aos cinco outros organismos. Entre essas proteínas preditas, encontramos a endonuclease flap 1 (A0A618TCV3) e a nicotinato fosforibosiltransferase (A0A618TR57). A endonuclease flap 1, inclusive, apresentou os critérios de homologia para endonucleases de *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* e *H. sapiens* enquanto a nicotinato fosforibosiltransferase, para *C. elegans* e *M. musculus*.

A partir de uma análise global inicial, notou-se que essas 433 proteínas resultantes estão, de forma geral, relacionadas a diferentes estruturas e/ou processos como:

- **transcrição:** subunidade RPB1 da RNA polimerase II (J9HHP4), subunidade 1 do fator de *splicing* 3B (Q17F20) e subunidade 7 do fator de iniciação da transcrição TFIID (A0A6I8TE07).
- **tradução:** subunidade 1 do fator de iniciação da tradução 2 (Q16IG9), proteína ribossomal 40S S6 (Q0C741), tRNA metiltransferase (Q0IEN3), proteína ribossomal 60S L13a (Q16US7).
- **DNA:** histona H2A (Q173V2), DNA topoisomerase I (A0A6I6IXZ9), histona H4 (Q16IE4), proteína RAD51 reparadora de DNA (Q177M5), histona acetiltransferase KAT2A (Q17PA5), histona deacetilase Rpd3 (Q17CF0).
- **vias de transdução de sinais:** quinase 2 ativada por MAP-quinase (A0A6I8THF6), fator 2 de liberação de guanina relacionado a *ras* (A0A6I8TX63), adenilato ciclase tipo 6 (A0A6I8TL74), proteína quinase 14 B ativada por mitógeno (Q16YY2), receptor quinase 2 acoplado à proteína G (A0A6I8TCF7), proteína quinase 3 ativada por mitógeno (A0A1S4G5Q8).



- **metabolismo mitocondrial:** acetil Co-A carboxilase (A0A6I8U419), citocromo C 2 (Q1HRI9), piruvato quinase (Q16F38), fumarato hidratase (Q16ZL0), glicose 6-fosfato-isomerase (Q16KI0).
- **resposta a estresse:** quinase JNK1 ativada por estresse (S4SE26), fosfoproteína 1 induzida por estresse (Q17DL1).
- **canais iônicos:** canal de potássio *slowpoke* ativado por cálcio (A0A6I8U1Q2), proteína de canal de sódio (A0A6I8U2E8), canal ânion-seletivo dependente de voltagem (A0A6I8TND9).
- **ubiquitinação:** enzima conjugadora de ubiquitina E2R2 (Q16XJ8), poliubiquitina-C (Q17N50), E3 ubiquitina-ligase *parkin* (Q17DC3).
- **apoptose:** endonuclease G (Q16F0), receptor tirosina-quinase (A0A6I8T9E0), citocromo C mitocondrial (Q1HRI9).
- **vesículas:** proteína de membrana 2 associada a vesículas (A0A6I8U527), regulador funcional sináptico FMR1 (A0A6I8TBW1), *vesicle-fusing* ATPase 1 (Q17KM8).

Na **Figura 3.6** podemos observar que apenas duas das 433 fosfoproteínas preditas para *Ae. aegypti* já foram anotadas como fosforiladas para os cinco organismo modelo utilizados. Em relação às contribuições individuais, o número de proteínas compartilhadas apenas com *Ae. aegypti* cresceu ao passo em que aumentou a complexidade do organismo comparado, sendo uma para *S. cerevisiae*, nove para *C. elegans*, 19 para *D. melanogaster*, 47 para *M. musculus* e 90 para *H. sapiens*. Tal observação não era esperada, visto que o *Ae. aegypti* apresenta relação filogenética muito mais próxima de *D. Melanogaster*, ambos pertencentes à ordem Diptera (Severson et al., 2004; Behura et al., 2011). Contudo, esse resultado pode ter sido obtido porque a quantidade de estudos envolvendo mamíferos e suas quantidades de proteínas e fosfoproteínas já caracterizadas é muito maior que as mesmas quantidades para insetos.

A partir da análise de enriquecimento por homologia da plataforma PathView, foi possível observar que as vias de autofagia e de transdução de sinal MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) tiveram várias proteínas enriquecidas a partir das proteínas preditas de *Ae. aegypti* (**Figuras 3.7 e 3.8**). A via MAPK, altamente conservada nos eucariotos, atua na defesa antiviral em *Drosophila*, mas sua função em mosquitos é menos caracterizada. Nela, ocorre uma cascata fosforilativa para ativação dos fatores de

transcrição ERK (Tikhe e Dimopoulos, 2021). Ao suprimir a via MAPK em células de *Ae. aegypti* pela depleção de dois dos seus componentes, Xu et al. (2013) observaram um aumento da titulação de SINV virus e Vesicular stomatitis virus (VSV). Além disso, foi demonstrado que aminoácidos provenientes da insulina humana adquiridos e digeridos pelo mosquito após repasto sanguíneo também estimulam a ativação da via MAPK, mediando assim a imunidade antiviral no vetor (Liu et al., 2020; Prince et al., 2023). Já a autofagia atua na homeostase celular e tecidual dos organismos, degradando organelas danificadas ou proteínas com enovelamento incorreto (Lee et al., 2019). O papel de imunidade inata antiviral da autofagia é mais conhecido nos mamíferos, mas em *Drosophila* já foi observado que o reconhecimento do Rift Valley fever virus e do VSV pelo receptor Toll-7 ativou a via de sinalização autofágica que é coordenada pela quinase PI3K (Shelly et al., 2009). Em células Aag-2 de *Ae. aegypti* infectadas com o Dengue virus, houve ativação da via autofágica após a infecção, o que reduziu a titulação viral. Adicionalmente, sua inibição levou a uma pequena diminuição na quantidade de partículas virais infectivas (Chen e Smartt, 2021). Em Brackney et al., (2020), ainda utilizando cultura de células Aag-2, as infecções por DENV e por CHIKV também induziram a autofagia. Porém, tanto ao estimular quanto ao reprimir essa via, obteve-se maiores títulos virais. Esses resultados contraditórios, em adição a outros achados do estudo, levam a crer que a autofagia tenha uma ação antiviral limitada em mosquitos e que existam outros fatores envolvidos nessa regulação.

Da mesma forma, esse resultado também foi encontrado na classificação funcional fornecida pelo Cytoscape a partir do mapa de IPPs preditas de *Ae. aegypti* gerado pelo STRING (**Figura 3.9**), mostrado nas cores azul claro (autofagia - animal) e rosa claro (via de sinalização MAPK - mosca). Na via de autofagia do PathView (**Figura 3.8**) pode-se observar um enriquecimento de proteínas relativas às vias de sinalização AMPK (*AMP-activated protein kinase*) e mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que também aparece, em amarelo, na **Figura 3.9**. No Cytoscape, também foram classificadas proteínas envolvidas em cascatas de fosforilação (azul) e regulação da síntese de proteínas e complexos proteicos (verde e roxo). A via AMPK, conservada em seres eucariotos, é ativada a partir de baixos níveis de ATP intracelular (com consequentes níveis mais elevados de AMP ou ADP) e regula processos como crescimento, reprogramação do metabolismo e metabolismo energético, entre outros (Mihaylova e Shaw, 2011). Uma série de estímulos pode levar à ativação da via AMPK, incluindo as infecções virais, que desregulam processos metabólicos celulares. A depender da espécie viral considerada e das características dos organismos hospedeiros, a via AMPK pode exercer funções

antivirais ou provirais, inclusive em resposta aos arbovírus (Silwal et al., 2018). A via AMPK e seu regulador positivo LKB1 inibem a replicação do Rift Valley Fever virus em células de mamíferos pela supressão da síntese de ácidos graxos (Moser et al., 2012). Na infecção por DENV em células humanas, a inibição da via AMPK leva a um aumento na atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGGR) e gera um ambiente rico em colesterol no retículo endoplasmático, promovendo a formação de complexos de replicação viral (Soto-Acosta et al., 2017). Já o ZIKV apresentou efeito diferencial em relação à via AMPK quando comparada a infecção em fibroblastos humanos e em células C6/36 de *Ae. albopictus*. O ZIKV em células humanas levou a um aumento dos níveis de mono e difosfatos e uma depleção seletiva de ATPs e UTPs, levando à fosforilação da quinase AMP. A ativação da via AMPK levou à indução de apoptose nessas células via caspase 3. Em cultura de C6/36, houve um aumento dos níveis de mono, di e trifosfatos em 24 h p.i., com subsequente queda em 36 h p.i. Com a proporção entre AMPs e ATPs não modificada, a via AMPK não é estimulada a ativar a autofagia, permitindo assim a sobrevivência das células de mosquito (Thaker et al., 2019).

Mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas realizam anautogenia (a maturação dos ovos só se inicia após o repasto sanguíneo) e, nelas, já foi observado que a serina-treonina quinase TOR (via mTOR) atua como um sensor de nutrientes, entre outras funções relacionadas à expressão gênica (Hansen et al., 2004). Depois de um repasto sanguíneo, TOR fosforila o repressor traducional 4E-BP e a quinase S6 (S6K), induzindo a síntese de tripsina para digestão das proteínas sanguíneas (Brandon et al., 2008). A fosforilação da proteína S6K também é necessária para a tradução de mRNAs e a indução de processos como a vitelogênese, essencial para a viabilidade dos ovos produzidos (Hansen et al., 2005). Além do mais, boa parte do carbono proveniente do repasto sanguíneo é convertido em lipídeos e carboidratos para criar a reserva de energia necessária para o ciclo gonotrófico seguinte (Zhou et al., 2004). Já a modulação do complexo 1 da via mTOR (mTORC1) em resposta a infecções virais é muito variada e depende da estratégia de replicação utilizada pelo vírus em específico (Le Sage et al., 2016). Em células humanas HUVEC, foi mostrada uma robusta correlação entre a infecção por ZIKV e a inibição de mTORC1. A supressão do componente Raptor, um inibidor de mTORC1, promoveu a replicação do ZIKV, enquanto o nocaute da via em si levou a um aumento na detecção da RNAs virais (Liu et al., 2023). Os relatos em relação à modulação de mTORC1 por CHIKV são controversos, com grupos que mostraram baixa interferência, enquanto outros observaram ativação e até inibição da via (Thaa et al., 2015; Das et al., 2014). Joubert e

colegas (2012, 2015) mostraram que a supressão de mTORC1 em resposta a CHIKV em células de mamíferos levou ao adiamento da apoptose e ao aumento da replicação viral. Concordantemente, um estudo do nosso grupo sugere que, ao infectar células Aag-2 de *Ae. aegypti*, o CHIKV pode induzir uma ativação tardia de processos apoptóticos de forma a permitir a produção de novas partículas virais durante um maior tempo nas células hospedeiras (Vasconcellos et al., 2022).

Ainda no mapa de IPPs da **Figura 3.9**, observou-se que oito das 11 proteínas com maior grau de interação são proteínas estruturais ribossomais ou relacionadas à tradução, mostrando a importância da interação entre diferentes proteínas para o bom funcionamento do metabolismo proteico. Das três proteínas restantes, encontramos a subunidade beta-*like* de uma proteína de ligação a guanina (AAEL013069, Q1HRQ2) e a GTPase HRAS (AAEL012071, Q16N58). As proteínas de ligação a guanida, ou GEFs (*guanine exchange factors*), têm a capacidade de ativar pequenas GTPases e estão envolvidas em processos biológicos como proliferação celular e organização do citoesqueleto (Lin et al., 2014). HRAS é uma GTPase monomérica que, de acordo com a legenda de cores, está envolvida tanto na autofagia quanto nas vias de sinalização imunes mTOR e MAPK. Por último, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, Q4PKD7) é um co-fator da enzima DNA polimerase que está presente em todas as fases do ciclo celular, seja na replicação ou no reparo do DNA (Oyama et al., 1995). A proteína 14-3-3 ζ (zeta) (circulada em rosa escuro), apesar de só possuir uma IPP no mapa predito, possui papel importante no remodelamento do citoesqueleto e na fagocitose em células de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Trujillo-Ocampo et al., 2017).

Todas essas análises, apesar de serem meramente exploratórias, indicam os possíveis resultados que poderemos encontrar a partir da análise fosfoproteômica por espectrometria de massas (MS). De fato, o bom funcionamento dos processos, estruturas e mecanismos enriquecidos requer uma regulação fina no tempo e no espaço, compatível com a fosforilação dessas proteínas. Entretanto, apenas após a análise dos resultados de MS decorrente de células Aag-2 infectadas com alfavírus, será possível obter uma perspectiva experimentalmente concreta quanto aos resultados da predição *in silico*. Pretende-se também avaliar a possibilidade de aplicar a metodologia preditiva utilizada neste trabalho para estudos futuros com organismos que não possuem uma ampla disponibilidade de anotações funcionais.

### 3.6.2. Cinética de crescimento de MAYV e CHIKV em células Aag-2

Os tempos de coleta e MOI utilizados basearam-se em trabalhos proteômicos prévios do nosso grupo que utilizaram os mesmos vírus (Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022). Nesses estudos, o MOI para infecção com CHIKV foi 0,1, enquanto para MAYV foi 1, sendo  $t = 48$  h p.i. o tempo final de coleta para ambos. Contudo, esses trabalhos objetivavam obter um panorama geral quanto à modulação da abundância de proteínas das células de *Ae. aegypti* ao longo da infecção viral. Além disso, também foi observado que aparentemente o efeito citopático das células Aag-2 quando infectadas com CHIKV era maior, em comparação com MAYV. Sugere-se que, por alguma razão desconhecida, o CHIKV possa ser mais virulento que o MAYV, ou que as células Aag-2 sejam mais suscetíveis ao CHIKV do que ao MAYV. No estudo atual, que almeja visualizar diferenças estatisticamente significativas nos níveis de fosforilação das proteínas, o foco principal está nos tempos iniciais de infecção, quando a sinalização celular para a ativação ou o silenciamento de vias metabólicas está acontecendo (Smith et al., 2021). Assim, determinamos tempos de coleta mais curtos, em adição aos tempos já estudados. Pelos motivos expostos acima, o uso de MOI 1 para ambos CHIKV e MAYV permitirá uma análise aprofundada em relação à modulação das proteínas, envolvidas ou não em eventos de fosforilação e/ou defosforilação. Poder-se-á também aprofundar o conhecimento sobre mecanismos celulares que nos ajudam a compreender como a célula Aag-2 se adapta nos tempos iniciais de infecção, e, potencialmente, sobre o que torna CHIKV mais virulento do que MAYV.

Os efeitos citopáticos visualizados nas células Aag-2 (**Figura 3.10**) e o cálculo dos títulos virais (**Tabela 2**) permitem observar que, para os isolados virais utilizados, os tempos mais tardios poderiam não ser adequados para um estudo fosfoproteômico. As células de  $t = 0$ h estão espalhadas pela superfície do poço formando uma monocamada de células bem delimitadas, em disposição semelhante a estrelas, com muitos espaços vazios entre elas. As células Aag-2 não-infectadas, ao decorrer do tempo e com o aumento da concentração celular, tendem a formar grumos celulares, como pode-se observar no *mock* 48 h p.i. (**Figura 3.10**). Nas células infectadas com CHIKV, já a partir de 36 h p.i. é possível observar uma marcante formação de sincícios, quando as membranas plasmáticas celulares vão se fundindo, formando um conglomerado celular maior que os grumos (**Figura 3.10**). Esse fenômeno é mais acentuado em  $t = 48$  h p.i., quando diversos processos pró e antivirais já foram ativados e muitas células possivelmente já entraram em apoptose (Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022). Em relação à titulação (**Tabela 2**), o tempo com maior número de partículas virais infectantes detectadas foi  $t =$

24 h p.i. para CHIKV e t = 48 h p.i. para MAYV, significando que, nesse intervalo, os vírus provavelmente tiveram tempo suficiente para sequestrar a maquinaria de expressão proteica das células por meio da modulação de vias de sinalização. Tendo em vista que o tempo necessário para a replicação de alfavírus é de aproximadamente 4 h (Oliveira Mota et al., 2015), em t = 24 h p.i. já foram possíveis seis rodadas de replicação viral. Assim, para um estudo fosfoproteômico focado em tempos iniciais de infecção, definimos os cinco tempos de coleta t = 0 h (não infectado), 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i. O experimento foi realizado em quadruplicatas biológicas para maior confiabilidade estatística das análises proteômicas a serem realizadas.

Como já discutido em trabalhos anteriores publicados pelo nosso grupo (Vasconcellos et al., 2020; Vasconcellos et al., 2022), o CHIKV aparenta ser um vírus mais virulento que o MAYV. As imagens de microscopia mostram efeitos citopáticos mais intensos para Aag-2 infectadas com CHIKV no MOI 1 do que para MAYV no mesmo MOI (**Figura 3.10**). No gráfico da média dos títulos virais ao longo de 48 h, podemos observar que a tendência do CHIKV é causar um aumento da titulação viral em tempos mais iniciais que o MAYV (**Figura 3.12**). A queda na titulação viral também ocorre de forma mais precoce, possivelmente pela degradação celular provocada pelos vírions infectivos. Ao final do experimento, as células infectadas com MAYV ainda estão produzindo partículas virais de forma crescente.

### 3.6.3. Imunodeteção das proteínas fosforiladas por *Western Blots*

A partir das alíquotas de 100 µg de proteínas totais de células Aag-2 infectadas tanto com CHIKV quanto com MAYV, foram corridos géis SDS-PAGE com 10 µg de cada uma das 40 replicatas. As proteínas nos géis, transferidas para membranas de nitrocelulose, foram submetidas a *Western Blots* com anticorpos anti- $\alpha$  tubulina e anti-resíduos fosforilados de serina, tirosina e treonina. Nas **Figuras 3.14 e 3.15** pode-se notar que, além da  $\alpha$ -tubulina de *Ae. aegypti* ter sido marcada com alta especificidade (aproximadamente 49 kDa), todos os anticorpos anti-fosfosítios apresentam padrões diferentes de marcação de bandas proteicas. O anticorpo anti-fosfoserina interagiu melhor com proteínas de massas moleculares aproximadas de 25 kDa, 50 kDa e 100 kDa, em todos os tempos de infecção analisados. Contudo, na comparação das células Aag-2 infectadas por CHIKV e MAYV, o material oriundo das células Aag-2 infectadas por MAYV marcou mais a banda de 100 kDa, enquanto o material oriundo das células Aag-2 infectadas por CHIKV marcou melhor a banda de 25 kDa. Como os dois *Western Blots*

foram realizados seguindo exatamente o mesmo protocolo e com os mesmos reagentes, hipotetiza-se que esta diferença pode ser resultado da ação dos diferentes vírus sobre a célula Aag-2.

Ainda nas **Figuras 3.14 e 3.15**, vemos que as bandas relativas à marcação pelo anticorpo primário anti-fosfotirosina apresentaram a maior diversidade de proteínas marcadas, sendo a grande maioria de massas moleculares mais elevadas, entre 37 kDa e 250 kDa. Para o MAYV, foi observada a marcação de um banda adicional de 14 kDa, principalmente nas quadruplicatas do tempo 4 h p.i., que não foi revelada para as células com CHIKV. Contudo, o uso de diferentes concentrações desse anticorpo para as amostras com MAYV e com CHIKV pode ter favorecido a marcação de algumas bandas proteicas em detrimento de outras. Já para o anticorpo primário anti-fosfotreonina, bandas menores e mais isoladas foram reveladas, com massas aproximadas de 145 kDa, 80 kDa, 55 kDa, 35 kDa e 25 kDa. Desde que cada membrana de *Western Blot* foi revelada separadamente, era esperada uma certa variação entre os resultados obtidos.

Ao contrário do que era esperado para uma análise visual desses experimentos, o anticorpo primário que mais marcou proteínas em diferentes bandas foi o anti-fosfotirosina, que, de acordo com a literatura científica disponível, deveria corresponder a cerca de 1% do total de resíduos de aminoácidos fosforilados em uma célula (Deshmukh et al. 2011; Humphrey et al., 2015; Ardito et al., 2017). No mesmo raciocínio, as bandas proteicas marcadas com o anticorpo anti-fosfoserina foram as menos abrangentes, o que vai de encontro à proporção esperada de 85% de fosforilação em resíduos de serina (Deshmukh et al. 2011; Humphrey et al., 2015; Ardito et al., 2017). A baixa proporção esperada de eventos de fosforilação em resíduos de tirosina pode decorrer do fato de, entre os três mais abundantes, a tirosina ter sido a última a ser descoberta (1979) (Hunter, 2014). Assim, devido ao menor tempo dedicado ao estudo da fosforilação nesse resíduo, pode-se estar subestimando a proporção de tirosinas fosforiladas em seres eucarióticos. Além disso, na literatura, as proteínas de seres eucarióticos mais amplamente estudadas são as de mamíferos, dificultando o estudo de proteínas de organismos não-modelo, como o *Ae. aegypti*, já que existem variações na sequência e na estrutura das proteínas. Outros trabalhos anteriores já utilizaram esses mesmos três anticorpos em *Western Blots*: anti-fosfoserina (Niger et al., 2010; Mercier et al., 2018, Backe et al., 2023; Sage et al., 2023), anti-fosfotreonina (Backe et al., 2023; Sage et al., 2023) e anti-fosfotirosina (Cuccuru et al., 2004; Menon et al., 2010). O material biológico analisado nesses estudos engloba proteínas de células humanas, murinas e de leveduras. Contudo, em quase todas as imagens de *Western Blot* encontradas foram apresentadas apenas bandas específicas

de proteínas com resíduos de serina, treonina e tirosina fosforilados, e não o extrato total celular, como ocorre no presente trabalho. Em relação ao anticorpo anti-fosfotirosina, Allegretti et al. (2001) apresentaram o extrato total de proteínas de células do nematódeo *Trichinella spiralis*, que mostrou marcação de tirosinas fosforiladas em proteínas que variaram entre 14 kDa e 103 kDa. Nos nossos resultados de células de *Ae. aegypti*, foram detectadas bandas de proteínas com tirosinas fosforiladas de 14 kDa a 250 kDa, sugerindo que as proteínas com sítios de fosfotirosina do mosquito possuem tamanhos mais abrangentes, podendo ser significativamente maiores. Potencialmente, sugere-se que a fosforilação de tirosinas possa exercer função reguladora em mais processos, ou mesmo ocorrer em maior abundância nas proteínas de *Ae. aegypti* do que do nematódeo *T. spiralis*.

### 3.7. Conclusões e perspectivas

Os experimentos até aqui realizados nos permitiram determinar os parâmetros das amostras para espectrometria de massas: MOI 1 para CHIKV e MAYV, a fim de investigar a modulação fosfoproteômica de células Aag-2 quanto à virulência de ambos os vírus nos tempos de coleta  $t = 0$  h, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i.. Após o processamento, obteve-se quantidade suficiente de fosfopeptídeos de cada amostra para realizar espectrometria de massas *label-free*. Os experimentos de *Western Blot* mostraram que as proteínas fosforiladas em resíduos de serina, tirosina e treonina apresentaram padrões diferentes de marcação. A predição *in silico* de fosfoproteínas de *Ae. aegypti* nos proporcionou uma ampla noção do que poderá ser encontrado na análise fosfoproteômica experimental, além de poder orientar a escolha de futuros experimentos de validação. Contudo, apenas com os resultados definitivos poderemos dissertar a respeito do papel da fosforilação na complexa interação entre CHIKV e MAYV com seu vetor *Ae. aegypti*. No momento, estamos aguardando as amostras serem corridas no espectrômetro de massas para que tenhamos acesso aos dados brutos que serão analisados na etapa de bioinformática. As amostras serão analisadas em colaboração do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB com o Laboratório de Proteômica do Centro de Toxinas, Resposta Imune e Sinalização Celular do Instituto Butantan, em São Paulo. Para a análise dos dados, pretendemos utilizar os *softwares* MaxQuant (Cox e Mann, 2008), Perseus (Tyanova et al., 2016) e ptmRS (Taus et al., 2011) para identificação e quantificação das proteínas moduladas nas condições citadas acima, análise estatística e previsão probabilística dos sítios de modificação pós-traducional (Liu et al., 2016; Shobahah et al., 2017; Yun et al., 2020), Para formação de clusters



proteicos, análise de interação proteína-proteína, enriquecimento de vias metabólicas, análise do padrão de fosforilação das proteínas e suas respectivas interpretações biológicas dentro do contexto da interação vírus-vetor e análise dos sítios de fosforilação serão usadas as plataformas STRING (Szklarczyk et al., 2015), BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016), PathView (Luo e Brouwer, 2013), Cytoscape (Shannon et al., 2003) e Momo (Cheng et al., 2018), respectivamente.

## Capítulo 4.

### Considerações finais e perspectivas gerais

A mudança no comportamento humano nos últimos séculos contribuiu amplamente para criar um ambiente propício à disseminação em massa das arboviroses, com grande expansão territorial, criação de conglomerados urbanos, intensificação do contato dos seres humanos entre si e com outros animais, alterações climáticas, diminuição drástica no tempo de viagem entre diferentes países e até continentes (Weaver, 2013). O processo de globalização e o trânsito intenso de pessoas e mercadorias ao redor do mundo facilitaram a disseminação de doenças que antes eram restritas a determinados lugares. Assim, as arboviroses se tornaram um grande problema de saúde pública em todo o mundo, sendo um grande desafio para governantes, pesquisadores e para a população em geral.

As arboviroses são doenças reemergentes, que podem ficar anos sem causar grandes prejuízos a uma determinada população, mas que, devido a fatores ambientais ou mesmo fatores intrínsecos dos vírus, de seus vetores ou da população suscetível, podem ter seu comportamento epidemiológico alterado com rapidez (Espinal et al., 2019). Nas quatro primeiras semanas do ano de 2024, por exemplo, observou-se na população do Distrito Federal um aumento de 1.116% no número de casos de dengue com sinais de alarme e de 1.500% no número de casos graves em relação ao mesmo período de 2023, além de um aumento preocupante dos casos de Chikungunya virus (CHIKV) e Zika virus (Boletim Epidemiológico nº4 SSDF, 2024; Correio Braziliense, 2024). Ainda sobre o CHIKV, em 2022 houve um aumento de 78% de casos no Brasil comparado a 2021, em janeiro de 2024 os casos prováveis no Distrito Federal cresceram em 229% comparado a janeiro de 2023 e um município do estado de Mato Grosso decretou situação de emergência devido à epidemia de CHIKV e DENV (Portal do Butantan, 2023; g1 Distrito Federal, 2024; g1 Mato Grosso, 2024). Em relação ao Mayaro virus (MAYV), que infecta majoritariamente a população rural, em 2023 e 2024 foram detectados casos de febre Mayaro em cidades dos estados do Acre e do Amazonas (g1 Acre, 2023; g1 Amazonas, 2024). Historicamente temos visto que a eliminação dos vetores arbovirais, como os mosquitos, é extremamente difícil, se não impossível. As tentativas de controle dos vetores com inseticidas, apesar de ainda necessárias, são perigosas devido ao amplo espectro de organismos que podem ser afetados e devido ao desenvolvimento de resistência (Araújo et al., 2023). Atualmente, boa parte da

comunidade científica se dedica a conhecer os detalhes do processo coevolutivo que envolve arbovírus, seus vetores e hospedeiros. Os trabalhos apresentados nessa tese (**Capítulos 2, 3 e Anexos**) representam uma pequena parte dos esforços empenhados na compreensão das interações entre os arbovírus MAYV e CHIKV e o vetor *Aedes aegypti*.

No **Capítulo 2**, a microscopia eletrônica aliada à análise proteômica realizadas em células Aag-2 (*Ae. aegypti*) infectadas com CHIKV nos proporcionaram uma melhor entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos na infecção por CHIKV. A expressão elevada de proteínas virais nos estágios iniciais de infecção permitiu que, em 48 h p.i., muitas partículas virais já estivessem montadas e prontas para serem liberadas no meio extracelular. Esse processo demanda energia, assim como a ativação das defesas antivirais celular, o que é compatível com a maior abundância detectada em proteínas relativas ao metabolismo energético em 48 h p.i. A análise proteômica de células Aag-2 infectadas com MAYV (**Anexos**) foi detectado um aumento da atividade glicolítica em 48 h p.i. No mesmo raciocínio, o possível alongamento observado nas mitocôndrias, com consequente desequilíbrio da rede mitocondrial da célula hospedeira, podem sinalizar à célula a necessidade de uma maior produção energética em tempos tardios de infecção. Esse alongamento mitocondrial também pode estar relacionado a uma estratégia para adiar a apoptose na célula hospedeira por intermédio de espécies reativas de oxigênio e citocromo c. Ao evitar a morte celular programada precoce, o CHIKV ganha um tempo adicional para a sua replicação. Similarmente aos resultados da análise proteômica de células Aag-2 infectadas com MAYV, na infecção com CHIKV também foi identificada com maior abundância em 48 h p.i. a proteína proibitina, que já foi caracterizada com um receptor de membrana para arbovírus como DENV e CHIKV (Hidari e Suzuki, 2011; Wintachai et al., 2012). Além disso, uma segunda proibitina com localização mitocondrial foi identificada. Proibitinas mitocondriais têm, entre outras funções, estabilizar a proteína OPA1 envolvida na fusão mitocondrial, o que coincide com as mitocôndrias alongadas encontradas. Além disso, uma série de RNA helicases, com diferentes abundâncias e domínios foram identificadas. Entre as DEAD-box helicases, uma possível função sugerida é a participação no processo de RNA de interferência, um dos maiores mecanismos antivirais no insetos. Contudo, outras RNA helicases também podem estar agindo de forma pró-viral. Ainda na proteômica de células Aag-2 infectadas com MAYV, foi detectada em 12 h p.i. uma maior abundância da proteína cognata 5 da HSP70, a HSC70. Sabe-se que a HSC70 atua juntamente com a HSP90 para manter a

conformação correta da proteína Argonauta no complexo RISC da via de RNA interferente (Iwasaki et al., 2010).

Esse conhecimento a nível molecular da interação arbovírus-vetor será aprofundado quando tivermos acesso aos dados fosfoproteômicos de células Aag-2 (*Ae. aegypti*) infectadas, tanto com MAYV quanto com CHIKV (**Capítulo 3**). A fosforilação de proteínas é um mecanismo regulador da grande maioria dos processos vitais dos organismos, como desenvolvimento e imunidade (Ardito et al., 2017). Logo, conhecer a modulação que esses arbovírus provocam nas células de *Ae. aegypti* em tempos iniciais de infecção vai nos auxiliar a compreender a ativação ou o desligamento dos processos envolvidos na infecção persistente. Como foi utilizada a mesma multiplicidade de infecção para ambos os vírus, poderemos comparar os efeitos provocados por cada alfavírus. Por ora, a predição *in silico* de fosfoproteínas de *Ae. aegypti* nos aponta possíveis vias e componentes candidatos para intermediar essa interação, como a autofagia e a via MAPK, e também nos auxilia na escolha de possíveis proteínas-alvo para experimentos futuros. Uma proteína interessante encontrada na predição foi a 14-3-3ζ, que é um adaptador molecular que media a fosforilação em processos como imunidade e apoptose (Trujillo-Ocampo et al., 2016). Além do mais, ainda que a relação arbovírus-vetor seja o principal foco desse trabalho, também se faz importante o conhecimento dos processos fosforilativos do vetor na ausência de infecção, já que a maioria dos inseticidas têm como alvo estruturas e mecanismos do sistema nervoso envolvidos em eventos de fosforilação (Araújo et al., 2023). Os *Western Blots* realizados com anticorpos anti-fosfossítios de serina, treonina e tirosina mostraram um padrão diferente de marcação de bandas de proteínas. Entre as células infectadas com MAYV e CHIKV, foram observadas poucas diferenças nos padrões de marcação de banda, o que, até então, pode ser devido a alguma diferença no processo replicativo desses dois vírus, ou mesmo devido a variações e limitações dos próprios experimentos. Objetiva-se, em um futuro breve, que os resultados da espectrometria de massas se somem aos resultados experimentais obtidos até então e talvez nos auxiliem a compreender as razões de o CHIKV aparentemente ter uma virulência mais acentuada que o MAYV em células Aag-2. Uma proteína a ser investigada com maiores detalhes, caso seja detectada como fosforilada, é a proibitina. Essa proteína foi encontrada como mais abundante em células Aag-2 em 48 h p.i. tanto com MAYV quanto com CHIKV. Em humanos, a proibitina mitocondrial precisa ser fosforilada para que seja encaminhada à mitocôndria (Jiang et al., 2015). Contudo, ainda não se sabe se esse mecanismo ocorre da mesma forma nos insetos. Além disso, durante a fase de

identificação das proteínas a partir de um banco de dados construído com proteínas de *Ae. aegypti* e proteínas virais, pretende-se adicionar, além de MAYV e CHIKV, proteínas de vírus específicos de insetos que já foram detectadas em infecção persistente em células Aag-2. Assim, poderemos verificar se os resultados obtidos sofreram influência apenas da infecção arboviral ou não. A grande maioria dos estudos voltados para esse aspecto foram realizados com vírus da família Flaviviridae (Fredericks et al., 2019).

Além da fosforilação, uma série de outras modificações pós-tradicionais (PTMs) estão envolvidas na dinâmica de mecanismos para a manutenção da homeostase celular e na defesa antiviral. Outro possível alvo de estudo, por exemplo, são as glicosilações. As partículas infectivas dos alfavírus contam com glicoproteínas na sua composição estrutural. Essas glicoproteínas interagem entre si e com os receptores celulares, mediando o reconhecimento e a internalização das partículas, sendo assim essenciais no processo infectivo (Weaver et al., 2012). Logo, o conhecimento da composição exata desses polímeros, não apenas em relação à superfície viral como também em relação à superfície celular, pode auxiliar no desenvolvimento de antivirais que tenham a entrada dos vírus na célula hospedeira como alvo. A ubiquitinação é outra PTM importante na manutenção de proteínas com enovelamento correto dentro da célula e outros processos, enquanto a acetilação e a metilação de histonas são conhecidas por seu papel na regulação epigenética (Gao e Luo, 2006; Lee et al., 2020). Como já foram relatadas mais de 400 PTMs encontradas nas proteínas, ainda há um longo caminho a ser percorrido para que tenhamos uma compreensão abrangente da influência das PTMs no estabelecimento da infecção viral e na imunidade celular (Ramazi e Zahiri, 2021).

Ainda utilizando a espectrometria de massas, pode-se realizar estudos metabolômicos e lipidômicos na caracterização do ciclo replicativo viral. Os metabólitos celulares são peças importantes para compreender a rota bioquímica que a célula traçou até alcançar determinado estado, enquanto os lipídios são especialmente relevantes para a montagem e o brotamento de vírus envelopados, como MAYV e CHIKV (Tounta et al., 2021; Havranek et al., 2022). Outro exemplo é o estudo de proteínas que se associam a RNAs e ao DNA da célula hospedeira, pois elas também regulam processos como a transcrição e a tradução proteica (Rupp et al., 2015; Ruiz et al., 2019). A espectrometria de massas vem sendo aliada à genômica e à transcriptômica na biologia de sistemas, por exemplo, para fornecer uma visão mais ampla a respeito do objeto de estudo. Como o conhecimento sobre a arbovirologia está em constante

movimento e depende de uma série de fatores bióticos e abióticos, essa tendência de obter uma compreensão global da infecção viral, não limitada a determinados aspectos, parece bastante interessante.

Por fim, vale ressaltar que o estudo de proteínas e enzimas de vias de sinalização de insetos também nos ajuda a estabelecer as diferenças desses processos entre insetos e outros animais. Isso pode auxiliar no desenvolvimento de inseticidas específicos para possíveis alvos exclusivos desses insetos, ou mesmo para uma diversidade menor de organismos, não causando tantos danos ambientais. Entretanto, é importante lembrar que boas práticas operacionais para o uso de inseticidas, como considerar outros produtos químicos usados anteriormente, a persistência dos resíduos ou a alternância das substâncias, por exemplo, são muito importantes para evitar o aparecimento de resistência a curto prazo e reduzir o impacto ambiental (Araújo et al., 2023).

Tendo em vista a diversidade de patógenos transmitidos por mosquitos (vírus, bactérias, protozoários), considera-se que os mosquitos sejam os animais mais letais do planeta (Centers for Disease Control and Prevention, 2023). A Organização Mundial de Saúde estima que 700.000 mortes anualmente sejam decorrentes de doenças transmitidas por mosquitos (Wang e Zhu, 2023). Assim, o combate a essas doenças, seja por meio do patógeno ou por meio do vetor, é foco de muitos governantes e pesquisadores. Os trabalhos apresentados nesta tese fazem parte de uma tentativa de diversos pesquisadores ao redor do mundo de encontrar alvos que sejam relevantes para o estabelecimento da infecção arboviral em seus vetores, sejam eles importantes para a dispersão do vírus ou para a defesa da célula hospedeira. A longo prazo, objetiva-se fornecer conhecimento suficiente para o desenvolvimento de novos mecanismos que possam diminuir a transmissão de arbovírus de diferentes famílias virais, diminuindo, conseqüentemente, o grande número de pessoas afetadas pelas arboviroses todos os anos.

## Referências bibliográficas

- Abdelnabi, R., Delang, L. 2020. Antiviral strategies against arthritogenic alphaviruses. *Microorganisms* 8, 1–18. doi:10.3390/microorganisms8091365.
- Aitken, A. 2011. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Semin Cell Dev Bio*, 22, p. 673-680. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.08.003.
- Albrecht T., Fons M., Boldogh I., et al. 1996. Chapter 44: Effects on cells. Em: Bron, S. Medical Microbiology Fourth Edition. University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN-10: 0-9631172-1-1 PMID: 21413282.
- Allegretti, S., Beaumont, V., Robert-Gangneux, F., et al. 2001. Detection of tyrosine phosphorylated proteins in *Trichinella spiralis* L1 larvae. *Parasite*, 8, S59-S61. doi: 10.1051/parasite/200108s2059.
- Alomar, A., Alto, B. 2022. Temperature-Mediated Effects on Mayaro Virus Vector Competency of Florida *Aedes aegypti* Mosquito Vectors. *Viruses* 14. doi:10.3390/v14050880.
- American Type Culture Collection: *Aedes aegypti* ATC-10. Acessado em 29/02/2024, disponível em <<https://www.atcc.org/products/ccl-125>>.
- Andrade, P., Aragão, F., Colli, W., et al. 2016. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. *Bull World Health Organ*, 94: 766-771. doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.173377>.
- Angleró-Rodríguez, Y., MacLeod, H., Kang, S. 2017. *Aedes aegypti* molecular responses to Zika virus: modulation of infection by the Toll and Jak/STAT immune pathways and virus host factors. *Front Microbiol*, v. 8, 2050. doi: 10.3389/fmicb.2017.02050.
- Annual Arbovirus Bulletin 2022. 2022. Acessado em 08/10/2022, disponível em <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/annual-arbovirus-bulletin-2022.html>>.
- Araújo, M., Castanheira, E., Sousa, S. 2023. The buzz on insecticides: a review of uses, molecular structures, targets, adverse effects, and alternatives. *Molecules*, , 28, 3641. doi: [org/10.3390/molecules28083641](https://doi.org/10.3390/molecules28083641).
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., and Muzio, L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med* 40, 271–280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036.
- Asgarian, T., Vatandoost, H., Hanafi-Bojd, A., et al. 2023. Worldwide status of insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, vector of arboviruses of Chikungunya, Dengue, Zika and Yellow Fever. *J Arthropod-Borne Dis*, , 17(1): 1–27.
- Azar, S., Campos, R., Bergren, N., et al. (2020). Epidemic alphaviruses: ecology, emergence and outbreaks. *Microorganisms* 8, 1–35. doi:10.3390/microorganisms 8081167.
- Backe, S., Sager, R., Heritz, J., et al. 2023. Activation of autophagy depends on Atg1/Ulk1-mediated phosphorylation and inhibition of the Hsp90 chaperone machinery. *Cell Rep*, 42(7):112807. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112807.
- Bakovic, A., Bhalla, N., Kortchak, S., et al. 2020. Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 phosphorylation can be mediated by IKK $\beta$  kinase activity and abrogation of phosphorylation inhibits negative-strand synthesis. *Viruses*, 12:1021. doi: 10.3390/v12091021.
- Bang, I. 2019. JAK / STAT signaling in insect innate immunity. *Entomol Res* 49, 339–353. doi:10.1111/1748-5967.12384.
- Barletta, A., Nascimento-Silva, M, Sorgine, M. 2012. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a

model for insect immune studies. *Parasit Vectors*, 24:5:148. doi: 10.1186/1756-3305-5-148.

- Barletta, A., Nascimento-Silva, M., Talyuli, O., et al. 2017. Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. *Parasites Vectors*, 10:103 DOI: 10.1186/s13071-017-2040-9.
- Behura, S., Haugen, M., Flannery, H., et al. 2011. Comparative genomic analysis of *Drosophila melanogaster* and the vector mosquito developmental genes. *PloS One*, 6(7). doi: 10.1371/journal.pone.0021504.
- Blagrove, M., Barribeau, S. 2021. Immune priming can prevent WNV establishment in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes: evidence for immune priming based reversal of WNV-mediated immune suppression. *bioRxiv*, 2021.05.05.442826.
- Blair, C., Olson, K. 2015. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses* 7, 820–843. doi:10.3390/v7020820.
- Blom N., Sicheritz-Pontén T., Gupta R., et al. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4: 6. 10.1002/pmic.200300771.
- Boletim Epidemiológico nº4 da Secretaria de Saúde do Distrito Federal. 2024. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya, doença aguda pelo vírus zika e febre amarela até a Semana Epidemiológica 04 no Distrito Federal. Ministério da Saúde.
- Borovsky, D., and Van Handel, E. 1980. Synthesis of ovary-specific proteins in mosquitoes. *Int J Invertebr Reprod* 2, 153–163. doi:10.1080/01651269.1980.10553351.
- Bouhaddou, M., Memon, D., Meyer, B., et al. 2020. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell* 182, 685-712.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.06.034.
- Brackney, D., Correa, M., Cozens, D. 2020. The impact of autophagy on arbovirus infection of mosquito cells. *PloS Negl Trop Dis*. doi: 10.1371/journal.pntd.0007754.
- Braga, I., and Valle, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16, 279–293. doi:10.5123/s1679-49742007000400006.
- Brandon, M., Pennington, J., Isoe, J., et al. 2008. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 38(10): 916–922. doi:10.1016/j.ibmb.2008.07.003.
- Castro, A., Lima, R., Nascimento, J. 2016. Chikungunya: vision of the pain clinician. *Rev Dor* 17, 299–302. doi:10.5935/1806-0013.20160093.
- Centers for Disease Control and Prevention: fighting the world’s deadliest animal. Acessado em 05/03/2024, disponível em < <https://www.cdc.gov/globalhealth/stories/2019/world-deadliest-animal.html>>.
- Chen, T., Smartt, T. 2021. Activation of the autophagy pathway decreases dengue virus infection in *Aedes aegypti* cells. *Parasites Vectors*, 14:551. doi: 10.1186/s13071-021-05066-w.
- Cheng, A., Grant, C., Bailey, T., et al. 2018. MoMo: Discovery of statistically significant post-translational modification motifs, *Bioinfo*, 35(16):2774-2782, 2018. 10.1093/bioinformatics/bty1058.
- Cirimotich, C., Scott, J., Phillips, A., et al 2009. Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*, 9:49. doi:10.1186/1471-2180-9-49.
- Conway, M., Colpitts, T., Fikrig, E. 2014. Role of the vector in arbovirus transmission. *Annu Rev Virol* 1, 71–88. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085513.



- Cook S., Moureau G., Kitchen A., et al. 2012. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *J Gen Virol*; 93: 223–234. <https://doi.org/10.1099/vir.0.036525-0>
- Correio Braziliense: Dengue aumenta 646% no DF em relação a 2023, Zika e Chikungunya preocupam. Acessado em 29/01/2024, disponível em <<https://www.correiobraziliense.com.br/cidades-df/2024/01/6791568-dengue-aumenta-646-no-df-em-relacao-a-2023-zika-e-chikungunya-preocupam.html>>.
- Cox, J., Mann, M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotech* 26, 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511.
- Cuccuru, G., Lanzi, C., Cassinelli, G., et al. 2004. Cellular Effects and Antitumor Activity of RET Inhibitor RPI-1 on MEN2A-Associated Medullary Thyroid Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, vol. 96, n. 13. doi: 10.1093/jnci/djh184.
- Cui, Y., Liu, P., Mooney, B., et al. 2020. Quantitative proteomic analysis of chikungunya virus-infected *Aedes aegypti* reveals proteome modulations indicative of persistent infection. *J Proteome Res*, 19(6): 2443–2456. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00173.
- Dapic, I., Uwugiaren, N., Jansen, P., Corthals, G. 2017. Fast and Simple Protocols for Mass Spectrometry-Based Proteomics of Small Fresh Frozen Uterine Tissue Sections. *Anal Chem* 89, 10769–10775. doi:10.1021/acs.analchem.7b01937.
- Das, I., Basantray, I., Mamidi, P., et al. 2014. Heat Shock Protein 90 Positively Regulates Chikungunya Virus Replication by Stabilizing Viral Non-Structural Protein nsP2 during Infection. *PloS One*, 9(6): e100531. doi:10.1371/journal.pone.0100531.
- Dégallier, N., Travassos da Rosa, A., Vasconcelos, P., et al. 1998. Evolutionary aspects of the ecology of arboviruses in Brazilian Amazonia, South America. *Inst Evandro Chagas*, 107–112.
- Deshmukh, L., Meller, N., Alder, N., et al. 2011. Tyrosine phosphorylation as a conformational switch. *J Biol Chem*, vol. 286, 47, p. 40943–40953.
- Donalisio, M., Freitas, A., and Zuben, A. 2017. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev Saúde Pública* 51, 10–15. doi:10.1590/S1518-8787.2017051006889.
- Dong, Y., Dong, S., Dijazi, N., et al. 2022. The *Aedes aegypti* siRNA pathway mediates broad-spectrum defense against human pathogenic viruses and modulates antibacterial and antifungal defenses. *PLoS Biol*, 20(6): e3001668. Doi: 10.1371/journal.pbio.3001668.
- Dudley, E., and Bond, A. 2014. Phosphoproteomic techniques and applications. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800453-1.00002-6.
- Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J., et al. 2019. How viral and intracellular bacterial pathogens reprogram the metabolism of host cells to allow their intracellular replication. *Front Cell Infect Microbiol* 9. doi:10.3389/fcimb.2019.00042.
- Espinal, M., Andrus, J., Jauregui, B., et al. 2019. Emerging and Reemerging *Aedes*-Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. *AJPH Perspec*, vol. 109, n.3. doi: 10.2105/AJPH.2018.304849.
- Feng, M., Fei, S., Xia, J., et al. 2020. Antimicrobial peptides as potential antiviral factors in insect antiviral immune response. *Front Immunol*, v. 11. 2030. doi: 10.3389/fimmu.2020.02030.
- Ferrandon, D., Imler, J., Hetru, C., et al. 2007. *The Drosophila* systemic immune response: sensing

and signalling during bacterial and and fungal infections. *Nat Rev*. doi:10.1038/nri2194.

- Figueiredo, L. 2017. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. *Rev Soc Bras Med Trop* 50, 583–584. doi:10.1590/0037-8682-0397-2017.
- Forattini, O. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus (skuse)* no Brasil. *Rev Saú Públ*, 20 (3)244-5.
- Fragkoudis, R., Chi, Y., Siu, R., et al. 2008. Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling. *Insect Mol Biol* 17, 647–656. doi:10.1111/j.1365-2583.2008.00834.x.
- Franz, A., Kantor, A., Passarelli, A., et al. 2015. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses* 7, 3741–3767. doi:10.3390/v7072795.
- Franzke K., Leggewie M., Sreenu V., et al. 2018. Detection, infection dynamics and small RNA response against Culex Y virus in mosquito-derived cells. *J Gen Virol*;99: 1739–1745. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001173>.
- Fredericks A., Russell T., Wallace L., et al. 2019. *Aedes aegypti* (Aag2)-derived clonal mosquito cell lines reveal the effects of pre-existing persistent infection with the insect-specific bunyavirus Phasi Charoen-like virus on arbovirus replication. *PLoS Negl Trop Dis* 13(11): e0007346. doi: 10.1371/journal.pntd.0007346.
- Fu, H., Subramanian, R., Masters, S. 2000. 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40:617–47.
- g1 Acre: Seis cidades do Acre têm casos de infecção pelos vírus Oropouche e Mayaro; saiba os sintomas. 2023. Acessado em 20/02/2024, disponível em < <https://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2023/11/28/seis-cidades-do-acre-tem-casos-de-infeccoes-pelos-virus-oropouche-e-mayaro-saiba-os-sintomas.ghtml>>.
- g1 Amazonas: Amazonas registra quase 200 casos de febre do Mayaro e Oropouche em pouco mais um mês, aponta FVS. 2024a. Acessado em 20/02/2024, disponível em < <https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2024/01/08/amazonas-registra-quase-200-casos-de-febre-do-mayaro-e-oropouche-em-pouco-mais-de-um-mes-aponta-fvs.ghtml>>.
- g1 Distrito Federal: Chikungunya: casos prováveis no DF crescem 229% na comparação entre janeiro de 2023 e janeiro de 2024. 2024. Acessado em 20/02/2024, disponível em < <https://g1.globo.com/df/distrito-federal/noticia/2024/02/18/chikungunya-casos-provaveis-no-df-crescem-229percent-na-comparacao-entre-janeiro-de-2023-e-de-2024.ghtml>>.
- g1 Mato Grosso: Município do MT decreta situação de emergência pós mais de mil casos de dengue e chikungunya. 2024. Acessado em 20/02/2024, disponível em < <https://g1.globo.com/mt/mato-grosso/noticia/2024/02/09/municipio-de-mt-decreta-situacao-de-emergencia-apos-mais-de-mil-casos-de-dengue-e-chikungunya.ghtml>>.
- Gao, G., Luo, H. 2006. The ubiquitin–proteasome pathway in viral infections. *Can J Physiol Pharmacol*, 84: 5–14.
- Gelderblom, H. 1996. “Structure and classification of viruses,” in *Medical Microbiology*, ed. S. Baron (University of Texas Medical Branch at Galveston). Acessado em 28/05/2022, disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8174/>>.
- Gliedman, J., Smith, J., Brown, D. 1975. Morphogenesis of Sindbis virus in three subclones of *Aedes albopictus* cells. *J Virol* 16, 913–926. doi:10.1128/jvi.66.7.4180-4190.1992.
- Gylfe, A., Ribers, A., Forsman, O., et al. 2018. Mosquito-borne Sindbis virus infection and long-term illness. *Emerg Infect Dis*, 24:6. doi: 10.3201/eid2406.170892.
- Handy, D., Castro, R., Loscalzo, J. 2011. Epigenetic modifications: Basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* 123, 2145–2156. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839.

- Hansen, I., Attardo, G., Roy, S., and Raikhel, A. 2005. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. *J Biol Chem* 280, 20565–20572. doi:10.1074/jbc.M500712200.
- Hansen, I., Attardo, G., Park, J., et al. 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *PNAS*, vol. 101, n. 9. doi: 10.1073/pnas.0403460101.
- Harrington, L., Edman, J., Scott, T. 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J Med Entomol* 38, 411–422. doi:10.1603/0022-2585-38.3.411.
- Harrison, D. 2012. The JAK/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012;4:a011205. 10.1101/cshperspect.a011205.
- Havranek, K., Ballista, J., Hines, K., et al. 2022. Untargeted Lipidomics of Vesicular Stomatitis Virus-Infected Cells and Viral Particles. *Viruses*, 14, 3. doi: 10.3390/v14010003.
- Hidari, A., Suzuki, T. 2011. Dengue virus receptor. *Trop Med Health*, vol. 39, n. 4. doi:10.2149/tmh.2011-S03.
- Huang, Y., Higgs, S., Vanlandingham, D. 2019. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Front Microbiol* 10, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2019.00022.
- Humphrey, S., James, D., Mann, M. 2015. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. *TEM*, vol. 26, 12, p. 676-687. doi: 10.1016/j.tem.2015.09.013.
- Hunter, T. 2014. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014;6:a020644. doi: 10.1101/cshperspect.a020644.
- Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em < <https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html#:~:text=Em%201955%2C%20o%20Brasil%20erradicou,em%20todos%20os%20Estados%20brasileiros.>>, acessado em 23/11/2023.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., et al. 2010. Hsc70/HSP90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell*, 39. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.015.
- Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P. 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol*, Vol. 9(3–4): 90–100. doi: 10.1515/intox-2016-0012.
- Jiang, L., Dong, P., Zhang, Z., et al. 2015 . Akt phosphorylates Prohibitin 1 to mediate its mitochondrial localization and promote proliferation of bladder cancer cells.. *Cell Death Dis*, 6. doi: 10.1038/cddis.2015.40.
- Johnson, L., Lewis, R. 2001. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev*, 101, 2209–2242. doi: 10.1021/cr000225s.
- Jorge, M., Souza, A., Passos, R., Martelli, S., Rech, C., Barufatti, A., et al. 2019. “The Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus): The Breeding Sites,” in Life cycle and development of *Diptera* (Open Intech), 1–21. doi:dx.doi.org/10.5772/intechopen.88852.
- Joubert, P., Werneke, S., Calle, C., et al. 2012. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J Exp Med*, vol. 209, n. 5 1029-1047. doi: 10.1084/jem.20110996.
- Joubert, P., Stapleford, K., Guivel-Benhassine, F. 2015. Inhibition of mTORC1 Enhances the Translation of Chikungunya Proteins via the Activation of the MnK/eIF4E Pathway. *PloS Pathog*, 11(8): e1005091. doi:10.1371/journal.ppat.1005091.
- Jupatanakul, N., Sim, S., Angleró-Rodríguez, Y., et al. 2017. Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT

pathway-mediated immunity to Dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(1): e0005187. doi: 10.1371/journal.pntd.0005187.

- Kandel, Y., Pinch, M., Lamsal, M., et al. 2022. Exploratory phosphoproteomics profiling of *Aedes aegypti* Malpighian tubules during blood meal processing reveals dramatic transition in function. *PLoS One* 17, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0271248.
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. 2016. BlastJOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol*, 418(4). doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006.
- Kantor, I. (2016). Dengue, Zika y chikungunya. *Medicina*, vol.76, n.2, pp.93-97. ISSN 0025-7680.
- Keating, J., Bhattacharya, D., Rund, S., et al. 2013. Mosquito protein kinase g phosphorylates flavivirus ns5 and alters flight behavior in *Aedes Aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 13, 590–600. doi:10.1089/vbz.2012.1110.
- Kingsolver, M., Huang, Z., Hardy, R. 2013. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors and connections. *J Mol Biol*, 425(24): 4921–4936. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.006.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., et al. 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, 17(6):675-89. doi: 10.1016/j.cellsig. 2004.12.011.
- Lan Q., Fallon M. 1990. Small heat shock proteins distinguish between two mosquito species and confirm identity of their cell lines. *Am J Trop Med Hyg*; 43: 669–676. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.669>
- Le Sage, V., Cinti, A., Amorim, R., et al. 2016. Adapting the Stress Response: Viral Subversion of the mTOR Signaling Pathway. *Viruses*, 8, 152. doi:10.3390/v8060152.
- Lee, H., Oh, S., Ro, D., et al. 2020. The Key Role of DNA Methylation and Histone Acetylation in Epigenetics of Atherosclerosis. *J Lipid Atheroscler*, 9(3):419-434. doi: 10.12997/jla.2020.9.3.419.
- Lee, W., Webster, A., Madzokere, E., et al. 2019. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasit Vectors*, 12:165 doi: 10.1186/s13071-019-3433-8.
- Li, G., La Starza M., Hardy W., et al. 1990. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virol*, 179:416–427. doi: 10.1016/0042-6822(90)90310-N.
- Lin, W., Iversen, L., Tu, H., et al. 2014. H-Ras forms dimers on membrane surfaces via a protein - Protein interface. *PNAS* 111, 2996–3001. doi:10.1073/pnas.1321155111.
- Liu, B., Qin, F., Liu, W., et al. 2016. Differential proteomics profiling of the ova between healthy and Rice stripe virus-infected female insects of *Laodelphax striatellus*. *Sci Rep* 6, 1–12. doi:10.1038/srep27216.
- Liu, B., Zhang, Y., Ren, H., et al. 2023. mTOR signaling regulates Zika virus replication bidirectionally through autophagy and protein translation. *J Med Virol*, e28422. doi: 10.1002/jmv.28422.
- Liu, W., Chen, S., Bai, H., et al. 2020. The Ras/ERK signaling pathway couples antimicrobial peptides to mediate resistance to dengue virus in *Aedes* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(8): e0008660. doi: 10.1371/journal.pntd.0008660.
- Liu, Y., Fu, C., Ye, S., et al. 2020. Phosphoproteomics to Characterize Host Response During H3N2 Canine Influenza Virus Infection of Dog Lung. *Front Vet Sci* 7, 1–15. doi:10.3389/fvets.2020.585071.
- Lopes, N., Nozawa, C., Linhares, R. 2014. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde* 5, 55–64. doi:10.5123/s2176-62232014000300007.
- Lopez, S., Guimarães-Ribeiro, V., Rodriguez, J., et al. 2019. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes*

mosquito control. *Sci Rep*, 9:4038 . doi: 10.1038/s41598-019-39666-5.

- Louten, J. 2016. Virus Transmission and Epidemiology, in *Essential Human Virology (Academic Press)*, 71–92. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00005-3>.
- Lovisolo, O., Hull, R., Rösler, O. 2003. Coevolution of Viruses with Hosts and Vectors and Possible Paleontology. *Adv Virus Res* 62, 325–379. doi:10.1016/S0065-3527(03)62006-3.
- Luo W., Brouwer C. 2013. PathView: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinfo*, 29:14. doi: 10.1093/bioinformatics/btt285.
- Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Patramool, D., Dumas, E., Wasinpiyamongkol, L., Saune, L., et al. 2011. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog* 7. doi:10.1371/journal.ppat.1001252.
- Madewell, Z. 2020. Arboviruses and Their Vectors. *SMJ* 113, 520–523. doi:10.14423/SMJ.0000000000001152.
- Magalhaes, T., Bergren, N., Bennett, S., et al. 2019. Induction of RNA interference to block Zika virus replication and transmission in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, doi: 10.1016/j.ibmb.2019.05.004.
- Maringer K., Yousuf A., Heesom K., et al. 2017. Proteomics informed by transcriptomics for characterising active transposable elements and genome annotation in *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*; 18: 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3406-7>.
- Maringer, K. 2023. Re-evaluating the mosquito RNAi pathway’s influence on arbovirus transmission. *Trends Parasitol*, Vol. 39. doi: 10.1016/j.pt.2023.09.005.
- McBride, C., Baier, F., Omondi, A., et al. 2014. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature* 515, 222–227. doi:10.1038/nature13964.
- McCance, K., and Huether, S. 2014. Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children. 7th ed. , eds. V. Brashers and N. Rote Elsevier.
- McFarlane, M., Arias-Goeta, C., Martin, E., et al. (2014). Characterization of *Aedes aegypti* Innate-Immune Pathways that Limit Chikungunya Virus Replication. *PLoS Negl Trop Dis* 8, 1–11. doi:10.1371/journal.pntd.0002994.
- Menon, P., Yin, G., Smolock, E., et al. 2010. GPCR kinase 2 interacting protein 1 (GIT1) regulates osteoclast function and bone mass. *J Cell Physiol*, 225(3): 777–785. doi:10.1002/jcp.22282.
- Menozzi, P., Shi, M., Lougarre, A., et al. 2004. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol*, 4:4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/4/4>.
- Mercier, T., Bouvet, M., Dubois-Deruy, E., et al. 2018. Interplay Between Phosphorylation and O-GlcNAcylation of Sarcomeric Proteins in Ischemic Heart Failure. *Front Endocrinol*, vol. 9. doi: 10.3389/fendo.2018.00598.
- Merklingsh, van Rij R. 2013. Beyond RNAi: Antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *J Insect Physiol*; 59: 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.004>.
- Mihaylova, M., Shaw, R. 2012. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 13(9): 1016–1023. doi:10.1038/ncb2329.
- Monteiro, F., Mourão, F., Ribeiro, E., et al. 2020. Prevalence of dengue, zika and chikungunya viruses in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (diptera: Culicidae) in a medium-sized city, Amazon, Brazil. *Rev Inst Med Trop SP* 62, 1–6. doi:10.1590/s1678-9946202062010.

- Morazzani E., Wiley M., Murreddu M, et al. 2012. Production of virus-derived pingpong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathog*; 8: e1002470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002470>.
- Moreira, L., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J., et al. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya and *Plasmodium*. *Cell*, 139, 1268–1278. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042.
- Moser, T., Schieffer, D., Cherry, S. 2012. AMP-activated kinase restricts Rift Valley Fever Virus infection by inhibiting fatty acids synthesis. *PloS Pathog*, 8(4): e1002661. doi:10.1371/journal.ppat.1002661.
- Mourão, M., Bastos, M., Figueiredo, R., et al. 2012. Mayaro fever in the city of Manaus – Brazil, 2007-2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12:1. doi: 10.1089/vbz.2011.0669.
- Muralidharan, S., and Mandrekar, P. 2013. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc. Biol* 94, 1167–1184. doi:10.1189/jlb.0313153.
- National Pesticide Information Center. Deltamethrin: technical fact sheet. Acessado em 24/01/2024, disponível em <<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/Deltatech.html#:~:text=Mode%20of%20Action%3A&text=Deltamethrin%20is%20effective%20against%20insects%20via%20ingestion%20and%20direct%20contac.&text=Pyrethroids%2C%20in%20general%2C%20interfere%20with,for%20the%20sodium%20ion%20channel>>.
- Niger, C., Hebert, C., Stains, J. Interaction of connexin43 and protein kinase C-delta during FGF2 signaling. *BMC Biochem*, 11:14. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/11/14>.
- Nishi, H., Shaytan, A., Panchenko, A. 2014. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet.* 5, 1–10. doi:10.3389/fgene.2014.00270.
- Nunes, M., Faria, N., de Vasconcelos, J., Golding, N., Kraemer, M., de Oliveira, L., et al. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 13. doi:10.1186/s12916-015-0348-x.
- Oliveira Mota, M., Ribeiro, M., Vedovello, D., Nogueira, M. 2015. Mayaro virus: A neglected arbovirus of the Americas. *Futur. Virol* 10, 1109–1122. doi:10.2217/fvl.15.76.
- Oliveira Mota, M., Terzian, A., Silva, M., et al 2016. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. *Braz J Microbiol* 47, 38–50. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.008.
- Olivia, L., Obanda, V., Bucht, G., et al. 2015. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. *Infec Ecol Epidemiol* 5. doi:10.3402/IEE.V5.29853.
- Ong, S. 2021. *Wolbachia* goes to work in the war on mosquitoes. *Nature Infect Dis index*, Vol 598.
- Oyama, T., Mitsudomi, T., Mizoue, T., et al. 1995. Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 4, 83–89. doi:10.1016/S0960-7404(10)80011-8.
- Parry R., Asgari S. 2018 *Aedes anphevirus* (AeAV): an insect-specific virus distributed worldwide in *Aedes aegypti* mosquitoes that has complex interplays with *Wolbachia* and dengue virus infection in cells. *J Virol*; 92:e00224–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00224-18>.
- Paez-Espino, D., Zhou, J., Roux, S., et al. 2019. Diversity, Evolution, and classification of virophages uncovered through global metagenomics. *Microbiome*, 7:57. doi: 10.1186/s40168-019-0768-5.
- Pascoe, L., Clemen, T., Bradshaw, K., et al. 2022. Review of importance of weather and environmental variables in agent-based arbovirus models. *IJERPH.* 19, 15578. doi: 10.3390/ijerph192315578.
- Peleg J. 1968. Growth of arboviruses in primary cell culture of *Aedes aegypti* embryos. *Am J Trop*

*Med*, 17:2. doi: 10.4269/ajtmh.1968.17.219.

- Peranen, J., Takkinen, K., Kalkkinen, N., et al. 1988. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J Gen Virol*, 69:2165–2178. doi: 10.1099/0022-1317-69-9-2165.
- Pereira Serra, O., Fernandes Cardoso, B., Maria Ribeiro, A., et al. 2016. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111, 20–29. doi:10.1590/0074-02760150270.
- Peuchen, E., Sun, L., Dovichi, N. 2016. Optimization and comparison of bottom- up proteomic sample preparation for early-stage *Xenopus laevis* embryos. *Anal Bioanal Chem* 408, 4743–4749. doi:10.1007/s00216-016-9564-2.
- Pinheiro, F., Freitas, R., Travassos da Rosa, J., et al. 1981. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *Am J Trop Med Hyg*. doi:10.4269/ajtmh.1981.30.674.
- Ponnaiyan, S., Akter, F., Singh, J., et al. 2020. Comprehensive draft of the mouse embryonic fibroblast lysosomal proteome by mass spectrometry based proteomics. *Sci Data* 7, 1–13. doi:10.1038/s41597-020-0399-5.
- Portal do Butantan: Casos de chikungunya aumentam 78% em 2022 e a incidência sobe a partir de janeiro; adolescentes podem participar do estudo da vacina. Acessado em 20/02/2024, disponível em <<https://butantan.gov.br/noticias/casos-de-chikungunya-aumentam-78-em-2022-e-incidencia-sobe-a-partir-de-janeiro--adolescentes-podem-participar-do-estudo-da-vacina>>.
- Powers, A., Huang, H., Roehrig, J., et al. 2012. Family - Togaviridae .Em: King, M., Adams, M., Carstens, E., et al. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* . Elsevier, p. 1103-1110. ISBN 9780123846846, doi: 10.1016/B978-0-12-384684-6.00095-1.
- Prince, B., Walsh, E., Torres, T., et al. 2023. Recognition of arboviruses by the mosquito immune system. *Biomolecules*, 13, 1159. doi: 10.3390/biom13071159.
- Ramazi, S., Zahiri, J. 2021. Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. *Database* 2021, 1–20. doi:10.1093/database/baab012.
- Rathnayake, L., Northrup, S. 2016. Structure and mode on action of organophosphate pesticides: a computational study. *Comput Theor Chem*. doi: 10.1016/j.comptc.2016.04.024.
- Rawlings, J., Rosler, K., Harrison, D. 2004. The JSK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, 117, 1281-1283. doi: 10.1242/jcs.00963.
- Resnik, D. 2014. Ethical issues in field trials of genetically modified disease-resistant mosquitoes. *Dev World Bioeth*, 14(1). doi: 10.1111/dewb.12011.
- Rovozzo, G., Burke, C. 1973. “A manual of basic virological techniques,” in *Biological Techniques series*, ed. A. Hollander (Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall Inc).
- Rubio, M., Geraghty, K., Wong, B., et al. 2004. 14-3-3 affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism , proliferation and trafficking. *Biochem J*, 379, 395–408.
- Ruiz, J., Yerbanga, R., Lefèvre, T., et al. 2019. Chromatin changes in *Anopheles gambiae* induced by Plasmodium falciparum infection. *Epigenetics Chromatin*, 12:5. doi: 10.1186/s13072-018-0250-9.
- Rupp, J., Sokoloski, K., Gebhart, N., et al. 2015. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol* 96, 2483–2500. doi:10.1099/jgv.0.000249.
- Sager, R., Backe, S., Neckers, L., et al. 2023. Detecting post-translational modifications of Hsp90

isoforms. *Methods Mol Biol*, 2693: 125–139. doi:10.1007/978-1-0716-3342-7\_11.

- Samuel, G., Pohlenz, T., Dong, Y., et al. 2023. RNA interference is essential to modulating the pathogenesis of mosquito-borne viruses in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *PNAS*, Vol. 120, No. 11, e2213701120. doi: 10.1073/pnas.2213701120.
- Sanders, H., Foy, B., Evans, A., et al. 2005. Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immune pathway genes in the midgut of disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 35, 1293–1307. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.07.006.
- Savage, S., Zhang, B. 2020. Using phosphoproteomics data to understand cellular signaling: A comprehensive guide to bioinformatics resources. *Clin Proteom* 17, 1–18. doi:10.1186/s12014-020-09290-x.
- Sayers W., Bolton E., Brister J., et al. 2022. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 50(D1): D20–D26. doi: 10.1093/nar/gkab1112.
- Schneider, C., Rasband, W., Eliceiri, K. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
- Severson, D., De Bruyn, B., Lovin, D., et al. 2004. Comparative genome analysis of the Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* with *Drosophila melanogaster* and the Malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *J Hered*, 95(2):103–113. doi: 10.1093/jhered/esh023.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., et al. 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. *Genome Res* 13, 2948–2504. doi:10.1101/gr.1239303.metabolite.
- Sheehan, G., Farrell, G., Kavanagh, K. 2020. Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence* 11, 238–246. doi:10.1080/21505594.2020.1731137.
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., et al. 2009. Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against Vesicular Stomatitis virus. *Immunity*, 30, 588–598. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.009.
- Shi, Y., Zhang, Y., Lin, S. 2020. dbPSP2.0, an updated database of protein phosphorylation sites in eukaryotes. *Sci Data*, 7:164. doi: 10.1038/s41597-020-0506-7.
- Shobahah, J., Xue, S., Hu, D., et al. 201. Quantitative phosphoproteome on the silkworm (*Bombyx mori*) cells infected with baculovirus. *Virol J* 14, 1–14. doi:10.1186/s12985-017-0783-8.
- Silva, M., Lugão, P., Prezoto, F., et al. 2022. Modeling the impact of genetically modified male mosquitoes in the spatial population dynamics of *Aedes aegypti*. *Sci Rep*, 12:9112. doi: 10.1038/s41598-022-12764-7.
- Silwal, P., Kim, J., Yuk, J., et al. 2018. AMP-activated protein kinase and host defense against infection. *Int J Mol Sci*, 19, 3495. doi:10.3390/ijms19113495.
- Slatko, B., Luck, A., Dobson, S., et al. 2014. *Wolbachia* endosymbionts and human disease control. *Mol Biochem Parasitol*, 195, 88-95. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.07.004.
- Smith, L., Kelleher, N., The Consortium of Top Down Proteomics. 2013. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods*, 10(3): 186–187. doi: 10.1038/nmeth.2369.
- Smith, N., Chan, G., O'Connor, C. 2021. Modulation of host cell signaling during cytomegalovirus latency and reactivation. *Virol J* 18, 1–17. doi:10.1186/s12985-021-01674-1.
- Sokoloski, K., Snyder, A., Liu, N., et al. 2013. Encapsidation of Host-Derived Factors Correlates with Enhanced Infectivity of Sindbis Virus. *J Virol* 87, 12216–12226. doi:10.1128/jvi.02437-13.
- Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M. 2017. DENV upregulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation: a potential antiviral target. *PLoS Pathog*, 13(4): e1006257. doi:10.1371/journal.ppat.1006257.
- Stokes, B., Yadav, S., Shokal, U., et al. 2015. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front Microbiol* 6, 1–12.



doi:10.3389/fmicb.2015.00019.

- Summers, W. (2009). Virus Infection. Em: Encyclopedia of Microbiology, Third Edition. *Elsevier*.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., et al. 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 43. doi: 10.1093/nar/gku1003.
- Taus, T., Köcher, T., Pichler, P., et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J Proteome Res*, 10(12):5354-62. doi: 10.1021/pr200611n.
- Teppor, M., Zusinaite, E., Mertis, A. 2021. Phosphorylation sites in the hipervariable domain in Chikungunya virus nsP3 are crucial for viral replication. *J Virol*, 95:9. doi: 10.1128/JVI.02276-20.
- Thaa, B., Biasotto, R., Eng, K., et al. 2015. Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and Chikungunya Viruses Is Dependent on nsP3 and Connected to Replication Complex Internalization. *J Virol*, 89:11420 –11437. doi:10.1128/JVI.01579-15.
- Thaker, S., Chapa, T., Garcia, G., et al. 2019. Differential metabolic reprogramming of Zika virus promotes cell death in human versus mosquito cells. *Cell Metab*, 29, 1206–1216. doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.024.
- The world population prospects: 2015 revision. 2015. Acessado em 18/09/22, disponível em <<https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-2015-revision.html>>.
- Thuy, T. 2015. Effects of DDT on environment and human health. *J Soc Sci Edu*, Vol. 2, ISSN 2289-9855.
- Thike, C., Dimopoulos, G. 2021. Mosquito antiviral immune pathways. *Dev Comp Immunol*, Vol. 116, 103964. doi: 10.1016/j.dci.2020.103964.
- Tounta, V., Liu, Y., Cheyne, A., et al. 2021. Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. *Mol Omics*, 1; 17(3): 376–393. doi: 10.1039/d1mo00017a.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M., Geiger, T., et al. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13, 731–740. doi:10.1038/nmeth.3901.
- Utarini, A., Indriani, C., Ahmad, R., et al. 2021. Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. *NEJM* 384, 2177–2186. doi:10.1056/nejmoa2030243.
- Valle, D., Bellinato, D., Viana-Medeiros, P., et al. 2019. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 114, 1–17. doi:10.1590/0074-02760180544.
- Vargas, L., Ferreira, S., Souza, M., et al. 2022. Resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle: estado da arte do conhecimento. *Rev Ciên Méd Biol*, v. 21, n. 1, p. 98-116. doi: 10.9771/cmbio.v21i1.44458.
- Vargas, V., Cime-Castillo, J., Lanz-Mendoza, H. 2020. Immune priming with inactive dengue virus during the larval stage of *Aedes aegypti* protects against the infection in adult mosquitoes. *Sci Rep* 10, 1–10. doi:10.1038/s41598-020-63402-z.
- Vasconcellos, A. F., Mandacaru, S. C., De Oliveira, et al. 2020. Dynamic proteomic analysis of *Aedes aegypti* Aag-2 cells infected with Mayaro virus. *Parasit Vectors* 13, 1–12. doi:10.1186/s13071-020-04167-2.

- Vasconcellos, A., Melo, R., Mandacaru, S., et al. 2022. *Aedes aegypti* Aag-2 Cell Proteome Modulation in Response to Chikungunya Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 1–15. doi:10.3389/fcimb.2022.920425.
- Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A., Failloux, A. 2021. Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Front Microbiol* 12, 1–24. doi:10.3389/fmicb.2021.773211.
- Viljakainen, L. 2015. Evolutionary genetics of insect innate immunity. *Brief Funct Genomics*, 14(6), 407–412. doi: 10.1093/bfgp/elv002.
- Villanueva, R., Rouillé, Y., and Dubuisson, J. 2005. Interactions between virus proteins and host cell membranes during the viral life cycle. *Int Rev Cytol* 245, 171–244. doi:10.1016/S0074-7696(05)45006-8.
- Villatte, F., Ziliani, P., Marcel, V., et al. 2000. A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insect resistance. *Pestic Biochem Physiol*, V. 67: 2, 5-102. Doi: 10.1006/pest.2000.2478.
- Vogel, C., Marcotte, E. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Gen* 13, 227–232. doi:10.1038/nrg3185.
- Walker, T., Jeffries, C., Mansfield, K, et al. 2014. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasit Vectors*, 20:7:382. doi: 10.1186/1756-3305-7-382.
- Wang, J., Zhu, Z. 2023. Novel paradigm of mosquito-borne disease control based on self-powered strategy. *Front Public Health*, 11. doi: 10.3389/fpubh.2023.1115000.
- Weaver, S. 2013. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol*, 21(8): 360–363. doi:10.1016/j.tim.2013.03.003.
- Weaver, S., Winegar, R., Manger, I., et al. 2012. Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antivir. Res*, 94, 242–257. doi:10.1016/j.antiviral.2012.04.002.
- White, L., Sali, T., Alvarado, D., et al. 2011. Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *J Virol*, p. 606–620. doi: 10.1128/JVI.00767-10.
- Williams, A., Sanchez-Vargas, I., Reid, W., et al. 2020. The antiviral small-RNA interfering pathway induces Zika virus resistance in transgenic *Aedes aegypti*. *Viruses*, 12, 1231. doi:10.3390/v12111231.
- Wintachai, O., Wikan, N., Kuadkitkan, et al. 2012. Identification of prohibiyin as a Chikungunya virus receptor protein. *J Med Virol*. 84:1757–1770, 2012. Wiley Periodicals Inc. doi: 10.1002/jmv.23403.
- World Health Organization: Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases. 1985. Acessado em 11/10/2022, disponível em <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/39922>>.
- World Health Organization: Launch of the global Arbovirus initiative. 2022. Acessado em 25/07/2022, disponível em <<https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/03/31/default-calendar/global-arbo-virus-initiative>>.
- Xi, Z., Ramirez, J. L., Dimopoulos, G. 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 4. doi:10.1371/journal.ppat.1000098.
- Xu, J., Hopkins, K., Sabin, L., et al. 2013. ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut. *PNAS*, vol. 110, n. 37, 1525-15030. doi: 10.1073/pnas.1303193110.
- Yun, T., Hua, J., Ye, W., et al. 2020. The phosphoproteomic responses of duck (*Cairna moschata*) to classical/novel duck reovirus infections in the spleen tissue. *Sci Rep* 10, 1–13. doi:10.1038/s41598-020-72311-0.

- Zaid, A., Burt, F., Liu, X., et al. 2021. Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. *Lancet Infect Dis* 21, e123–e133. doi:10.1016/S1473-3099(20)30491-6.
- Zhang R., Zhu Y., Pang X., et al. 2017. Regulation of Antimicrobial Peptides in *Aedes aegypti* Aag2 Cells. *Front Cell Infect Microbiol*; 7: 22. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00022>.
- Zhou, J., Zhao, S., Dunker, A. 2018. Intrinsically disordered proteins link alternative splicing and post-translational modifications to complex cell signaling and regulation. *J Mol Biol*, 430, 2342–2359. doi: 10.1016/j.jmb.2018.03.028.
- Zink, S., van Slyke, G., Palumbo, M., et al. 2015. Exposure to West Nile virus increases bacterial diversity and immune gene expression in *Culex pipiens*. *Viruses* 7, 5619–5631. doi:10.3390/v7102886.

## Lista de figuras

Página 11. **Figura 1.1.** Diversidade de formas e tamanhos de vírus que causam doenças de em humanos.

Página 13. **Figura 1.2.** Partícula viral e genoma de um alfavírus.

Página 14. **Figura 1.3.** Árvore filogenética das espécies de alfavírus.

Página 16. **Figura 1.4.** Distribuição mundial das principais epidemias causadas por alguns alfavírus, como CHIKV e MAYV, assim como os seus principais vetores.

Página 19. **Figura 1.5.** Características morfológicas do vetor viral *Aedes aegypti*.

Página 20. **Figura 1.6.** Mapa de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* resistentes ao inseticida DDT entre as populações estudadas por Asgarian et al. (2023).

Página 21. **Figura 1.7.** Componentes do sistema nervoso que são alvos de alguns inseticidas.

Página 24. **Figura 1.8.** Estágios do mecanismo de silenciamento gênico mediado pelo complexo proteico RISC.

Página 27. **Figura 1.9.** Modelo hipotético de uma via de transdução de sinal.

Página 29. **Figura 1.10.** Representação esquemática dos componentes das três vias de transdução de sinais mais importantes para a defesa antiviral em mosquitos.

Página 31. **Figura 1.11.** Exemplos de modificações pós-traducionais que uma proteína pode sofrer, aumentando consideravelmente a complexidade de um proteoma.

Página 32. **Figura 1.12.** Mecanismos moleculares da fosforilação e da defosforilação de

proteínas.

Página 33. **Figura 1.13.** Possíveis consequências moleculares da fosforilação de proteínas.

Página 56. **Figura 3.1.** Metas do estudo proposto no Capítulo 3.

Página 59. **Figura 3.2.** Preparo do material biológico e estabelecimento das condições que foram utilizadas na infecção de células Aag-2 para fosfoproteômica.

Página 60. **Figura 3.3.** Desenho experimental das infecções de células Aag-2 de *Aedes aegypti* com MAYV e CHIKV em quadruplicatas biológicas, com seus pontos de coleta em horas pós-infecção.

Página 64. **Figura 3.4.** Pontos principais da metodologia para o estudo do fosfoproteoma de células Aag-2 infectadas com MAYV e CHIKV, após a obtenção das amostras biológicas.

Página 65. **Figura 3.5.** Metodologia e resultados da predição *in silico* de proteínas fosforiladas de *Aedes aegypti* a partir de cinco organismos modelo.

Página 66. **Figura 3.6.** Diagrama de Venn com as 433 fosfoproteínas anotadas dos cinco organismos modelo que têm > 50% de cobertura e > 50% de identidade com as fosfoproteínas preditas de *Aedes aegypti*.

Página 69. **Figura 3.7.** Via de sinalização MAPK (em moscas) enriquecida por homologia a partir das fosfoproteínas preditas de *Aedes aegypti* por meio do PathView.

Página 70. **Figura 3.8.** Via de sinalização da autofagia (em animais) enriquecida por homologia a partir das fosfoproteínas preditas de *Aedes aegypti* por meio do PathView.

Página 71. **Figura 3.9.** Mapa de IPPs das proteínas de *Aedes aegypti* fosforiladas preditas por homologia.

Página 73. **Figura 3.10.** Microscopia óptica da cinética de crescimento de MAYV e CHIKV em células Aag-2 em MOI 1.

Página 74. **Figura 3.11.** Efeito citopático causado por MAYV e CHIKV em células Vero.

Página 75. **Figura 3.12.** Média do número de partículas infecciosas de MAYV e CHIKV produzidas por  $1 \times 10^5$  células Aag-2 ao longo dos tempos de infecção.

Página 76. **Figura 3.13.** Resultado da PCR para amplificação do envelope viral (E3-E2) a partir da cinética de crescimento em células Aag-2 (CHIKV) e do estoque viral (MAYV).

Página 78. **Figura 3.14.** Imunodeteção por *Western Blot* de proteínas provenientes de células Aag-2 (*Aedes aegypti*) infectadas com CHIKV e coletadas em  $t = 0$  h, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i.

Página 79. **Figura 3.15.** Imunodeteção por *Western Blot* de proteínas provenientes de células Aag-2 (*Aedes aegypti*) infectadas com MAYV e coletadas em  $t = 0$  h, 2 h p.i., 4 h p.i., 8 h p.i. e 12 h p.i.

## Lista de tabelas

Páginas 67 e 68: **Tabela 1.** Proteínas de *Ae. aegypti* que apresentaram homologia com proteínas fosforiladas de pelo menos três dos cinco organismos modelo estudados.

Página 75: **Tabela 2.** Titulação dos vírus MAYV e CHIKV ao longo da cinética de crescimento em células Aag-2.

## Abreviações e símbolos

°C: graus Celcius

µg: micrograma

µl: microlitro

ml: mililitro

mM: milimolar

M: molar

nm: nanômetro

*Ae. aegypti*: *Aedes aegypti*

*Ae. albopictus*: *Aedes albopictus*

Aag-2: linhagem celular de larva de *Aedes aegypti*

C6/36: linhagem celular de *Aedes albopictus* que possui a via de RNA interferente deletada

ATP: adenosina trifosfato

ADP: adenosina difosfato

Pi: fosfato inorgânico

P: fosforilação

Cap 5': estrutura que protege o RNA mensageiro

Cauda poliA: série de adeninas no final do RNA mensageiro

MAYV: vírus Mayaro

CHIKV: vírus Chikungunya

DENV: vírus Dengue

YFV: vírus da febre amarela<sup>7</sup>

iRNA: via de RNA interferente

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

g: gravidade



h: horas

min: minutos

seg: segundos

h p.i.: horas após infecção

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

TiO<sub>2</sub>: dióxido de titânio

DTT: ditioetriol

EDTA: ácido etileno diamino tetra-acético

IAA: iodoacetamida

FBS: soro fetal bovino

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico

TFA: ácido trifluoroacético

ACN: acetonitrila

Da: daltons

kDa: quilodaltos

kb: quilobases

LC: cromatografia líquida

MS: espectrometria de massas

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

UPLC: *ultra-high liquid chromatography*

PCR: reação em cadeia da polimerase

RT-PCR: reação em cadeia da transcriptase reversa, seguida por PCR

T<sub>m</sub>: temperatura de anelamento

MOI: multiplicidade de infecção

PenStrep: penicilina e streptomicina

pH: potencial hidrogeniônico

nsP: proteína viral não-estrutural

UniProt: banco de dados de proteínas

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

*spp.*: espécies

T 25: frasco com capacidade de 25cm<sup>2</sup>

U/ml: unidade por mililitro

TCID<sub>50</sub>: dose necessária para infectar 50 % das células disponíveis

## Anexos

### Artigos em periódicos internacionais

- **Vasconcellos, AF†**; Mandacaru, SC†; De Oliveira, AS; Fontes, W; Melo, RM; De Sousa, MV; Resende, RO; Charneau, S. 2020. Dynamic proteomic analysis of *Aedes aegypti* Aag-2 cells infected with Mayaro virus. *Parasites & Vectors*, 13(1):297, p. 1-12. PMID: 32522239. PMCID: PMC7285477. doi: 10.1186/s13071-020-04167-2.
- De Oliveira, AS.; **Vasconcellos, AF**; Rodrigues, BMP; Da Silva, LA.; Resende, RO.; Ribeiro, BM. 2021. Chikungunya virus produced by a persistently infected mosquito cell line comprises a shorter genome and is non-infectious to mammalian cells. *Journal of General Virology*, 102(12), v. 102, p. 1-11. PMID: 34878970. doi: 10.1099/jgv.0.001700.

### Artigos em periódicos nacionais

- Santos, GB; Gama, SF; Lisboa, TR; Serafim, IBM; Ramos, AC; Roner, MNB; Nascimento, RM, **Vasconcellos, AF**; Charneau, S. 2020. Revisões e previsões da pandemia da Covid-19: uma revisão de literatura. COVID 19: o vírus que movimentou a ciência. Edição I volume 02. Editora Pasteur, p. 432 – 446. doi: 10.29327/535425.
- **Vasconcellos, AF**; Resende, FCN; Nascimento, RM; Nunes, NJ; Correia, JPSO; Lisboa, TR; Guedes, CA; Vieira, WH; Silva, IV. 2021. Aspectos imunológicos da Doença de Chagas e a influência da pandemia da Covid-19 em pacientes chagásicos. *Interação parasito – hospedeiro*. Atena Editora, p. 20 – 28. doi: 10.22533/at.ed.1392120072.