



Universidade de Brasília
Faculdade de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE E NA FUNÇÃO
MITOCONDRIAL DE CÉLULAS AAG-2 DE *Aedes Aegypti*
INFECTADAS PELO ARBOVÍRUS MAYARO**

Beatriz Campos Araújo

Brasília – DF
Fevereiro – 2025



Universidade de Brasília
Faculdade de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE E NA FUNÇÃO
MITOCONDRIAL DE CÉLULAS AAG-2 DE *Aedes Aegypti*
INFECTADAS PELO ARBOVÍRUS MAYARO**

Beatriz Campos Araújo

Orientador: Prof. Dr. Daniel M.P. Ardisson-Araújo

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andreza Fabro de Bem

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia molecular.

Brasília – DF

Março – 2025

BANCA EXAMINADORA

Presidente:

Prof. Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araujo

Universidade de Brasília (UnB)

Membro 1:

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Universidade de Brasília (UnB)

Membro 2:

Prof^a. Dr^a Iranaia Assunção Miranda

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Suplente:

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Universidade de Brasília (UnB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo por toda orientação, paciência e apoio durante todo o processo. Sua expertise e encanto por esse trabalho foram sempre motivos de inspiração, que me faziam “brilhar os olhos” e perceber como a ciência, mesmo nos momentos de frustração e dificuldade, é simplesmente fabulosa. A cada desafio enfrentado e a cada momento de conversas, que mesclavam entre conselhos e incentivos, foram indispensáveis para que eu superasse obstáculos e seguisse em frente. Sou imensamente grata por toda confiança e apoio durante essa trajetória.

Agradeço também à minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Andreza Fabro de Bem, por todas as reuniões esclarecedoras e por toda disponibilidade para ouvir minhas dúvidas e questionamentos. Suas respostas, sempre cheias de carinho e empolgação, despertaram em mim um interesse genuíno por um ramo que eu jamais imaginaria explorar.

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 SERRAPILHEIRA por proporcionarem materiais, equipamentos e profissionais qualificados que viabilizaram a realização deste estudo. Ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, Prof^ª. Dr^ª Iranaia Assunção Miranda e a Ao Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro pela presença na minha banca de defesa de Dissertação.

Agradeço ao Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro, pela disponibilização de materiais e equipamentos essenciais para a realização dos experimentos, assim como pelos valiosos conhecimentos compartilhados. Aos integrantes do Laboratório de Baculovírus, agradeço pelo auxílio contínuo e pelo suporte durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Amigos e Familiares

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Virologia de Insetos pelo apoio, pelas trocas de ideias e pelo maravilhoso/divertido ambiente de trabalho que tive o prazer de ter. Cada um de vocês contribuiu, de maneira única, para o meu aprendizado e para a realização deste trabalho e se tornaram amigos especiais em meu coração. Agradeço à Ethiane Rozo, pela colaboração e generosidade em compartilhar seus conhecimentos ao longo deste período. Seus ensinamentos e sua paciência foram essenciais para o meu progresso, e aprendi muito com sua experiência! À Andreza Viana, por me ensinar sobre resiliência, organização, humanidade na ciência e por todos os abraços nos momentos que mais precisei. Ao Lucas Andrade, por estar

ao meu lado desde o início da minha trajetória na pesquisa. Sou grata por todos os momentos de companhia, por cada sacrifício feito para me acompanhar em vários momentos, e por sempre estar disposto a ouvir meus desabafos e choros. Você foi, e sempre será, um verdadeiro irmão para mim. Aos estudantes de Iniciação Científica, Athos, Luisa e Thiago, agradeço também por me ensinarem coisas novas, por todos os momentos divertidos, por toda companhia e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Agradeço aos amigos de outros laboratórios, aos colegas da UnB e também aos amigos de fora da universidade por acreditarem em mim e, de diferentes maneiras, me motivarem a seguir em frente. Cada um, tornou essa jornada mais leve e agradável. Em especial, agradeço a minha melhor amiga e parceira de vida, Louise Lopes, que sempre será um pilar de extrema importância na minha vida. Sua fé em mim foi essencial para me dar motivos para nunca parar.

À minha família, Zeima Campos, Luis Tagori Araújo e Luiz Henrique Campos, agradeço profundamente pela confiança em meu potencial e por nunca me deixarem desistir. Em cada desafio, vocês foram minha base, oferecendo sempre compreensão e amor. Sou eternamente grata por tudo que fizeram por mim, seja nos momentos mais difíceis ou nas celebrações das vitórias. Sem vocês, nada disso seria possível, pois hoje posso celebrar minhas conquistas graças ao apoio e ao amor de cada um de vocês.

Ao meu companheiro, Theo Aguirre, que, mesmo chegando ao final desta jornada, esteve ao meu lado e ofereceu apoio em tudo o que podia. Me acompanhou nas noites em claro, me acalmou e trouxe paz, alegria e orientação, sempre me incentivando a fazer o que me faz bem. Sou imensamente grata à você por me ajudar a encontrar equilíbrio nos momentos difíceis.

RESUMO

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus de RNA de fita simples, sentido positivo, pertencente à família *Togaviridae*, ao gênero *Alphavirus* e à espécie *Alphavirus mayaro*, potencialmente transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Em células humanas, a infecção resulta em alterações letais, culminando na liberação de vírions e na morte celular. Em contraste, células de mosquitos, como a linhagem Aag-2 derivada de *Ae. aegypti*, toleram a infecção, sendo amplamente utilizadas para investigar a replicação viral no vetor. A infecção por MAYV em Aag-2 parece provocar desbalanço oxidativo e alterações mitocondriais, conforme análises proteômicas prévias. Assim, o presente estudo investigou o status oxidativo e o papel do sistema antioxidante na tolerância à infecção por MAYV. Células Aag-2 foram infectadas com MAYV (M.O.I. 5) e analisadas em 0, 24, 48 e 72 horas pós-infecção (h p.i.). Foram quantificados os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e marcadores de dano oxidativo, como lipoperoxidação e oxidação da glutatona (GSH). A função mitocondrial foi analisada por respirometria de alta resolução, utilizando inibidores da cadeia transportadora de elétrons e desacopladores. Os resultados mostraram um aumento de 4,5 vezes na produção de EROs em 48 h p.i. em relação ao controle, seguido por leve redução em 72 h p.i., ainda superior aos níveis de controle. Além disso, observou-se uma tendência de aumento na atividade de catalase (CAT) em 24 e 48 h p.i., com leve aumento significativo em 72 h p.i. Em contraste, a atividade de superóxido dismutase (SOD) diminuiu em 4 vezes a 48 e 72 h p.i. Também houve redução na concentração de GSH em 72 h p.i. em comparação a 48 h p.i., e tendência à lipoperoxidação. A infecção afetou o consumo de oxigênio mitocondrial após 72 h p.i., com redução em todos os estados da respiração mitocondrial. Os dados sugerem que o MAYV modula a resposta antioxidante de maneira complexa nas células do vetor. Embora haja aumento na produção de EROs, a ativação do sistema antioxidante enzimático é limitada, indicando que outras vias, além das enzimáticas, podem estar envolvidas na regulação dos níveis de EROs, como evidenciado pela alteração nos níveis de GSH. Esse mecanismo parece ser essencial para a persistência da infecção e a manutenção da viabilidade celular, o que pode ser explicado pela redução no consumo de oxigênio mitocondrial em estágios tardios da infecção. **Palavras-chave:** Arbovírus, vírus Mayaro, *Aedes*, Aag-2, estresse oxidativo, sistema antioxidante, infecção persistente.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) is a positive-sense, single-stranded RNA arbovirus belonging to the *Togaviridae* family, *Alphavirus* genus, and *Alphavirus mayaro* species, potentially transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus. In human cells, infection results in lethal changes, culminating in the release of viral particles and cell death. In contrast, mosquito cells, such as the Aag-2 strain derived from *Ae. aegypti*, tolerate infection and are widely used to investigate viral replication in this vector. MAYV infection in Aag-2 seems to cause oxidative imbalance and mitochondrial alterations, according to previous proteomic analyses. Therefore, the present study investigated oxidative status and the role of the antioxidant system in tolerance to MAYV infection. Aag-2 cells were infected with MAYV (M.O.I. 5) and analyzed at 0, 24, 48 and 72 hours post-infection (h p.i.). The levels of reactive oxygen species (ROS), the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and markers of oxidative damage such as lipoperoxidation and glutathione (GSH) oxidation were quantified. Mitochondrial function was analyzed by high-resolution respirometry, using electron transport chain inhibitors and uncouplers. The results showed a 4.5-fold increase in ROS production at 48 h p.i. compared to the control, followed by a slight reduction at 72 h p.i., still higher than control levels. In addition, there was a trend towards an increase in catalase (CAT) activity at 24 and 48 h p.i., with a slight significant increase at 72 h p.i. In contrast, superoxide dismutase (SOD) activity decreased 4-fold at 48 and 72 h p.i. There was also a reduction in GSH concentration at 72 h p.i. compared to 48 h p.i., and a tendency towards lipoperoxidation. The infection affected mitochondrial oxygen consumption after 72 h p.i., with a reduction in all stages of mitochondrial respiration. The data suggest that MAYV modulates the antioxidant response in a complex way in the vector's cells. Although there is an increase in the production of ROS, the activation of the enzymatic antioxidant system is limited, indicating that other pathways, in addition to the enzymatic ones, may be involved in regulating ROS levels, as evidenced by the change in GSH levels. This mechanism seems to be essential for the persistence of the infection and the maintenance of cell viability, which can be explained by the reduction in mitochondrial oxygen consumption in the late stages of infection. **Keywords:** arboviruses, Mayaro virus, *Aedes*, Aag-2, oxidative stress, antioxidant system, persistent infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O mosquito <i>Aedes Aegypti</i>	16
Figura 2. Distribuição mundial do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	16
Figura 3: Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 4: Ciclo de vida do mosquito do gênero <i>Aedes</i> , do ovo até o mosquito adulto.....	18
Figura 5: Diferença morfológica da cabeça de <i>Aedes aegypti</i> entre os gêneros.....	19
Figura 6: Distribuição dos principais alfavírus artrôgenicos.....	21
Figura 7: Alfavírus.....	22
Figura 8: Ciclo replicativo dos <i>Alphavirus</i>	24
Figura 9: Distribuição global do vírus Mayaro.....	25
Figura 10: Circulação do vírus Mayaro no Brasil.....	26
Figura 11: Ciclo de transmissão do vírus Mayaro em ambientes silvestres, rurais e urbanos...	28
Figura 12: Disseminação de arbovírus após alimentação de sangue infectado no intestino médio do mosquito.....	29
Figura 13: Manifestações clínicas associadas à infecção pelo vírus Mayaro.....	30
Figura 14: Esquema ilustrativo do processo de seleção da resistência de insetos a inseticidas.....	33
Figura 15: Efeito da infecção por <i>Wolbachia</i> na reprodução do <i>Aedes aegypti</i>	34
Figura 16: Linhagem Aag-2.....	36
Figura 17: Aspectos morfológicos e metabólicos das mitocôndrias.....	39
Figura 18: Geração de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias e sistema antioxidante mitocondrial.....	40
Figura 19: Fases da lipoperoxidação.....	42

Figura 20: Ação conjunta das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no controle do estresse oxidativo.....	43
Figura 21. Estrutura química da glutathione.....	44
Figura 22: Distribuição celular das isoformas de superóxido dismutase.....	44
Figura 23: Reação de glutathione (GSH) com o fluoróforo orto-ftalaldeído (OPA) que gera composto fluorescente em meio alcalino.....	53
Figura 24. Alterações citomorfológicas em células C6/36, derivadas de <i>Aedes albopictus</i> , infectadas pelo vírus Mayaro.....	55
Figura 25: Microscopia eletrônica de transmissão de Aag-2 a 2000x.....	56
Figura 26: Quantificação das espécies reativas de oxigênio em células Aag-2 infectadas e não infectadas por vírus Mayaro.....	58
Figura 27: Análise da resposta do sistema antioxidante enzimático em células Aag-2 infectadas e não infectadas por vírus Mayaro.....	59
Figura 28: Determinação da concentração total de glutathione em células Aag-2 infectadas e não infectadas por vírus Mayaro.....	60
Figura 29: Lipoperoxidação em células Aag-2 infectadas e não infectadas por vírus Mayaro.	61
Figura 30: O vírus Mayaro induz mudanças na função mitocondrial das células Aag-2.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tampão utilizado para solubilizar as amostras para cada teste.....	49
Tabela 2. Compostos usados para analisar a cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias de células Aag-2 não infectadas e infectadas com MAYV.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

CHIKV – Vírus Chikungunya

DENV – Vírus da dengue

EO – Estresse oxidativo

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

Et al., - e colaboradores

GSH – Glutathione reduzida

H₂O – Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

MAYV- Vírus Mayaro

O₂ - Oxigênio molecular

O₂•⁻ - Ânion superóxido

ONNV – O'nyong-nyong

PNH – Primata não-humano

RE – Retículo endoplasmático

SINV- Sindbis vírus

SOD – Superóxido dismutase

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. MOSQUITO VETOR, Aedes Aegypti.....	15
1.1.1. CICLO DE VIDA.....	17
1.2. ARBOVIROSES.....	19
1.2.1. AGENTES ETIOLÓGICOS.....	19
1.2.2 GÊNERO ALPHAVIRUS.....	20
1.2.3. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO.....	22
1.3 FEBRE DE MAYARO.....	24
1.3.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.....	24
1.3.2. CICLO DE TRANSMISSÃO.....	27
1.3.3. ASPECTOS CLÍNICOS.....	30
1.3.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	31
1.3.5. FORMAS PREVENTIVAS.....	32
1.4. LINHAGEM CELULAR AAG-2.....	35
1.5. BIOQUÍMICA DA INFECÇÃO E O METABOLISMO DO OXIGÊNIO.....	37
1.5.1 VIAS METABÓLICAS PARA A PRODUÇÃO DE ATP.....	38
1.5.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	39
1.5.4. SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	42
2. JUSTIFICATIVA.....	46
3. OBJETIVOS	47
3.1. OBJETIVO GERAL.....	47

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1. CÉLULAS E VÍRUS.....	48
4.2. COLETA DAS CÉLULAS E LISE CELULAR.....	49
4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	50
4.4. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR BRADFORD.....	50
4.5. MENSURAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	51
4.6. ENSAIO BIOQUÍMICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	51
4.7. ENSAIO BIOQUÍMICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATALASE.....	52
4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA.....	52
4.9. MARCADOR DE DANO OXIDATIVO.....	53
4.10. OXIMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO.....	53
4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. MICROSCOPIA ÓPTICA DA INFECÇÃO EM C6/36.....	55
5.2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA INFECÇÃO EM AAG-2.....	55
5.3. VERIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	57
5.4. ANÁLISE DA RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E NÃO ENZIMÁTICO.....	58
5.5. ANÁLISES DE DANOS OXIDATIVOS: LIPOPEROXIDAÇÃO.....	60
5.6. FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	61
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÃO.....	72
8. PERSPECTIVAS.....	73
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação se dedica a avaliação de efeitos da infecção do vírus Mayaro em células de *Aedes aegypti*, com enfoque na modulação da homeostase redox que inclui produção de espécies reativas de oxigênio, danos oxidativos e atividade do sistema antioxidante do mosquito, e está estruturada da seguinte forma: o item **INTRODUÇÃO** contém uma revisão da literatura sobre os temas a serem abordados na dissertação; seguido dos **OBJETIVOS** do trabalho. Os **RESULTADOS** estão apresentados em combinação com a **DISCUSSÃO** para melhor fluidez de leitura. O item **CONCLUSÃO** está no final da dissertação e propõe um fechamento em resposta aos objetivos. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** correspondem às citações que aparecem ao longo de todo o texto.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O MOSQUITO VETOR, *Aedes aegypti*

Com o processo de urbanização em constante expansão, muitas áreas distantes da cidade e, antes apenas rurais, têm se tornado populosas e causado desequilíbrios consideráveis na relação espaço-ambiente entre fauna local e humanos. Este desequilíbrio apresenta papel preponderante na propagação de muitas doenças de ciclo até então restrito a ambientes com baixa urbanização. Muitas dessas doenças apresentam como agentes etiológicos microrganismos que usam mamíferos domesticados e selvagens como hospedeiros definitivos ou intermediários para sua reprodução e eventualmente podem sofrer derrame para humanos e outros animais (ALMEIDA *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2013). O derrame, termo traduzido para o inglês como ‘spill-over’, pode ocorrer por meio da transmissão facilitada por artrópodes vetores que se alimentam de diferentes espécies de mamíferos, atuando como transportadores de potenciais patógenos (WEAVER, 2013). Dentre os artrópodes, os insetos desempenham um papel fundamental como vetores biológicos na disseminação de agentes infecciosos entre hospedeiros não humanos e humanos. Um exemplo notável é o mosquito *Aedes aegypti*, amplamente reconhecido por sua capacidade de transmitir patógenos a diversas espécies (LWANDE *et al.*, 2020; NASLUND *et al.*, 2021).

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Figura 1a) é um mosquito da família Culicidae, subordem Nematocera, ordem Diptera, considerado um vetor importante para a propagação de muitas arboviroses por sua distribuição em zonas tropicais e subtropicais. A descoberta da capacidade de atuação como vetor viral do mosquito foi registrada em 1901, com a transmissão do agente etiológico viral da Febre Amarela (REED, 1902). Além de ser o principal vetor da Febre Amarela, o mosquito é um vetor suscetível à infecção por vírus de outras famílias associadas a doenças infectocontagiosas ao humano e apresenta uma competência na transmissão desses patógenos entre espécies (CRUZ, 2021). A proximidade entre o mosquito e a população humana apresenta risco de disseminação de doenças, considerando a atração da espécie ao hospedeiro humano pela presença do odorante sulcatona na pele (FRANCISCO; SILVA, 2019).

Um mosquito de pequeno porte, com tamanho aproximado de 4 a 7 milímetro, que conta com manchas brancas na superfície dorsal do tórax de formato de uma lira, semelhante a um violino (Figura 1b). O abdômen dos mosquitos geralmente apresenta coloração variando entre tonalidade de marrom escuro a preto, podendo possuir escamas nesta região. Nas patas

traseiras, segmento tarsal, possui faixas basais brancas semelhantes a listras que o distingue de muitos outros culicídeos (CARPENTER; LACASSE, 1955).

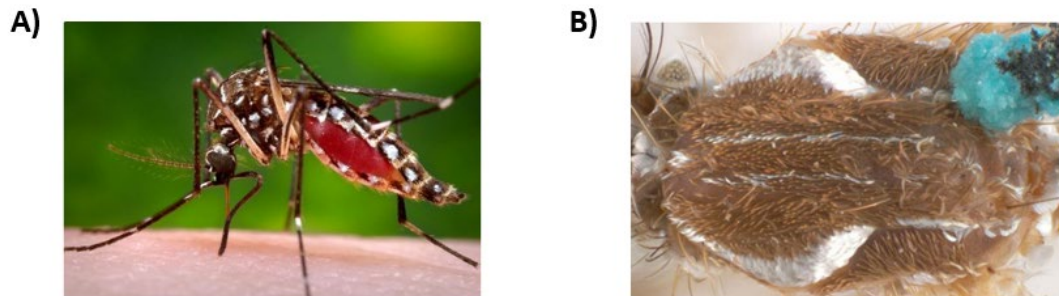


Figura 1: O mosquito *Aedes aegypti*. (A) Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) na fase adulta. (B) Fotografia aproximada do dorso do mosquito *Aedes aegypti* demonstrando, em branco, o formato de “lira” característica da espécie. **Fontes:** (A) James Gathany. Centers For Disease Control and Prevention. (B) Simon Hinkley e Ken Walker. Pest and Disease Image Library

Durante muitos anos, o foco de propagação da espécie *Ae. aegypti* estava geograficamente restritos ao continente africano, sendo prevalente em países de clima tropical. No entanto, atualmente, há uma ampla disseminação do mosquito em quase todos os continentes (Figura 2), tendo chegado às Américas por meio de navios negreiros originários da África (HUANG *et al.*, 2019; REY; LOUNIBOS, 2015). A globalização, processo de urbanização e mudanças climáticas são fatores que influenciaram na amplificação da espécie.

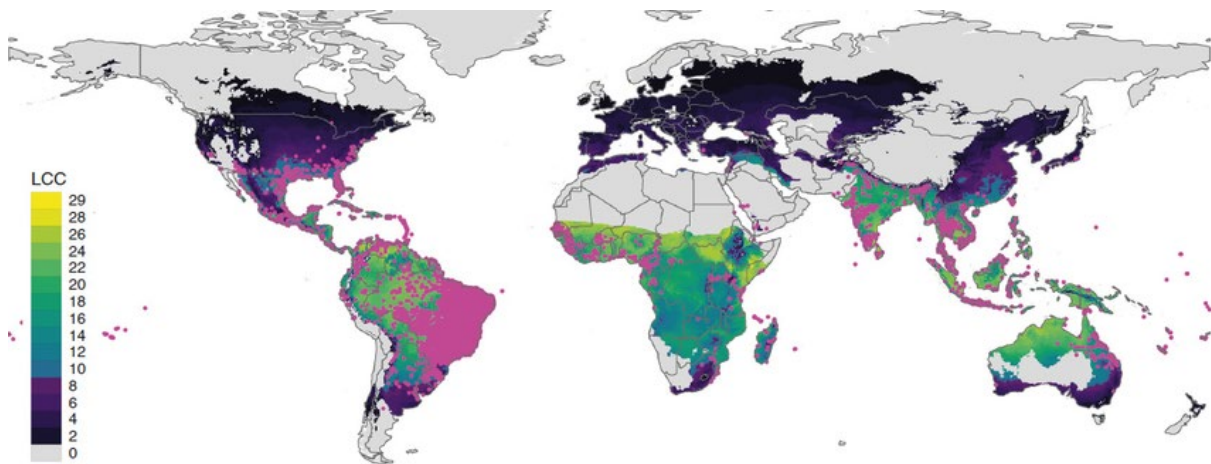


Figura 2: Distribuição mundial do mosquito *Aedes aegypti*. O mapa indica o total de conclusão de ciclo (do inglês ‘lifecyle completions’- LLC) de *Ae. Aegypti*.

Fonte: Adaptado de Iwamura *et al.*, 2020.

1.1.1. CICLO DE VIDA

Como membro pertencente à família Culicidae, os mosquitos do gênero *Aedes* são insetos classificados como holometábolos, ou seja, passam por uma metamorfose completa, com distinções biológicas e morfológicas entre os estágios de desenvolvimento das formas imaturas (ovo, larva e pupa) em relação à fase adulta alada (MARCONDES, 2001). Após o acasalamento, as fêmeas são responsáveis por encontrar locais adequados com água parada e limpa para deposição dos ovos. Essa característica de resistência permite a viabilidade dos ovos por períodos prolongados, variando entre meses a um ano (BATISTA, 2022). Cada fêmea é capaz de ovipositar de 150 a 200 ovos com coloração escura, longos, com comprimento de 1 mm cada, e com formato ovoide (Figura 3) (FORATTINI, 2002). O rompimento dos ovos liberam as larvas direto para o meio aquático. As larvas apresentam coloração esbranquiçada e corpo prolongado, e passam por quatro fases de desenvolvimento com duração de aproximadamente 10 dias, a depender das condições ambientais onde ocorreu a oviposição (FELIX, 2022).



Figura 3: Ovos de *Aedes aegypti*. Os ovos longos, lisos, de formato ovoide e com aproximadamente um milímetro de comprimento. **Fontes:** Centers For Disease Control and Prevention.

Após o período de crescimento, as larvas entram no estágio de pupa. A pupa permanece completamente imóvel na água com a presença de um tubo respiratório que se estende até a superfície para que ocorram as trocas gasosas (MARCONDES, 2001). Ao emergir, o mosquito adulto permanece em repouso sobre a água para a esclerotização de seu exoesqueleto e após um período já se encontra capaz de começar os processos de reprodução e de alimentação (FELIX, 2022). A expectativa de vida dos mosquitos adultos é de aproximadamente 30 dias, de modo que o macho apresenta uma longevidade menor que a fêmea (TAVEIRA *et al.*, 2001). A figura 4 abaixo ilustra o ciclo de vida do mosquito.

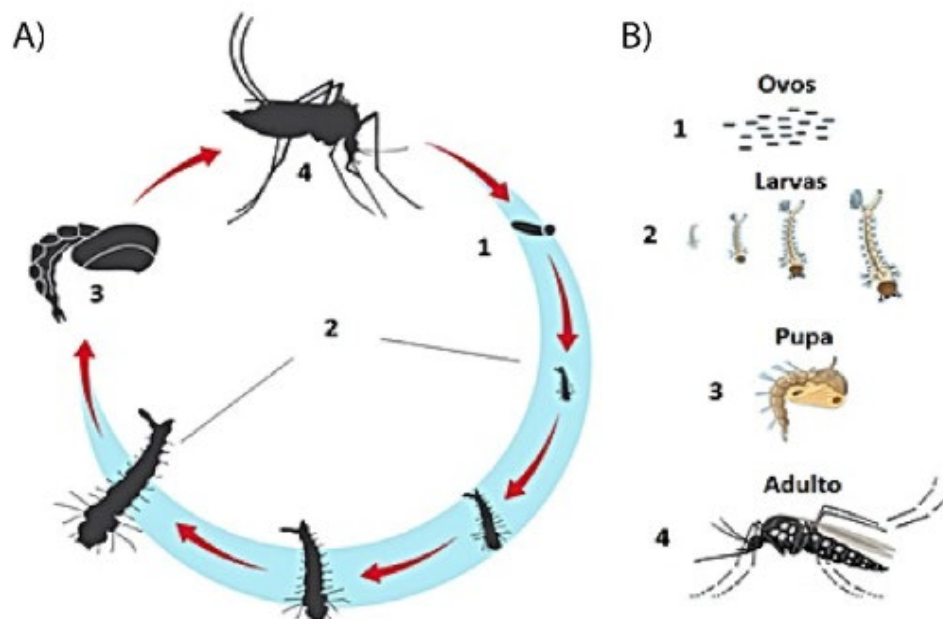


Figura 4: Ciclo de vida do mosquito do gênero *Aedes*, do ovo até o mosquito adulto. (A) ciclo dividido em 4 estágios: (1) representa o estágio de ovo; (2) o estágio de larva (que engloba quatro fases de desenvolvimento); (3) o estágio de pupa e (4) o estágio de mosquito adulto. (B) desenvolvimento do mosquito: (1) os ovos depositados; (2) o desenvolvimento das larvas para diferenciação dos apêndices e segmentos do mosquito; (3) a aparência da pupa do mosquito com estruturas visíveis e (4) o mosquito adulto com morfologia similar dentro do gênero *Aedes*. **Fonte:** REY; LOUNIBOS, 2015

Morfologicamente, as fêmeas e os machos do *Aedes aegypti* possuem características distintas que permite a sua diferenciação (Figura 5). Os machos apresentam uma característica de antena com aspecto plumoso conferida pela maior distribuição de pelos e o aparato bucal sugador, visto que a alimentação se baseia em néctar de frutas e plantas. Já nas fêmeas, o aparelho bucal é caracterizado como picador-sugador pelo comportamento hematófago, onde a ingestão do sangue é necessária para a maturação dos ovários (FELIX, 2022; MARCONDES, 2001). A alteração de alimentação entre os sexos biológicos só é possível devido a alterações que ocorrem no intestino médio das fêmeas durante o desenvolvimento do mosquito (MARCONDES, 2001). A antena das fêmeas apresenta um aspecto de seta e, a presença de sensilas distribuídas por todo esse apêndice olfatório são responsáveis pela percepção de odores da pele humana. Nos machos, as sensilas também apresentam um papel importante para o acasalamento, pois permite a detecção da vibração e ritmicidade das asas das fêmeas (BATISTA, 2022).

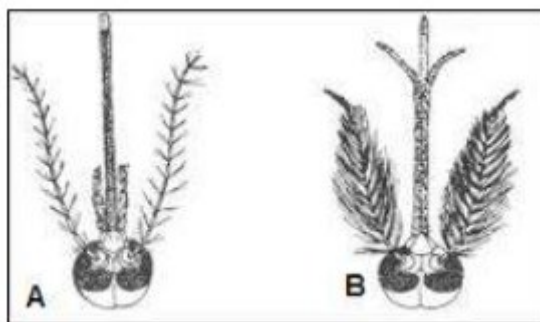


Figura 5: Diferença morfológica da cabeça de *Aedes aegypti* entre os gêneros. (A) Fêmea de *Ae. aegypti* com aparelho bucal picador-sugador, antena em aspecto de seta e sensilas distribuídas no apêndice olfatório. (B) Macho de *Ae. aegypti* com aparelho bucal sugador e antena com aspecto plumoso. Fonte: Adaptado de Eiras, 2005

1.2. ARBOVIROSES

As arboviroses são doenças de etiologia viral carregadas e vetorizadas por artrópodes hematófagos infectados que transmitem o vírus por picada para hospedeiros vertebrados, como por exemplo pássaros, roedores, primatas não-humanos (PNH) e humanos (CRUZ, 2021; DONALISIO *et al.*, 2016). Essas doenças infecciosas têm emergido como uma ameaça significativa, especialmente em regiões tropicais, devido a fatores ambientais e sociais, como mudanças climáticas, desmatamento, migração populacional, urbanização desordenada e precariedade das condições sanitárias. Tais condições favorecem a replicação viral, a adaptação dos vetores a novos habitats e o consequente aumento na taxa de transmissão (MESQUITA *et al.*, 2021).

Além de sua ampla dispersão territorial, favorecida pela capacidade de adaptação a novos ambientes e hospedeiros, essas infecções apresentam características que as destacam por apresentar rápida progressão e alta transmissibilidade. Essas particularidades contribuem para o surgimento de grandes epidemias, resultando em um número expressivo de casos, que reforça atenção sobre medidas eficazes de prevenção e contenção de vetores para desenfrear sua propagação. (DONALISO *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2014).

1.2.1. AGENTES ETIOLÓGICOS

Os vírus caracterizados como agentes etiológicos das arboviroses são denominados como arbovírus, termo derivado da expressão em inglês ‘arthropod-borne’, que se refere a um grupo de vírus transmitidos por vetores artrópodes, tais como insetos e ácaros hematófagos

(HUYANG *et al.*, 2019). Esses vírus compreendem um grupo diversificado de patógenos que podem infectar plantas e diversas espécies de animais, sendo que aproximadamente 150 espécies são conhecidas por causar doenças em humanos e em animais domésticos associados ao homem (MADEWELL, 2020).

A maioria das arboviroses de interesse humano é causada por espécies de arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus* (família *Togaviridae*) e *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), embora outros membros de importância para a saúde humana pertençam às famílias *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (HERNANDEZ *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2014; WEAVER *et al.*, 2010). Dentre os arbovírus transmitidos pelo mosquito *Ae. aegypti*, destacam-se os vírus da Febre amarela (YFV), da Dengue e seus sorotipos 1, 2, 3 e 4 (DENV-1, -2, -3 e -4), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) e Mayaro (MAYV) que são responsáveis por epidemias recorrentes, devido a uma união de fatores ecológicos, econômicos e sociais, constituindo um importante desafio para a saúde pública no Brasil (NASLUND *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024). A região Norte do país é particularmente vulnerável a essas viroses devido ao seu clima quente e úmido, condições ideais para a proliferação do vetor e a manutenção da transmissão viral (BARBOSA; SILVA, 2015).

1.2.2. GÊNERO *ALPHAVIRUS*

Os alfavírus que constituem o gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*) possuem ampla diversidade genética e são responsáveis por uma variedade de doenças em humanos e outros vertebrados, sendo transmitidos principalmente por artrópodes hematófagos, como mosquitos (ATKINS, 2013; WEI *et al.*, 2024). Os alfavírus podem ser subdivididos em duas grandes categorias com base em sua distribuição geográfica e nas manifestações clínicas associadas às infecções que causam, classificados entre os alfavírus de Velho Mundo e os do Novo Mundo (ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2013).

Os Velho Mundo, como o Sindbis vírus (SINV), O'nyong-nyong vírus (ONNV), CHIKV e o MAYV, são predominantemente classificados como artrítogênicos, enquanto os do Novo Mundo, tendo o Eastern equine encephalitis virus (EEEV) como membro destaque, são considerados encefalíticos e possuem maior tropismo pelo sistema nervoso central, podendo levar a quadros neurológicos graves, incluindo encefalite letal (ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2013; HOLMES *et al.*, 2020). O Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (sigla do inglês, ICTV) propôs uma nomenclatura binomial semelhante à proposta por Lineu para

organismos celulares. Nessa reestruturação taxonômica, o MAYV foi reclassificado como pertencente à espécie *Alphavirus mayaro* (CHEN *et al.*, 2018).

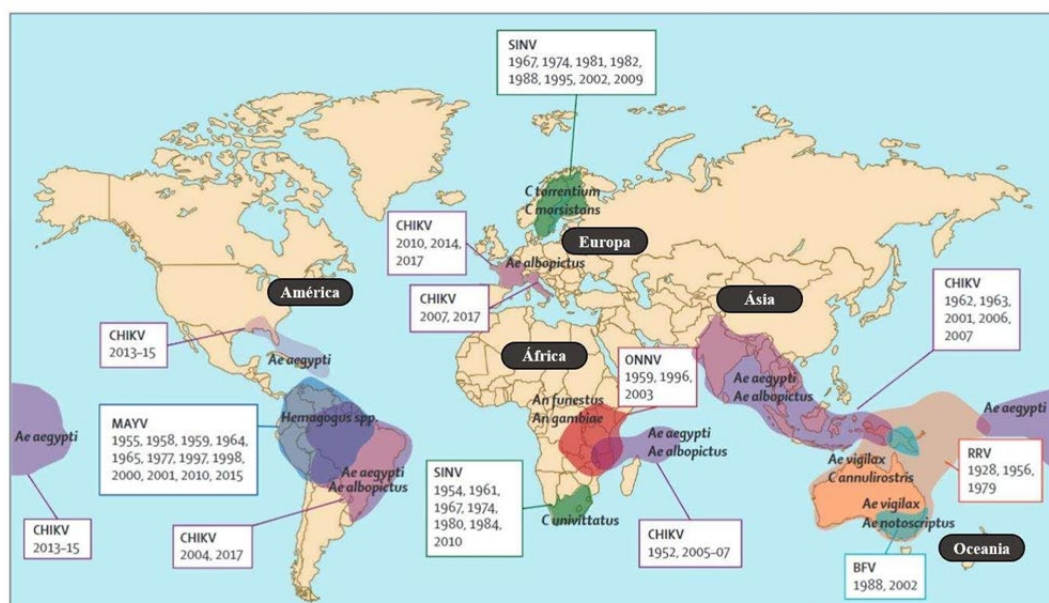


Figura 6: Distribuição dos principais alfavírus artrôgenicos. As áreas destacadas indicam regiões onde esses vírus foram identificados ao longo dos anos, com a indicação dos períodos de ocorrência representados em caixas de texto. O mapa também destaca a relação entre os vetores artrópodes e a dispersão dos vírus, evidenciando espécies como *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes vigilax*, *Aedes notoscriptus*, *Haemagogus spp.*, *Culex univittatus*, *Culex torrentium*, *Culex morsitans*, *Anopheles funestus* e *Anopheles gambiae* são distribuídas em diferentes países, associadas aos respectivos vírus que transmitem. BFV: vírus Barmah Forest, CHIKV: vírus Chikungunya SINV: vírus Sindbis, MAYV: vírus Mayaro, ONNV: vírus O’Nyong Nyong, RRV: vírus Ross River. **Fonte:** Adaptado de Zaid *et al.*, 2021

Em termos de estrutura dos vírions, todos os alfavírus apresentam formato esférico, medindo cerca de 65-70 nm de diâmetro (Figura 7a). Além disso, são vírus envelopados com capsídeo. O genoma viral é de natureza de ssRNA (+) sendo alocados no grupo IV na classificação de Baltimore (KOONIN *et al.*, 2021) e com proteção de cap na extremidade 5', uma cauda de poli-A na 3' e, de aproximadamente 12 kb de tamanho. O genoma está organizado em duas fases de leitura abertas ou ORFs (do inglês ‘open reading frames’). A primeira ORF produz uma poliproteína não-estrutural que, quando amadurecida por clivagem, origina quatro proteínas não estruturais maduras (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). A segunda ORF codifica uma poliproteína estrutural única que vai dar origem às proteínas estruturais C, pE2 (ou p62), 6K e E1 (Figura 7b) (DIAGNE *et al.*, 2020; HERNANDEZ *et al.*, 2014; WEAVER; REISEN, 2010).

As proteínas não estruturais participam da replicação viral e são traduzidas a partir do RNA genômico viral, enquanto que as proteínas estruturais do capsídeo e envelope viral são traduzidas a partir de um RNA subgenômico sob o controle de um promotor interno (LEUNG *et al.*, 2011).

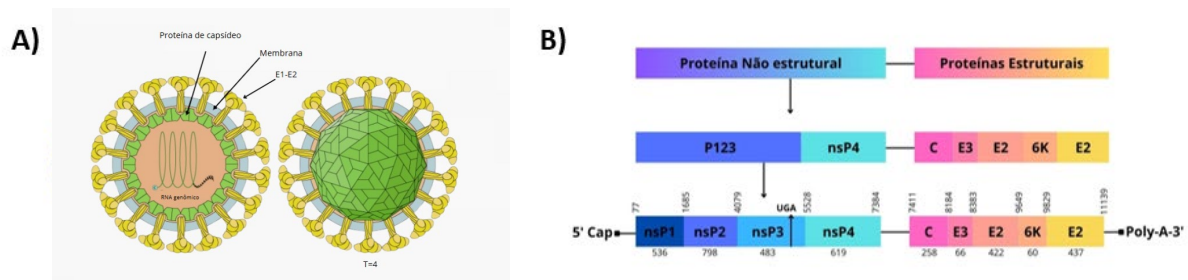


Figura 7: Alfavírus. (A) Representação estrutural da partícula viral (B) Representação esquemática da organização genômica dos alfavírus. **Fonte:** (A) Adaptado de Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics (B) Figura adaptada de Napoleão-Pego *et al.*, 2014

1.2.3. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO

Tanto no vetor quanto em humanos, o ciclo viral se inicia após o anexo do vírus à célula-alvo por ligação da proteína estrutural E1 a receptores de membrana que permite a internalização no citoplasma por endocitose mediada por clatrina. Após a internalização, os vírions passam por um processo de desmontagem do capsídeo, liberando o RNA genômico no citoplasma da célula hospedeira. A liberação do genoma viral ocorre em resposta a uma mudança conformacional das glicoproteínas de superfície do envelope viral, induzida pela acidificação do endossomo. Esse processo facilita a fusão da membrana do envelope viral com a do endossomo, permitindo a liberação do material genético no citoplasma e iniciando o ciclo replicativo do vírus (DIAGNE *et al.*, 2020; SCHWARTZ, ALBERT, 2010). O mRNA viral é traduzido em uma poliproteína precursora dos não-estruturais (nsPs), que subsequentemente é clivada em quatro proteínas. A nsP1, que desempenha um papel essencial na síntese da fita negativa do RNA viral e possui atividade de capeamento de RNA, a nsP2, que apresenta múltiplas funções, incluindo atividade de RNA helicase e protease, além de estar envolvida no desligamento da transcrição da célula hospedeira, a nsP3, que integra o complexo de replicação

viral, contribuindo para a montagem da replicase e, por fim, a nsP4, que atua como a RNA polimerase viral, catalisando a síntese do genoma viral (HOLMES *et al.*, 2020).

O complexo de replicação viral é uma estrutura essencial para a síntese do RNA genômico e subgenômico, e é formado pela junção de todas nsPs, que apresenta como função a síntese de um RNA intermediário de fita simples com sentido negativo (-) que servirá de molde para a síntese dos RNAs subgenômicos (26S) e genômicos (49S). A tradução do RNA subgenômico resulta na síntese do precursor da poliproteína C-pE2-6K-E1. Este precursor é processado por uma serina protease autoproteolítica, levando à formação das proteínas maduras do capsídeo e, posteriormente, das glicoproteínas de envelope pE2 e E1. A proteína E1, em particular, desempenha um papel fundamental na mediação da fusão da membrana durante a entrada viral (DIAGNE *et al.*, 2020). De maneira sequencial, a glicoproteína pE2 associa-se co-translacionalmente à E1 no retículo endoplasmático (RE), facilitando o correto dobramento dessa última. Após a montagem e processamento no RE, ambas as proteínas são direcionadas para a rede trans-Golgi, onde pE2 passa por modificações pós-traducionais, incluindo a adição de cadeias de glicanos, tornando-se uma glicoproteína funcional. Nesse compartimento, a furina celular promove a clivagem de pE2, originando E2, responsável pela interação com receptores celulares, e E3, que desempenha um papel essencial no dobramento adequado de pE2 e na sua posterior associação com E1. As glicoproteínas então sofrem processamento adicional e são transportadas para a membrana plasmática por meio de vesículas secretoras (MOTA *et al.*, 2015; SCHWARTZ, ALBERT, 2010).

Sucessivamente, o nucleocapsídeo é construído no citoplasma pelo empacotamento do RNA genômico pelas proteínas do capsídeo, sendo direcionado logo em seguida para interagir do lado citoplasmático da membrana plasmática na forma de vesículas derivadas do endossomo. Ao fundir-se com a membrana da célula, ocorre o recrutamento das glicoproteínas do envelope já presentes na superfície da membrana para finalização da montagem da partícula viral e o ocorrer o brotamento das partículas virais infecciosas para fora da célula (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018). A figura 8 abaixo ilustra o ciclo replicativo dos alfavírus.

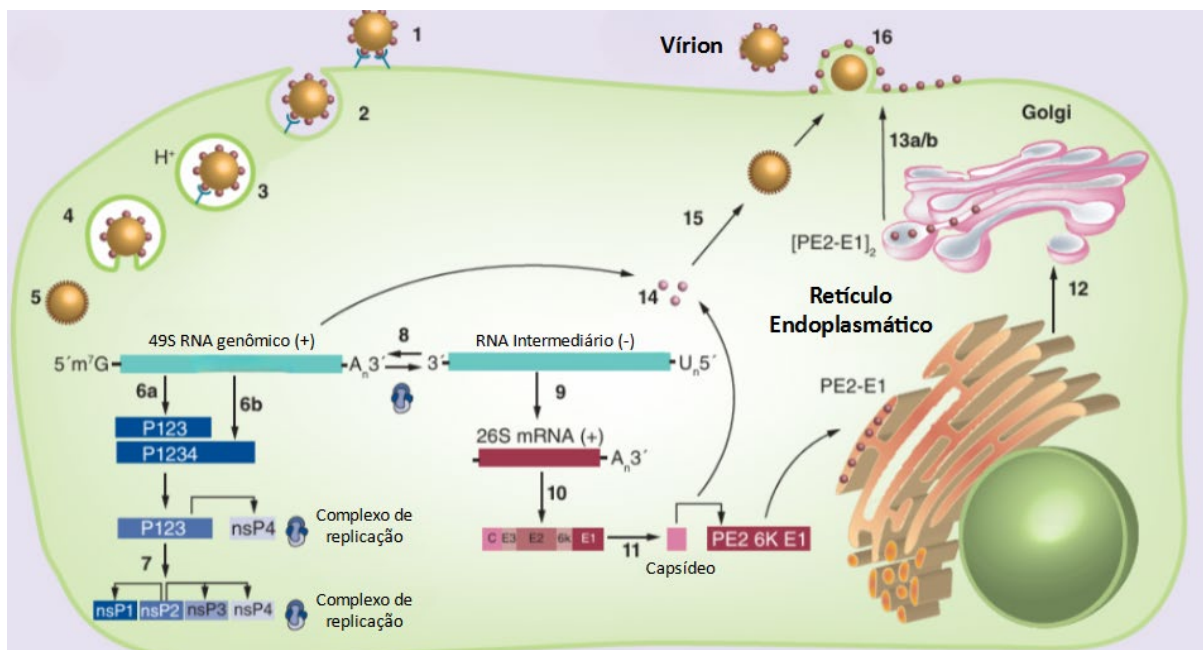


Figura 8: Ciclo replicativo dos *Alphavirus*. (1) Ligação do vírus ao receptor de membrana da célula. (2) Processo de endocitose. (3) Acidificação do vacúolo. (4) Fusão de membranas. (5) Saída do nucleocapsídeo para o citoplasma e desmontagem do core. (6) Tradução da poliproteína contendo as proteínas não estruturais. (7) Produção de proteínas não estruturais. (8) Transcrição a partir do promotor subgenômico entre ORFs e produção do intermediário com sentido negativo. (9) Transcrição do intermediário negativo e produção do RNA positivo. (10) Tradução das proteínas estruturais. (11) Processamento. (12) Translocação para o complexo de Golgi e maturação das glicoproteínas. (13) Ativação por furina e transporte de glicoproteínas maduras por via secretória. (14 e 15) Empacotamento do genoma viral na forma de nucleocapsídeo. (16) Interação do nucleocapsídeo com a membrana celular que contém as proteínas de envelope. Essa interação induz um brotamento de novas partículas virais. Modelo de replicação em células de vertebrado e invertebrado. **Fonte:** Adaptado de Mota *et al.*, 2015.

A infecção viral causa um desbalanço celular intenso, de modo a subverter o funcionamento de muitas estruturas celulares, desde o tráfego de vesículas e funcionamento do sistema de endomembranas, reprogramação da expressão de genes celulares em níveis transcricional e traducional, bem como o funcionamento de outras organelas tais como corpos gordurosos, mitocôndria e peroxissomos (ABRANTES, 2020).

1.3. FEBRE DE MAYARO E O VÍRUS MAYARO

1.3.1. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

A febre de Mayaro é uma arbovirose causada pelo Mayaro (MAYV) identificada pela primeira vez em um surto de casos de febre aguda em trabalhadores rurais na ilha de Trinidad e Tobago, em 1954 (DIAGNE *et al.*, 2020). Casos importados de infecção por MAYV vêm

sendo notificados desde 1997, especialmente em turistas que retornaram de áreas consideradas endêmicas, como a América do Sul e América Central, destacando o impacto das viagens aéreas na disseminação do vírus entre os continentes (Figura 9) (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018). No entanto, a ausência de dados epidemiológicos consistentes para a África e a Ásia impede a determinação precisa da presença do MAYV nesses continentes. Os primeiros casos importados foram documentados nos Estados Unidos em 1997 e na Europa em 2008 (DIAGNE *et al.*, 2020).

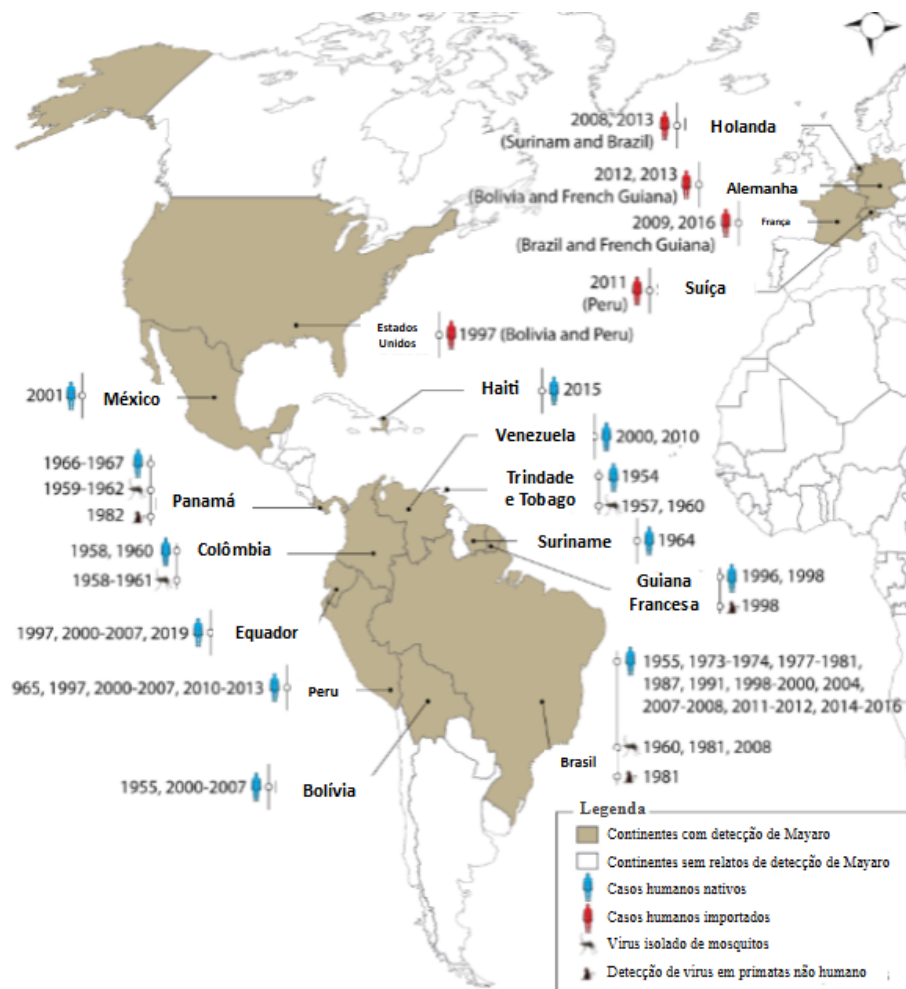


Figura 9: Distribuição global do vírus Mayaro. Registros de vírus isolados em vetores, primatas não-humanos e humanos. Descrito na legenda no quadrado marrom, quadrado branco, ícone representativo de humano em azul, ícone representativo de humano em vermelho, ícone representativo de mosquito e ícone representativo de primata indicam continentes com detecção de Mayaro, continentes sem relatos de detecção de Mayaro, casos humanos nativos, casos humanos importados, vírus isolado de mosquitos e detecção de vírus em primatas não humanos, respectivamente. **Fonte:** Adaptado de DIAGNE *et al.*, 2020

No Brasil, o primeiro surto de casos de febre relacionado a MAYV foi registrado em 1955, nas margens do rio Guamá, próximo a Belém, no estado do Pará (AITKEN *et al.*, 1960). Em 1999, foi identificado no Amazonas o primeiro relato de casos de doença febril associada ao vírus (FIGUEIREDO *et al.*, 2004). Desde então, casos esporádicos e surtos localizados têm sido considerados endêmicos na Região Amazônica (FIGUEIREDO *et al.*, 2015). A partir da década de 2000, observou-se uma expansão geográfica dos casos, com notificações em estados como Amazonas, Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Maranhão (CAMINI *et al.*, 2017). Entre 2007 e 2008, 33 casos foram registrados na cidade de Manaus, Amazonas (MOURÃO *et al.*, 2012). Em 2019, pesquisas indicaram evidências da circulação do vírus no estado de São Paulo, sugerindo uma possível adaptação do MAYV a ambientes urbanos a diferentes vetores (USP, 2019) (Figura 10).

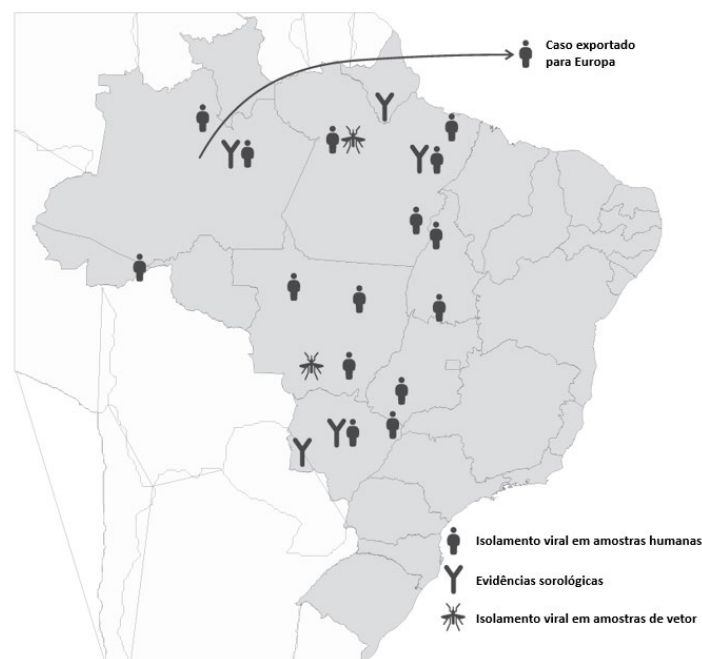


Figura 10: Circulação do vírus Mayaro no Brasil. O mapa mostra os locais de relatos de MAYV, indicando relatos de isolamento do vírus de amostras humanas (figura humana), de culicídeos (figura de inseto) e também evidências sorológicas de amostras humanas ou vetores (figura de anticorpo). MAYV: vírus Mayaro. **Fonte:** Adaptado de ESTOFOLETE *et al.*, 2016

A distribuição do MAYV também está relacionada à presença de diferentes sorotipos que acometem regiões distintas. Até o momento, estudos filogenéticos anteriores propõem a existência de quatro genótipos do vírus, sendo eles os genótipos D, L, N e um genótipo

recombinante D/L (LORENZ *et al.*, 2019) O genótipo D foi isolado em Trinidad e Tobago e descrito em diversos países da América do Sul, incluindo Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Peru, Bolívia e Venezuela (AUGUSTE *et al.*, 2015; POWERS *et al.*, 2006). Já o genótipo L foi detectado predominantemente no Brasil, apresentando poucas diferenças em relação ao genótipo D (PEREIRA SERRA *et al.*, 2016), e, em 2015, foi identificado no a disseminação desse genótipo com um caso detectado no Haiti (WHITE *et al.*, 2018). O genótipo N apresenta características intermediárias entre os genótipos D e L e, até o momento, foi identificado exclusivamente no Peru (AUGUSTE *et al.*, 2015).

A contínua circulação do MAYV nas áreas tropicais da América do Sul levanta preocupações sobre sua possível expansão para novas regiões e os estudos de caracterização genética do vírus desempenham um papel fundamental na compreensão de sua evolução, patogenicidade e dispersão geográfica, oferecendo subsídios para o aprimoramento de métodos diagnósticos e para a formulação de estratégias de vigilância epidemiológica (ABRANTES, 2020).

1.3.2. CICLO DE TRANSMISSÃO

O MAYV é um arbovírus emergente transmitido principalmente pelo mosquito *Haemagogus janthinomys*, vetor predominante em regiões florestais. No entanto, há indícios que as espécies *Mansonia venezuelensis*, (AITKEN *et al.*, 1960), *Psophors sabethes* (AZEVEDO *et al.*, 2009) as espécies dos gêneros *Culex* e *Aedes*, como *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. scapularis*, também possuem competência para atuar como vetor, o que levanta preocupações sobre sua possível disseminação em áreas urbanas (MUÑOZ; NAVARRO *et al.*, 2012). A adaptação do vírus a vetores antropofílicos urbanos tem favorecido sua propagação em países tropicais, especialmente em ambientes urbanos e periurbanos próximos a áreas florestais o que permitiu ao MAYV a apresentar um potencial epidêmicos (NAPOLEÃO-PEGO *et al.*, 2014).

A transmissão pode ser caracterizada por três ciclos principais. No ciclo enzoótico silvestre, primatas e outros vertebrados atuam como hospedeiros, enquanto o mosquito *Haemagogus janthinomys* atua como o principal vetor. No ciclo rural, humanos em áreas florestais podem ser infectados por mosquitos silvestres, representando um ponto de interseção entre os ciclos silvestre e urbano. No ciclo urbano, o vírus pode ser transmitido entre humanos

por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, criando um cenário propício para surtos em áreas densamente povoadas. Além disso, há indícios de que aves infectadas possam atuar como reservatórios alternativos do vírus, contribuindo para sua disseminação em novos ambientes urbanos (DIAGNE et al., 2020) (Figura 11).

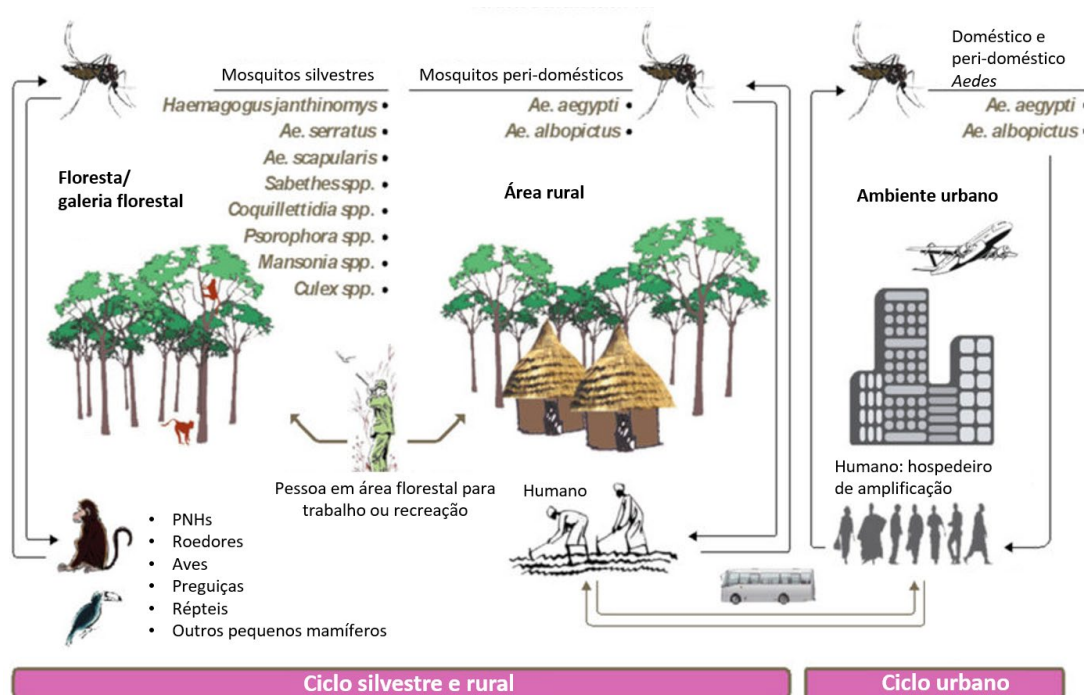


Figura 11: Ciclo de transmissão do vírus Mayaro em ambientes silvestres, rurais e urbanos. No ciclo silvestre, o vírus é propagado por mosquitos de vida silvestre, incluindo *Haemagogus janthinomys*, *Aedes serratus*, *Aedes scapularis*, *Sabethes spp.*, *Coquillettidia spp.*, *Psorophora spp.*, *Mansonia spp.* e *Culex spp.*, para primatas não humanos (PNHs), roedores, aves, preguiças, répteis e outros pequenos mamíferos após o repasto sanguíneo. Humanos podem ser expostos igualmente ao vírus ao ingressar em áreas florestais. No ciclo rural, mosquitos peri-domésticos, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, atuam como vetores secundários, favorecendo a disseminação viral. No ciclo urbano, esses mesmos vetores podem transmitir o vírus entre humanos, permitindo sua amplificação e favorecendo surtos em áreas em ambientes urbanos. **Fonte:** Adaptada de DIAGNE et al., 2020.

A influência da temperatura na transmissão do MAYV também é um fator relevante para adaptação da infecção em diferentes vetores. Em países tropicais e subtropicais, como o Brasil, foi observado que o período extrínseco de incubação do vírus em *Aedes aegypti* é reduzido em comparação a climas mais amenos, acelerando a disseminação viral (ALOMAR; ALTO, 2022). Apesar de a infecção pelo MAYV ocorrer durante todo o ano, sua incidência é maior no período

chuvoso, coincidindo com o aumento da população de mosquitos vetores, um padrão semelhante ao observado em outras arboviroses endêmicas no país. (LOPES *et al.*, 2014)

O processo de infecção viral em mosquitos segue um caminho bem estabelecido. Após picar um mamífero infectado como humano, a fêmea do mosquito adquire teor proteico importante para amadurecimento de seus ovos que é absorvido no intestino médio, mas também adquire partículas virais após o repasto sanguíneo. As partículas, infectam primariamente células do epitélio do intestino médio do inseto, replicam-se e escapam no órgão, espalhando a infecção para outros tecidos que incluem corpo adiposo, hemolinfa e glândulas salivares (TIKHE; DIMOPOULOS, 2021). A fêmea infectada passa então a transmitir o vírus em outros eventos de picadura de humanos através da saliva contendo a partícula viral (Figura 12) (SILVA, 2017; SANTOS, 2020). Neste caso, o vírus Mayaro migra até a célula no tecido de tropismo do hospedeiro vertebrado, geralmente fígado ou o baço, para começar seu processo infeccioso (NAPOLÃO-PEGO *et al.*, 2014). Além da transmissão horizontal, algumas arboviroses, como o DENV, podem ser transmitidas verticalmente, como por transmissão transovariana, em que a fêmea infectada sua progênie, ou venérea, na qual o macho transmite o vírus para a fêmea durante a cópula. Essas formas de transmissão contribuem para a manutenção dos vírus na natureza mesmo na ausência de hospedeiros vertebrados, aumentando seu potencial de persistência ambiental (KOW *et al.*, 2001).

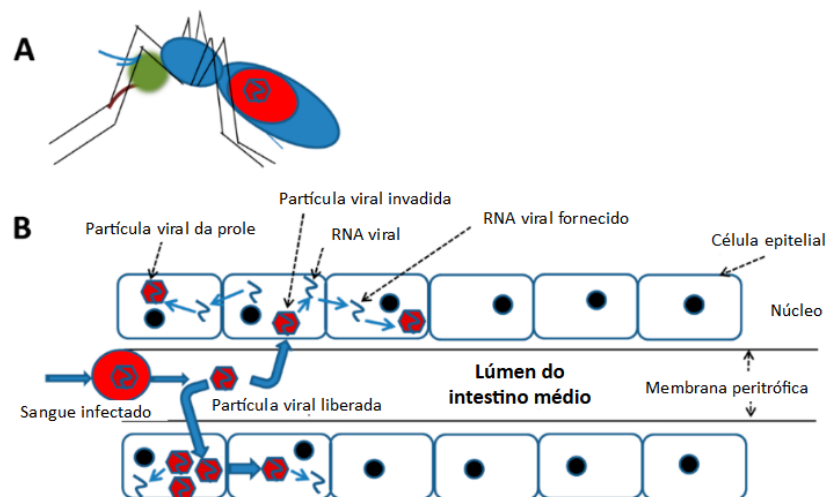


Figura 12: Disseminação de arbovírus após alimentação de sangue infectado no intestino médio do mosquito. (A) A infecção do vírus na fêmea do mosquito vetor começa com uma refeição de sangue proveniente da viremia de um paciente. **(B)** Esquema da propagação do vírus nas células do intestino médio de uma fêmea ingurgitada. No início, o vírus ingerido infecta esporadicamente as células epiteliais do intestino médio. Em

seguida, ocorre uma disseminação extensiva por meio da transmissão célula a célula antes de o vírus se disseminar para outros órgãos. **Fonte:** Adaptado de CHENG *et al.*, 2021

1.3.3. ASPECTOS CLÍNICOS

A sintomatologia dessa patologia caracteriza-se por um curso clínico geralmente autolimitado de viremia, com duração média de três a cinco dias. Os sinais e sintomas mais comuns incluem febre, cefaleia, mialgia, artralgia, especialmente em grandes articulações, inchaço dos gânglios linfáticos, além de manifestações gastrointestinais, ‘rash’ cutâneo e dor retro-orbitária (Figura 13) (DIAGNE *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2024). Apesar de não ser considerada uma doença letal, a febre de Mayaro apresenta elevada morbidade, com possibilidade de evolução para febre persistente por até duas semanas, poliartralgia dolorosa que pode perdurar por meses e, em casos raros, complicações graves, como miocardite (MOURÃO *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2014; THEILACKER *et al.*, 2013). Em 2006, foi notificado no México o primeiro caso de mortalidade associado ao MAYV, caracterizado por manifestações clínicas graves, incluindo encefalopatia, icterícia, hemorragia associada à trombocitopenia, que evoluiu ao óbito 30 dias após a internação (NAVARRETE-ESPINOSA; GÓMEZ-DANTÉS, 2006). As causas da persistência dos sintomas permanecem inconclusivas, mas indicam associação fatores relacionados à intensidade do processo inflamatório, à extensão da lesão articular e à presença de produtos virais no tecido articular, bem como devido a um processo de autoimunidade (ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2013).

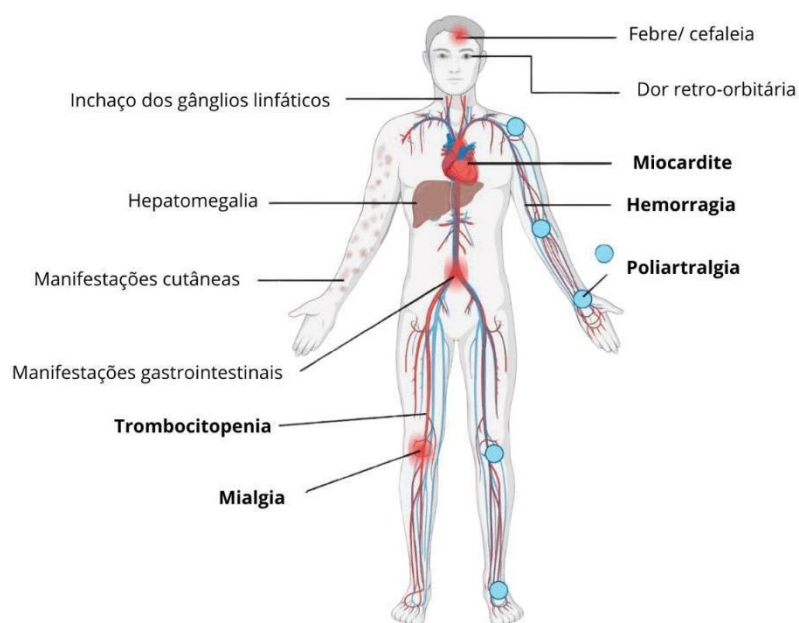


Figura 13: Manifestações clínicas associadas à infecção pelo vírus Mayaro. Os sinais e sintomas incluem: Febre; Cefaleia; Dor retro-orbitária; Inchaço dos gânglios linfáticos; Hepatomegalia; Manifestações cutâneas; Manifestações gastrointestinais; Miocardite; Hemorragia; dor nas articulações (poliartralgia); Trombocitopenia; Mialgia. Em negrito destaca-se sintomas mais graves. Pontos azuis dispersos ao longo da imagem indicam as articulações passíveis de associação à poliartralgia. Pontos vermelhos destacam áreas onde múltiplos focos de dor ou inflamação estão próximos entre si, evidenciando regiões de maior impacto da infecção. **Fonte:** Adaptado de WEI *et al.*, 2024

A similaridade sintomática entre infecções causadas por arbovírus da mesma família, como o Chikungunya vírus (CHIKV), ou de famílias distintas, como o Dengue vírus (DENV), estabelece dificuldade para realização de um diagnóstico clínico diferencial, tornando essencial a utilização de métodos laboratoriais específicos para a correta identificação do agente etiológico envolvido (LOPES *et al.*, 2014). A dificuldade diagnóstica exemplificada por um estudo realizado durante um surto de Dengue em Sinop, no estado do Mato Grosso, no qual foram analisados 200 casos notificados, onde os resultados revelaram que apenas 20% dos casos, após análises laboratoriais, foram confirmados DENV, enquanto 3% foram diagnosticados como infecções pelo MAYV (VIEIRA *et al.*, 2015). Estima-se que aproximadamente 1% dos casos clinicamente diagnosticados como dengue na região norte da América do Sul sejam, na realidade, infecções causadas pelo MAYV, reforçando a necessidade de diagnósticos laboratoriais mais precisos para diferenciar os arbovírus circulantes e compreender melhor a epidemiologia do MAYV na região (MOTA *et al.*, 2015)

1.3.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A determinação diagnóstica precisa de casos de infecção por MAYV requer a aplicação de testes específicos para detecção específica de anticorpos ou sequências do material genético do MAYV. Dentre os principais métodos laboratoriais empregados na detecção desses vírus, os testes sorológicos e moleculares são considerados padrão-ouro devido à sua alta sensibilidade e especificidade (DIAGNE *et al.*, 2020). Os ensaios sorológicos de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima para imunoglobulina M (ELISA IgM) e o teste de neutralização por redução de placa de lise (PRNT), são amplamente utilizados para confirmação sorológica da infecção (NAPOLEÃO-PEGO *et al.*, 2014).

A detecção molecular do MAYV é considerada o método mais sensível e específico descrito na literatura, sendo frequentemente realizada em conjunto com a triagem para outros

arbovírus prevalentes, como DENV, ZIKV e CHIKV. Para essa detecção, a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) e sua versão quantitativa (RT-qPCR), são amplamente empregadas com primers específicos para sequências do MAYV para garantir a acurácia na identificação do agente etiológico (WEI *et al.*, 2024). Esse procedimento visa não apenas o diagnóstico diferencial, mas também a identificação de possíveis co-infecções, um fator relevante na compreensão da dinâmica epidemiológica dessas viroses (MORAIS *et al.*, 2023).

1.3.5. FORMAS PREVENTIVAS

Historicamente, foi focalizado como forma de prevenção e erradicação do *Aedes aegypti* a eliminação dos criadouros e da aplicação de inseticidas químicos, principalmente das classes dos organofosforados, organoclorados e piretroides (ARAÚJO *et al.*, 2023; BRAGA; VALLE, 2007). Entretanto, além de demandar constante esforço populacional e investimentos elevados, essa abordagem pode perder eficácia a longo prazo devido à rápida adaptação dos mosquitos. A resistência aos inseticidas é um problema crescente, uma vez que a seleção natural favorece indivíduos com mutações genéticas ou mecanismos metabólicos que reduzem sua suscetibilidade a essas substâncias (VARGAS *et al.*, 2022). No Brasil, populações de *Aedes aegypti* resistentes a esses inseticidas foram identificadas em todas as regiões do país, representando um desafio significativo para o controle vetorial (VALLE *et al.*, 2019).

A resistência aos inseticidas pode ter múltiplas causas, incluindo deficiências operacionais na aplicação dos produtos e influências de fatores biológicos/ ecológicos (ARAÚJO *et al.*, 2023). Como forma de mitigação, recomenda-se a realização de levantamentos geográficos sobre a resistência antes da aplicação dos inseticidas, bem como a implementação de rodízios periódicos entre diferentes substâncias, minimizando a seleção de populações resistentes (ASGARIAN *et al.*, 2023).



Figura 14: Esquema ilustrativo do processo de seleção da resistência de insetos a inseticidas. Inicialmente (primeiro quadrado da imagem), a população de insetos é majoritariamente composta por indivíduos suscetíveis (representados por ícone de inseto em preto), com poucos insetos resistentes (representados por ícone inseto em vermelho). Após a aplicação do inseticida (segundo quadrado), a maioria dos insetos suscetíveis é eliminada, enquanto os insetos resistentes sobrevivem e se reproduzem. Com sucessivas aplicações do inseticida (terceiro quadrado), a população torna-se predominantemente composta por insetos resistentes, evidenciando o fenômeno da seleção natural induzida pelo uso de inseticidas. **Fonte:**<https://www.irac-br.org/single-post/evolu%C3%A7%C3%A3o-da-resist%C3%A2ncia-aos-inseticidas>

Diante desse cenário, novas estratégias complementares ao controle químico têm sido investigadas. Uma abordagem promissora envolve a introdução da bactéria *Wolbachia spp.* em mosquitos *Aedes aegypti*, com o objetivo de reduzir a transmissão de arbovírus. Essa bactéria foi identificada pela primeira vez em 1924 por Hertig e Wolbach em tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* (HERTIG, WOLBACH, 1924) e tem sido amplamente estudada por seus efeitos nos hospedeiros. Um de seus mecanismos mais notáveis é a incompatibilidade citoplasmática, que impede a reprodução bem-sucedida quando um macho infectado copula com uma fêmea não infectada, resultando em ovos inviáveis (Figura 15) (BECKMANN *et al.*, 2017).

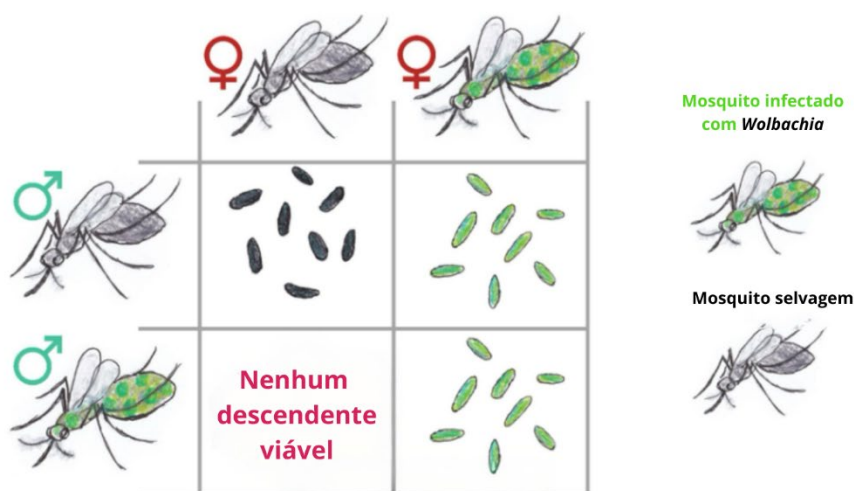


Figura 15: Efeito da infecção por *Wolbachia* na reprodução do *Aedes aegypti*. Representação esquemática dos padrões de compatibilidade reprodutiva entre mosquitos *Aedes aegypti* infectados com a bactéria *Wolbachia*. Os mosquitos estão esquematizados em selvagens não infectadas e infectados com *Wolbachia* de cinza e verde, respectivamente. Os símbolos em verde representam indivíduos do sexo masculino, enquanto os em vermelho indicam indivíduos do sexo feminino. A tabela apresenta diferentes alternativas de cruzamentos e seus resultados. **(A)** Acasalamento entre machos e fêmeas do tipo selvagem acarreta na oviposição de descendentes viáveis não infectados por *Wolbachia* (ovos escuros). **(B)** Cruzamento entre machos selvagens e fêmeas infectadas gera descendentes viáveis com transmissão vertical da bactéria (ovos verdes). **(C)** Acasalamento entre machos infectados com fêmeas do tipo selvagem resulta em ovos sem descendentes viáveis. **(D)** Cruzamento entre machos e fêmeas infectados leva à produção de descendentes viáveis infectados pela bactéria. **Fonte:** Adaptado de ROSS, Perran. *Wolbachia bacteria in action: how we're using naturally occurring bacteria to stop mosquitoes from spreading disease*. 2018. Disponível em: <https://blogs.unimelb.edu.au/pearg/2018/04/13/wolbachia-bacteria-in-action-how-were-using-naturally-occurring-bacteria-to-stop-mosquitoes-from-spreading-disease/>.

Ademais, determinadas cepas de *Wolbachia* são capazes de inibir a replicação de arbovírus nos mosquitos, como a cepa wAlBA, que impediu a transmissão do vírus Zika em *Ae. aegypti* (CHOUIN-CARNEIRO *et al.*, 2020), e a cepa wMelPop-CLA, que demonstrou uma redução na capacidade vetorial para o vetor para o vírus da dengue (PAN *et al.*, 2018). Esses efeitos são possivelmente atribuídos à ativação do sistema imunológico do mosquito, promovendo maior expressão de genes associados à resposta imune (CHENG *et al.*, 2021), ou da competição da *Wolbachia* com os arbovírus por recursos energéticos das células hospedeiras, reduzindo ainda mais a transmissão viral (LIN, RIKIHISA, 2003).

A liberação de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com *Wolbachia* tem sido adotada em diversos países, incluindo o Brasil, por oferecer vantagens sobre os pesticidas químicos, pois não há evidências de desenvolvimento de resistência do vetor à *Wolbachia*. No entanto, sua implementação requer planejamento detalhado, uma vez que a estabilidade da infecção

bacteriana nas populações naturais pode ser influenciada por fatores ambientais e ecológicos (GESTO *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2019).

1.4. LINHAGEM CELULAR AAG-2

As células imortalizadas de insetos têm sido ferramentas essenciais para o estudo de organismos, visto que são, para ciência, fáceis de manusear e cultivar. (GRACE, 1962). Essas linhagens celulares são modelos experimentais homogêneos e reprodutíveis, permitindo a detecção de mudanças sutis em diversos contextos biológicos. Por essa razão, várias linhagens celulares têm sido amplamente utilizadas para estudar a imunidade de insetos, incluindo a linhagem C6/36 de *Ae. albopictus*, Sua5B de *Anopheles gambiae*, S2 de *Drosophila melanogaster*, e LL5 de *Lutzomyia longipalpis*. Mais recentemente, a linhagem celular Aag-2, derivada de embriões de *Aedes aegypti*, tem se destacado como modelo para estudos imunológicos nesse vetor. Essas células são imunocompetentes e desencadeiam respostas contra diversos patógenos, incluindo bactérias como *Enterobacter cloacae* e *Micrococcus luteus*, fungos e vírus como o alfavírus Sindbis (BARLETTA *et al.*, 2012).

A relação entre as células Aag-2 e arbovírus, é particularmente relevante, pois essas células derivam de um mosquito com elevada capacidade vetorial, permitindo estudos mais controlados da interação vírus-vetor ao longo da infecção. A linhagem foi inicialmente desenvolvida na década de 1960 por Peleg, a partir de embriões de *Aedes aegypti*, e ao longo dos anos passou por adaptações (PELEG, 1968).

Em célula de mosquito, a defesa frente uma infecção viral se difere em relação a células de mamíferos por não possuir citocinas antivirais típicas de vertebrados, os interferons. Enquanto os mamíferos ativam uma resposta baseada em interferons diante de infecções virais, os mosquitos empregam respostas por vias como Toll, JAK-STAT, MAPK e o mecanismo de RNA de interferência (RNAi) como linha primária de defesa (TIKHE; DIMOPOULOS, 2021). O RNAi é iniciado pela detecção de RNA viral de fita dupla (dsRNA), frequentemente formado como intermediário de replicação viral ou por estruturas secundárias nos genomas virais. A enzima Dicer-2 faz parte desse mecanismo ao reconhece esses dsRNAs e os clivar em pequenos RNAs interferentes (siRNAs), de aproximadamente 21 nucleotídeos, que são então incorporados ao complexo de silenciamento induzido por RNA, o complexo RISC. O RISC, guiado pelos siRNAs, promove a degradação específica de RNAs virais complementares, suprimindo efetivamente a replicação viral (BLAIR, 2012).

Uma característica relevante que justifica a escolha da linhagem Aag-2 para estudos de infecção por arbovírus em mosquitos do gênero *Aedes* é a semelhança do perfil imunológico da linhagem à resposta imune do mosquito adulto (BARLETTA *et al.*, 2012). Onde, diferentemente da linhagem de *Ae. Albopictus*, C6/36, que apresenta deficiência da enzima Dicer-2, permite uma análise semelhante entre a resposta da linhagem com a resposta do mosquito, o que permite a Aag-2 uma escolha de modelagem mais precisa da interação entre o vírus e o sistema imunológico da espécie, tornando essa linhagem uma alternativa para estudos dos mecanismos envolvidos na resposta antiviral do vetor (FREDERICKS *et al.*, 2019; SCOTT *et al.*, 2010).

Durante seu cultivo, essas células apresentam morfologias variadas, devido à diversidade de tipos celulares presentes nos embriões do mosquito (FREDERICKS *et al.*, 2019; WALKER *et al.*, 2014). Em geral, possuem um formato fusiforme, com formação de aglomerados de células e células flutuantes acima da monocamada (Figura 16) (FREDERICKS *et al.*, 2019). O aparecimento de células multinucleadas resultantes de fusão de membranas plasmáticas, conhecido por sincícios, é descrito como um possível efeito citopático característico de infecção por arbovírus, como alfavírus, nessa linhagem (VASCONCELLOS *et al.*, 2020; VASCONCELLOS *et al.*, 2022).

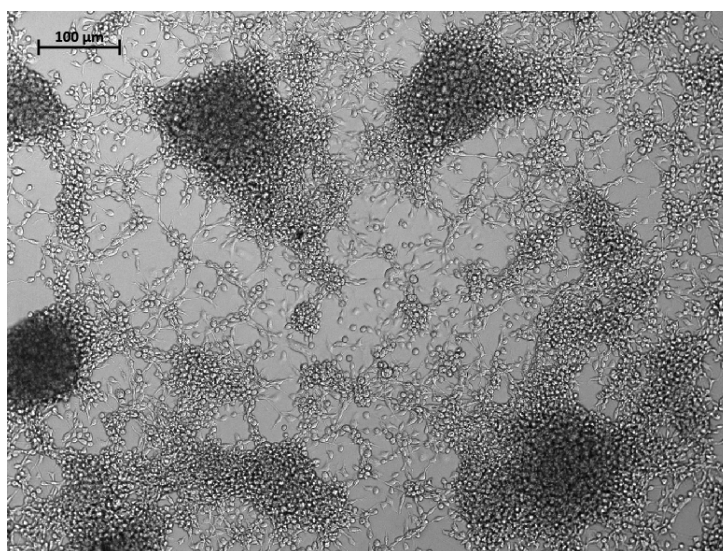


Figura 16: Linhagem Aag-2. Imagem de microscópio óptico em aumento de 20 X. Células fusiformes, dispostas individualmente e agrupadas, formando grumos. **Fonte:** Acervo pessoal.

Além disso, as células Aag-2 são naturalmente infectadas por vírus específicos de insetos, que circulam no meio ambiente e no próprio mosquito. Entre esses vírus estão Cell fusing agent virus (CFAV; família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*) (STOLLAR; THOMAS, 1975) e o Phasi

Charoen-like virus (PCLV; família *Phenuiviridae*, gênero *Phasivirus*) (MARINGER *et al.*, 2017). Esses vírus podem ter sido introduzidos na linhagem celular durante seu estabelecimento inicial ou posteriormente, através de colônias de mosquitos infectados em laboratório ou amostras ambientais (FREDERICKS *et al.*, 2019). Além do CFAV e do PCLV, outros vírus específicos de insetos já foram detectados em infecção persistente na linhagem Aag-2, incluindo o *Aedes anphevirus* (AeAV) (PARRY; ASGARI, 2018) e o *Culex Y virus* (CYV) (FRANZKE *et al.*, 2018).

A presença desses vírus específicos de insetos pode influenciar a competência vetorial de *Ae. aegypti* para a transmissão de arbovírus, sendo um fator de interesse na pesquisa sobre arboviroses. Esse quadro infeccioso viral pode aumentar, reduzir ou não apresentar impacto na capacidade do mosquito de transmitir arbovírus, dependendo da combinação entre a linhagem celular, o arbovírus e o vírus específico de inseto presente na infecção persistente (FREDERICKS *et al.*, 2019).

1.5. BIOQUÍMICA DA INFECÇÃO E O METABOLISMO DE OXIGÊNIO

Durante a infecção em mosquitos, os alfavírus são capazes de modular o ambiente da célula hospedeira para favorecer a replicação viral de modo a subverter o funcionamento de estruturas celulares, a reprogramação da expressão de genes celulares em níveis transcricional e traducional, e o funcionamento de organelas tais como corpos gordurosos, mitocôndria e peroxissomos (ABRANTES, 2020; SANCHEZ; LAGUNOFF, 2015; FRITSCH; WEICHHART, 2016). No caso do CHIKV, ocorre a formação de vesículas citoplasmáticas a partir da reorganização de membranas intracelulares, constituindo compartimentos especializados que preservam o genoma viral e facilitam a replicação dentro da célula hospedeira (LAURENT *et al.*, 2022). Paralelamente, o SINV é capaz de reprogramar o metabolismo da célula infectada, promovendo uma maior dependência da glicólise aeróbica, com o objetivo de suprir a elevada demanda energética associada à replicação viral (COSTA *et al.*, 2012). Já a infecção pelo vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) provoca disfunções mitocondriais significativas, incluindo danos na cadeia transportadora de elétrons (CTE), o que resulta em aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e redução da capacidade bioenergética mitocondrial, contribuindo para a disfunção metabólica celular (KECK *et al.*, 2017).

1.5.1. VIAS METABÓLICAS PARA A PRODUÇÃO DE ATP

A mitocôndria (Figura 17a) é uma organela que participa de processos importantes para a regulação de mecanismos celulares, com funções fundamentais para a homeostase celular, sendo uma delas, a produção de energia em forma de trifosfato de adenosina (ATP) na respiração celular (NELSON, 2014). A produção de ATP ocorre pela ação da cadeia transportadora de elétrons (CTE), um complexo proteico formado pelos complexos I, II, III e IV, e pela ATP-sintase (PIAZZI, 2021). Nesse processo, os elétrons produzidos durante o ciclo do ácido cítrico (CAC) são carregados na matriz mitocondrial por aceptores universais para a membrana interna, onde os elétrons passam pelos complexos da CTE. Os elétrons obtidos durante a oxidação do NADH, no complexo I, funcionam como energia para o bombeamento de prótons para o espaço intramembranar e são carregados para o complexo III pela ação da coenzima Q. A coenzima Q, ou ubiquinona, carregado com elétrons obtidos no complexo I e no complexo II, pela oxidação do succinato com o sítio do FADH₂, chega no complexo III, e é oxidada para impulsionar a transferência de prótons, transferindo elétrons para a citocromo C, que finaliza do processo da cadeia transportadora de elétrons passando pelo complexo IV e contribuindo também para o acúmulo de prótons no meio intracelular (PIAZZI, 2021).

Com o meio intracelular concentrado após a ação cadeia de transporte de elétrons, a ATP-sintase permite a entrada de prótons para a matriz mitocondrial pelo gradiente de concentração. Ao passar pelo interior da proteína, o fluxo de H⁺ permite a rotação da proteína e realiza a ligação entre a adenosina difosfato (ADP) e o fosfato (P), compostos químicos presentes em seu interior, e ocorre a síntese de ATP (NELSON, 2014) (Figura 17b).

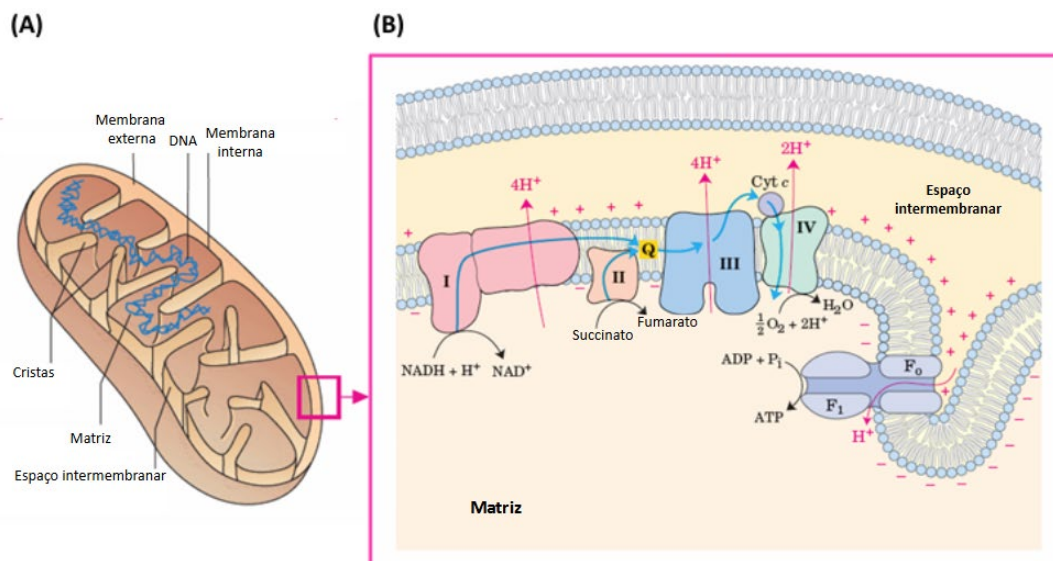


Figura 17: Aspectos morfológicos e metabólicos das mitocôndrias. (A) Representação esquemática da estrutura de uma mitocôndria. Na superfície da membrana interna, nas cristas, encontram-se os complexos proteicos responsáveis pela cadeia transportadora de elétrons (Complexos I, II, III e IV) e pela fosforilação oxidativa (ATP-sintase). (B) Ilustração esquemática do mecanismo eletroquímico para a síntese de ATP na mitocôndria. Os elétrons movem-se por uma cadeia de transportadoras ligados a membranas espontaneamente, governados pelo alto potencial de redução do oxigênio que sofre oxidação na mitocôndria. O fluxo de elétrons cria um potencial eletroquímico pelo movimento transmembrana de prótons e carga positiva. Esse fluxo de elétrons resulta na translocação de prótons através da membrana interna, criando um gradiente eletroquímico que impulsiona a síntese de ATP pela enzima ATP-sintase na membrana interna da mitocôndria. **Fonte:** Adaptado de NELSON, 2014.

1.5.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

Além de sua função primordial na produção de energia, as mitocôndrias desempenham funções essenciais na atividade antiviral, na regulação do ciclo celular e no controle da morte celular (NELSON, 2014). Ela é caracterizada por representar a principal fonte de EROs no organismo, onde, durante a CTE, quando os elétrons não são eficientemente capturados, ocorre a reação com moléculas de oxigênio presentes na matriz mitocondrial (TURRENS, 2003) Esse processo inicia-se com a conversão do oxigênio molecular (O_2) em ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), seguido pela formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, posteriormente, do radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) (NELSON, 2014) (Figura 18).

As EROs são moléculas altamente reativas formadas a partir da transferência de elétrons ao oxigênio e são essenciais para diversas funções fisiológicas, incluindo sinalização celular,

regulação de citocinas e apoptose (TEIXEIRA, 2015; TURRENS, 2003). Essas moléculas participam da regulação de fatores de crescimento, da ativação de vias de resposta imune e da eliminação de patógenos, contribuindo para a defesa do organismo (CAMINI *et al.*, 2017).

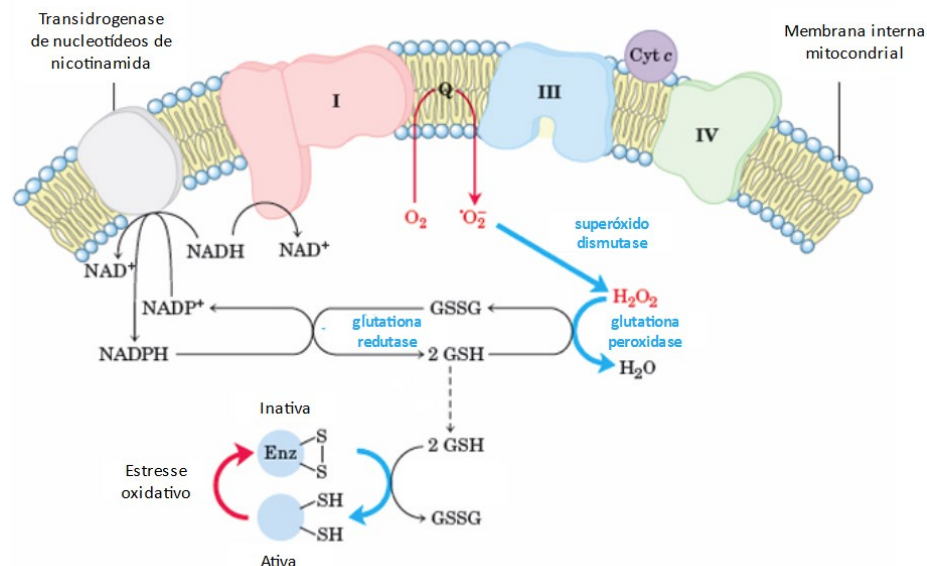


Figura 18: Geração de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias e sistema antioxidante mitocondrial.

Em situações que o fluxo de elétrons não está em harmonia com a cadeia respiratória, o vazamento de elétrons é acentuado, com isso, a produção do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) aumenta nos complexos I e III à medida que o radical ubiquinona (Q) parcialmente reduzido doa um elétron para o oxigênio (O_2). Ainda, a enzima aconitase leva a formação do do radical hidroxil (COH), fortemente reativo. O sistema antioxidante também atuante pela glutatona reduzida (GSH) doa elétrons para a redução de H_2O_2 e dos resíduos oxidados de cisteína de enzimas e outras proteínas. O GSH é regenerado a partir da forma oxidada (GSSG) por redução utilizando NADPH. **Fonte:** Adaptado de Nelson, 2014

No entanto, sua produção excessiva pode desencadear uma super ativação de vias intracelulares associadas ao desenvolvimento de patologias. Esse desequilíbrio compromete o sistema antioxidante celular, favorecendo o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo e impactando negativamente funções biológicas fundamentais para o funcionamento da célula, como danos estruturais ao DNA, com formação de lesões mutagênicas, ligações cruzadas entre proteínas e ácidos nucleicos, além da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (CAMINI *et al.*, 2017; DEMIRCI-ÇEKİÇ *et al.*, 2022).

A peroxidação lipídica ocorre por meio de uma reação em cadeia, essencialmente autocatalítica, dividida em três fases distintas: iniciação, propagação e terminação. Esse processo compromete diretamente a integridade das membranas celulares, uma vez que afeta os ácidos graxos poli-insaturados que compõem a bicamada lipídica, resultando em perda de

fluidez, aumento da permeabilidade e possíveis alterações na funcionalidade celular. (GASCHLER; STOCKWELL, 2017)

Na fase de iniciação, o radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$) ou o ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), radicais livres altamente reativos, ataca um ácido graxo poli-insaturado presente na membrana celular. Esse ataque leva à abstração de um átomo de hidrogênio da cadeia alifática do ácido graxo, resultando na formação de um radical lipídico instável ($\text{L}\bullet$). Esse radical possui alta afinidade pelo oxigênio molecular, promovendo a entrada de O_2 na reação e levando à formação do radical peroxila ($\text{LOO}\bullet$), que representa um intermediário altamente reativo e capaz de oxidar outras moléculas lipídicas ao seu redor (BURTON, INGOLD, 1989).

A fase de propagação ocorre quando os radicais peroxila ($\text{LOO}\bullet$) reagem com outros ácidos graxos poli-insaturados, removendo-lhes um átomo de hidrogênio e formando novos radicais lipídicos ($\text{L}\bullet$). Esse mecanismo gera um efeito em cadeia, amplificando o dano oxidativo ao longo da membrana celular. Além disso, durante essa etapa, ocorrem transformações estruturais nos fosfolípidios de membrana, afetando sua organização espacial e, conseqüentemente, a funcionalidade de proteínas integrais e periféricas associadas à bicamada lipídica (BURTON, INGOLD, 1989). A peroxidação lipídica também resulta na produção de compostos secundários altamente reativos, como aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos voláteis. O malondialdeído (MDA) eum dos principais produtos finais da degradação lipídica, sendo frequentemente utilizados como biomarcadores do estresse oxidativo e do nível de peroxidação lipídica em células e tecidos biológicos (GROTTO *et al.*, 2008).

Por fim, a fase de terminação ocorre quando dois radicais livres se combinam, formando um produto final estável e encerrando a reação em cadeia. Essa terminação pode acontecer pela interação entre dois radicais peroxila ($\text{LOO}\bullet$), pela combinação de um radical lipídico com um antioxidante lipossolúvel, como a vitamina E (α -tocoferol), ou pela ação de sistemas enzimáticos antioxidantes, como a glutathiona peroxidase (GPx). No entanto, se o processo de terminação não ocorre de maneira eficiente, a continuidade da propagação dos radicais peroxila pode resultar em danos irreversíveis à célula, incluindo apoptose ou necrose, além de favorecer a indução de respostas inflamatórias exacerbadas (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). A figura 19 abaixo demonstra as etapas da lipoperoxidação de forma esquematizada.

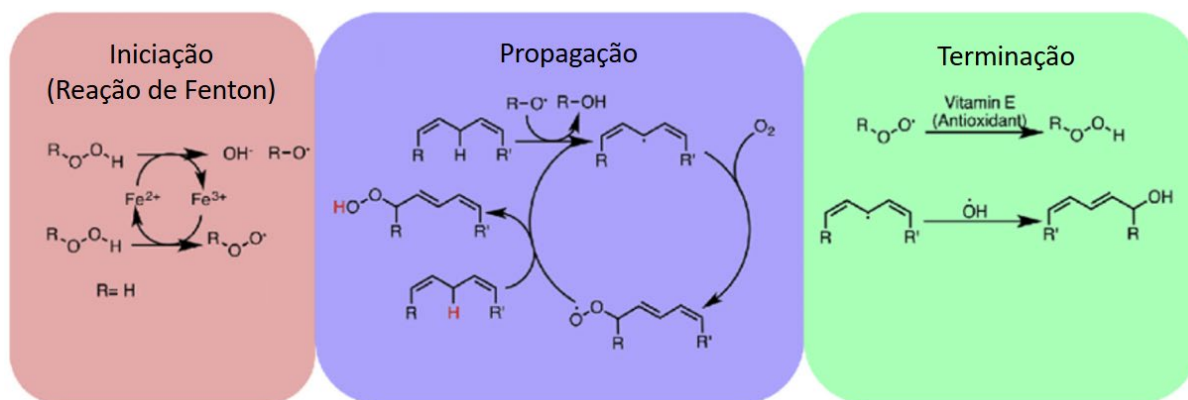


Figura 19: Fases da lipoperoxidação. Na etapa de iniciação (quadro vermelho), os primeiros radicais são gerados pelo ferro lábil redox ativo. Na etapa de propagação (quadro roxo), os radicais são capazes de reagir com novos substratos, criando novos radicais. A etapa de propagação se repete até a etapa de terminação (quadro verde), na qual os radicais são "extintos" por antioxidantes ou reagem com outro radical. **Fonte:** Adaptada de GASCHLER; STOCKWELL, 2017

O impacto da peroxidação lipídica vai além do comprometimento estrutural das membranas celulares, afetando também processos intracelulares essenciais. A presença de produtos finais da lipoperoxidação pode desencadear modificações na expressão gênica, ativar vias pró-inflamatórias e alterar a sinalização celular. A formação de aldeídos pode interagir covalentemente com macromoléculas biológicas formando adutos que contribuem para disfunções metabólicas e instabilidade genômica, processos associados a diversas patologias degenerativas e inflamatórias crônicas (GASCHLER; STOCKWELL, 2017).

1.5.3. SISTEMA ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são substâncias que, mesmo em baixas concentrações, são capazes de retardar ou impedir a oxidação de substratos oxidáveis. No organismo, a presença dessas moléculas combate os danos provocados pelas EROs, evitando a propagação de reações em cadeia que poderiam comprometer a função celular (CHENG *et al.*, 2021).

O sistema antioxidante é um dos mecanismos fundamentais de defesa do organismo contra os danos causados pelo excesso de EROs. (CHENG *et al.*, 2021). Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que desempenham papéis essenciais na proteção celular ao eliminar ou transformar radicais livres, promovendo o equilíbrio redox e preservando a integridade das células e tecidos (CAMINI *et al.*, 2017; DEMIRCI-ÇEKİÇ *et al.*, 2022) (Figura 20).

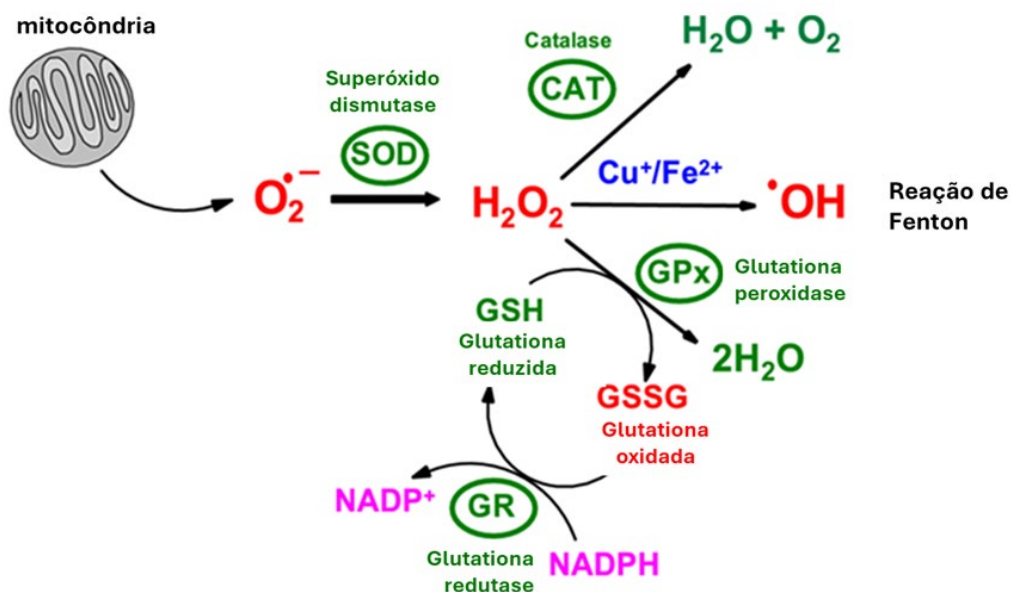


Figura 20: Ação conjunta das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no controle do estresse oxidativo. Esquema ilustrativo do sistema enzimático antioxidante responsável pela neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula. A superóxido dismutase (SOD) converte os ânions do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um intermediário menos reativo. A catalase (CAT) atua no controle do nível fisiológico de H_2O_2 , convertendo-o em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Paralelamente, a glutathiona peroxidase (GPx) reduz o H_2O_2 a H_2O , utilizando como substrato a glutathiona reduzida (GSH), que, durante essa reação, é convertida na sua forma oxidada, o dissulfeto de glutathiona (GSSG). A enzima glutathiona redutase (GR) regenera GSH a partir de GSSG, utilizando NADPH como doador de elétrons, garantindo a manutenção do equilíbrio redox celular. O peróxido de hidrogênio também pode reagir com íons metálicos, como Fe^{2+} e Cu^+ , na Reação de Fenton, gerando o radical hidroxila ($\bullet OH$), altamente reativo e citotóxico. **Fonte:** adaptado de JOMOVA *et al.*, 2024

O sistema antioxidante pode atuar por meio de moléculas orgânicas não enzimáticas ou por enzimas que convertem essas espécies reativas em substâncias menos nocivas ao organismo. Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), que atuam prevenindo ou controlando a formação de radicais livres, reduzindo sua propagação e o consequente aumento dos danos oxidativos (CHENG *et al.*, 2021; JOMOVA *et al.*, 2024). Já os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos de origem dietética, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos, que desempenham um papel crucial na neutralização dos radicais livres. O ácido ascórbico, o α -tocoferol, o β -caroteno e a glutathiona possuem alto potencial antioxidante, assim como outros carotenoides, como licopeno, luteína e zeaxantina. Entre os minerais, destacam-se cobre, zinco, selênio e magnésio, que atuam como cofatores de enzimas antioxidantes, fortalecendo o sistema de defesa contra o estresse oxidativo (KOH *et al.*, 2011).

A glutathiona, um tripeptídeo composto por glicina, cisteína e glutamato (Figura 21), é encontrada em elevadas concentrações no citoplasma celular e se destaca como um dos

antioxidantes mais importantes sistemas de defesa, onde sua principal função está na neutralização de espécies reativas de oxigênio por meio da sua conversão da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG), um processo catalisado pela Gpx (PIZZORNO, 2014)

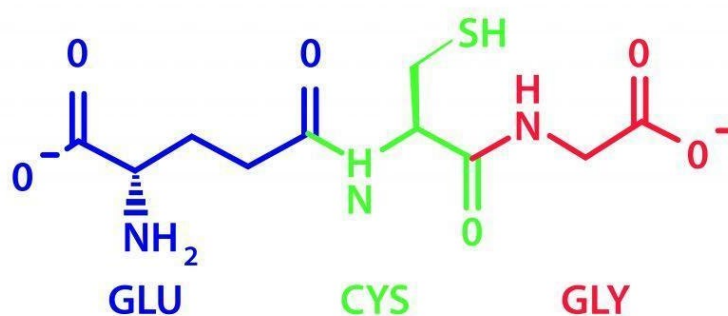


Figura 21: Estrutura química da glutathione. A glutathione é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamato (GLU), cisteína (CYS) e glicina (GLY). A glutathione desempenha um papel essencial na proteção celular contra o estresse oxidativo, atuando como um antioxidante endógeno. Na imagem, cada aminoácido está representado por uma cor distinta: GLU (azul), CYS (verde) e GLY (vermelho). **Fonte:** <https://laboratoriodovalle.com.br/saiba-tudo-sobre-o-antioxidante-mais-poderoso-do-organismo-4/>

A SOD é uma das principais enzimas antioxidantes, responsável pela conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, reduzindo sua toxicidade celular. No organismo humano, existem diferentes isoformas dessa enzima, como por exemplo a Cu/ZnSOD, localizada no citosol, lisossomas, núcleo e no espaço intermembrana mitocondrial e a MnSOD, encontrada exclusivamente na matriz mitocondrial, onde atua na proteção contra os danos causados pelas EROs geradas durante o metabolismo aeróbico (CARVALHO-MARTINS *et al.*, 2022) (Figura 22) A maioria das análises de atividade da SOD é realizada de maneira indireta, utilizando-se sistemas geradores de ânion superóxido, para avaliar sua capacidade de neutralização (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1994).

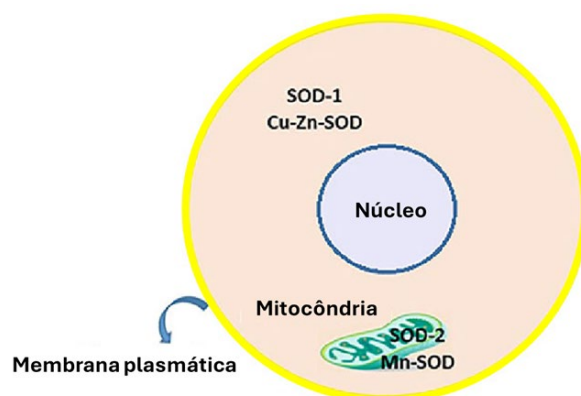


Figura 22: Distribuição celular das isoformas de superóxido dismutase. A mostra a localização celular de duas das isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) encontradas em organismos eucarióticos. A enzima SOD Cu/Zn é encontrada no citoplasma e a enzima SOD Mn está presente nas mitocôndrias. **Fonte:** Adaptado de CARVALHO-MARTINS *et al.*, 2022.

A CAT é outra enzima antioxidante essencial, cuja função principal é a decomposição do H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio molecular O_2 , prevenindo sua conversão em radicais altamente reativos, como o radical hidroxila ($HO\cdot$). Seu sítio ativo contém um grupo heme, o que a torna altamente eficiente nesse processo. Sua localização está predominantemente em maior quantidade nos peroxissomos, organelas responsáveis pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, mas também pode ser encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (BARRA *et al.*, 2010). Os protocolos mais utilizados para avaliar a atividade enzimática incluem a medição da diminuição da concentração de H_2O_2 e a geração de oxigênio como subproduto da reação (HADWAN, 2018).

Os antioxidantes também podem ser classificados de acordo com sua atuação na peroxidação lipídica. Os antioxidantes primários interrompem a cadeia de reações envolvidas nesse processo, doando elétrons ou hidrogênio aos radicais livres e convertendo-os em compostos mais estáveis. Já os antioxidantes secundários atuam retardando a taxa de iniciação da oxidação, decompondo hidroperóxidos e reduzindo a propagação dos danos oxidativos nas membranas celulares e lipoproteínas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Dentre as principais enzimas antioxidantes encontradas nos mosquitos, a SOD e a CAT estão entre as enzimas mais abundantes e ativas em *Ae. aegypti*, particularmente em condições de estresse oxidativo, como após a ingestão de sangue, enquanto a glutathione S-transferase, que desempenha função de detoxificação na conjugação de compostos, e a GPx também são expressas, mas exibem variações de atividade conforme o estágio fisiológico do inseto (CHENG *et al.*, 2021; SAEAEUE *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Existem opções limitadas para o tratamento de doenças causadas por alfavírus em mamíferos. Entretanto, a infecção causada por um alfavírus em seu vetor não causa sintoma aparente de infecção; é dizer, talvez a resposta para a doença em mamífero esteja na interação inócua entre o vírus e o inseto, estudo este que tende a ser negligenciado em comparação com a interação arbovírus-mamífero. Compreendendo melhor a manipulação dos alfavírus no metabolismo da célula hospedeira, novos alvos de drogas antivirais podem ser descobertos com objetivo de parar ou reduzir muitas infecções virais patogênicas. Poucos estudos na interação alfavírus-célula de inseto estão disponíveis e a maioria se restringe ao estudo de SINV que frequentemente é usado como protótipo dos alfavírus (HERNANDEZ *et al.*, 2010). Assim como os vírus da Chikungunya e da Dengue, não se pode excluir que o vírus Mayaro possa um dia se tornar um grande problema para a saúde pública por possuir predisposição em usar os mosquitos do gênero *Aedes* como vetor e sua similaridade sintomática com as outras arboviroses populares transmitidas pelos vetores. Atualmente, estudos sobre a patogênese e mecanismo de transmissão do MAYV ainda são negligenciados e há escassez de informação na literatura sobre a influência do vírus sobre as organelas do hospedeiro invertebrado.

Considerando esse contexto, surge a hipótese que as células de mosquito, especificamente da linhagem Aag-2, conseguem tolerar a infecção pelo Mayaro vírus devido a mecanismos eficientes de controle da homeostase redox. Corroborando essa ideia, um estudo proteômico conduzido por Vasconcelos et al. (2020) demonstrou que a infecção pelo Mayaro, M.O.I. 1, promoveu alterações na tradução de proteínas relacionadas ao metabolismo redox, metabolismo energético e defesa celular em células Aag-2, sugerindo que tais modificações poderiam representar uma resposta celular frente a um possível estado estresse oxidativo induzido pela infecção, reforçando a importância de se investigar os mecanismos de regulação redox e metabolismo energético durante a infecção em células de inseto.

Portanto, pesquisas sobre a modulação da infecção viral sobre a mitocôndria das células do mosquito é viável para maior entendimento do processo patológico do vírus e compreender a resistência do vetor a não desenvolver sintomas do MAYV. O uso de técnicas para avaliar o consumo de oxigênio, mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio e a influência da infecção sobre o estresse oxidativo das células podem responder tais questionamentos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da infecção pelo vírus Mayaro (MAYV) em células Aag-2 de *Aedes aegypti*, com ênfase na resposta antioxidante, na função mitocondrial e em alterações da homeostase redox, visando compreender os mecanismos que promovem a replicação viral e a persistência da infecção pelo MAYV no vetor.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar aspectos citomorfológicos e ultraestrutural em linhagem celular Aag-2 infectadas por MAYV.
- Quantificar a produção de EROs em células Aag-2 infectadas em diferentes tempos pós-infecção, analisando o impacto na homeostase redox por meio de análise de lipoperoxidação e oxidação de glutathione (GSH).
- Avaliar a atividade das principais enzimas do sistema antioxidantes, como SOD, CAT e GPx em células infectadas por MAYV em diferentes tempos pós-infecção, comparando com células não-infectadas
- Caracterizar o perfil de consumo de oxigênio e a atividade mitocondrial em células de mosquitos infectadas por MAYV, a fim de compreender os impactos na função organelar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CÉLULAS E VÍRUS

As células Aag-2 (linhagem derivada do ovário de fêmeas de *Aedes aegypti*) foram cultivadas a 27 °C em meio TC-100 (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e 10% meio Schneider (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil). Células Vero (linhagem obtida de rins de macaco-verde da África) foram cultivadas em meio Leibovitz-15 (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa de 37° C com 5% de CO₂. Os meios suplementados apresentaram antibiótico (Sulfato de Gentamicina, 50 mg/L) e antimicótico (Anfotericina B, 25 µg/ml). Ambas as linhagens foram cultivadas em frascos de cultura T25 ou T75 (KAVSI, Pinhais, PR, Brasil) a depender do experimento.

No presente trabalho, foi utilizado para os experimentos um isolado registrado no banco de dados ‘American Type Culture Collection’ (ATCC), cepa TRVL 4675, obtida a partir de um pool como soro de humanos infectados por vírus Mayaro no Caribe, na ilha de Trindade, no ano de 1954. Uma alíquota foi gentilmente cedida pela Dra. Iranaia Assunção Miranda (UFRJ) e essa foi considerada a passagem 0 (P0). Para amplificação do estoque viral, 100 µL do inóculo viral de ambos os isolados foram adicionados em frascos de cultura T75 (KAVSI, Pinhais, PR, Brasil) em linhagem células C6/36, proveniente de *Aedes albopictus*, em meio TC-100 em confluência de 80%. As células foram incubadas e a infecção avaliada em microscópio de luz (Axiovert 100 Operating Manual, Zeiss). Após 8 d p.i., os sobrenadantes foram coletados em falcon estéril de 50 ml, centrifugados a 7.000 x g por 10 min para remoção de restos de células e células flutuantes, e transferidos para um falcon estéril. Este estoque foi considerado a passagem 1 (P1).

A titulação viral foi definida por ensaio de diluição de ponto final (do inglês, ‘endpoint dilution assay’). O estoque P1 foi diluído diferentes diluições virais, entre 10⁻² a 10⁻¹², e inoculadas em poços contendo monocamada de células Vero em uma placa de 96 poços e após o período de infecção, os poços são visualizados em microscópio ótico e marcando as diluições que houve alterações a nível morfológico das células. O título obtido é definido como dose letal para infectar 50% das células (TCLC50). A relação estatística de conversão da dose letal

para unidade formadora de placas (UFP). A titulação viral do MAYV ATCC P1 foi de $2,3 \times 10^7$ vírus/mL.

4.2. COLETA DAS CÉLULAS E LISE CELULAR

Para a realização dos experimentos com linhagem derivada de insetos, as células foram coletadas dos frascos cultura, T25 ou T75, com batidas mecânicas na garrafa e, com o próprio meio contido no frasco e com o auxílio de uma pipeta, feito a descamação das células do fundo da garrafa numa confluência de 80-90%. As células foram transferidas para um tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugado a $7.000 \times g$ por 10 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes das células, controle ou infectadas, foram descartados e o sedimento presente no tubo foi ressuspensionado em 1 mL de tampão Salina Fosfato (PBS) 1X pH 7,2 (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM e KH_2PO_4 1,8 mM) para hidratá-lo e depois completado com mais 4 mL do tampão para mais um ciclo de centrifugação de $7.000 \times g$ por 10 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante de todos os tubos e novamente o sedimento foi ressuspensionado com 2,5 mL de PBS na concentração 1X. Da ressuspensão, foi distribuído 250 μL em tubo de microcentrífuga designados para cada teste. Na microcentrífuga, os microtubos foram expostos a mais um ciclo de centrifugação de $7.000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos de cada microtubo foi ressuspensionado em tampão específico para cada teste, conforme esquematizado na tabela 1.

Tabela 1 - Tampão utilizado para solubilizar as amostras para cada teste.

TESTE	TAMPÃO
Bradford	Tampão Salina Fosfato 1X pH 7,2
Catalase	Tampão Fosfato de potássio 50 mM pH 7
Espécies Reativas de Oxigênio	Tampão fosfato de sódio 75 mM pH 7,5
Glutathione	Tampão Fosfato de potássio 0.1 M pH 8
Superóxido dismutase	Tampão Salina Fosfato 1X pH 7,2
Substâncias Reativas ao Ácido	
Tiobarbitúrico (TBARS)	Tris HCl 50 mM pH 7,4

Em ensaios que seja necessário medir conteúdo do meio intracelular, as células passaram por um processo de lise para ruptura da membrana e liberação de moléculas, possibilitando a realização dos testes voltados à mensuração das enzimas do sistema antioxidante SOD e CAT, e para quantificação de proteínas. Esse processo foi realizado por sonicação para rompimento das membranas das células presentes na amostra no equipamento SONOPULS HD 2200 (BANDELIN, Berlim). No sonicador, as amostras foram expostas a 3 ciclos de 5 segundo na menor potência do equipamento com intervalo de 10 segundo entre cada ciclo das amostras no gelo.

4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise ultraestrutural, 1 mL de suspensão de células Aag-2, tanto controle quanto infectadas com MAYV, foram coletadas em diferentes tempos pós-infecção (24, 48 e 72 horas) e fixado por 2 horas a 4 °C com solução de Karnovsky (2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2. Após a fixação primária, as células foram submetidas por 30 minutos a solução de tetróxido de ósmio 2% e ferrocianeto de potássio 0,8% (10 mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio 0,2 M) em proporção 1:1. O material foi lavado com água destilada duas vezes por centrifugação a 7.000 x g por 5 minutos e submetido a contraste *in block* em solução de acetato de uranila 0,5% por 16 horas a 4 °C. Posteriormente, as amostras passaram por processo de desidratação em uma série gradativa de acetona (30–100%) por intervalos de 15 minutos para assim, iniciar o processo de inclusão da amostra com resina. As amostras foram embebidas inicialmente com Acetona e resina Spurr (2:1), mantidas em rotação constante por 14-16 horas, acetona e resina (1:1) por 6 h; acetona e resina (1:2) 14-16 h e resina pura por no máximo 6 h com a tampa do microtubo aberta para a evaporação de todo o resquício de acetona. As amostras são colocadas na estufa a 65 °C por 2 ou 3 dias. Os cortes ultrafinos foram analisados em um Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM-1011 (JEOL, Japão).

4.4. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR BRADFORD

Para normalização dos resultados, o conteúdo de proteínas das amostras foi quantificado pela metodologia que consiste na ligação do corante azul brilhante de Coomassie às proteínas presentes, causando uma alteração na coloração do corante (BRADFORD, 1976). A

absorbância foi mensurada no comprimento de onda de $\lambda = 600$ nm. Albumina de soro bovino (BSA) 0,5 mg/ml foi utilizado como padrão.

4.5. MENSURAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram aferidos nas células Aag-2 controle e infectadas com MAYV em diferentes tempos de infecção de pelo uso de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), um marcador fluorogênico que, ao ser quebrado por esterases intracelulares não específicas, é transformado em diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) que gera fluorescência ao reagir com as espécies reativas presentes nas células (BONINI *et al.*, 2006). O experimento foi realizado com placas de 96 poços preta com aproximadamente 1×10^5 células por poço. Para análise das células infectadas, foi utilizado um M.O.I de 5 do isolado viral e as triplicatas biológicas foram analisadas 24, 48 e 72 horas após a infecção. Em cada poço foi adicionado 193 μ L de tampão fosfato de sódio 75 Mm (pH 7,5) e 3 μ L das células infectadas ou não infectadas para atingir o volume mínimo de trabalho. Depois, foi adicionado nos poços 2 μ L de 0,5 mM H₂DFDA e, imediatamente, iniciado a leitura da fluorescência de modo cinético em 25 minutos com intervalos de 30 segundos para leitura do poço. As amostras foram determinadas pela intensidade da fluorescência detectada após excitação de 475 nm e emissão de 525 nm no aparelho GloMax (Promega, Madison, WI, EUA).

4.6. ENSAIO BIOQUÍMICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE

Para avaliar a influência da infecção sobre a produção de uma das principais enzimas antioxidante que apresentam um papel importante na defesa celular contra as espécies reativas geradas em condição de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD), células Aag-2 foram coletadas dos frascos de cultura T75 e lisadas por sonicação conforme descrito previamente, e dispostas em placa de 96 poços (KASVI, Pinhais, PR, Brasil).

A atividade da SOD foi detectada espectrofotometricamente, com base na inibição da formação de adrenocromo, decorrente da oxidação da epinefrina pela ação da SOD (MIRSA; FRIDOVICH, 1972). No dia do experimento, preparou-se o tampão de carbonato de sódio 57,7 mM e mantido em temperatura constante de 30° C. Antes da leitura das amostras, uma curva basal foi realizada com bitartarato de epinefrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 6 mM

para verificar sua eficiência em microplaca de 96 poços. A absorbância foi medida cineticamente em intervalos de dez segundos, durante dois minutos, a um comprimento de onda de $\lambda = 490$ nm. Em seguida, as amostras foram adicionadas nos poços e a leitura se inicia imediatamente após a pipetagem da epinefrina. Os resultados foram expressos em absorbância de 490 nm por μg de proteína.

4.7. ENSAIO BIOQUÍMICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATALASE.

A mensuração da atividade da enzima catalase nas células foi padronizada para microplaca, seguindo uma adaptação da metodologia proposta por Hadwan (2018). As células Aag-2 foram coletadas dos frascos de cultura T75 e lisadas por sonicação conforme descrito previamente, e, antes da disposição das células na placa de 96 poços (KASVI, Pinhais, PR, Brasil), o material foi exposto a 40 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10 mM em um microtubo de 1,5 mL e incubado em banho-maria por 2 minutos a 37 °C. Após a incubação, 240 μL da solução de trabalho carbonato-cobalto, composta por 1 mL de solução de nitrato de cobalto II, 1 mL de solução de hexametáfosfato de sódio e 18 mL de solução de bicarbonato de sódio, foi adicionada ao microtubo, homogeneizada e, em seguida, 200 μL foram transferidos para os respectivos poços da placa. Na presença de bicarbonato de sódio, o peróxido de hidrogênio atua como agente oxidante sobre o cobalto II, convertendo-o em cobalto III e formando o complexo carbonato-cobalto III, que apresenta coloração esverdeada. A placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e em local isento de luz. A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro GloMax (Promega, Madison, WI, EUA), no comprimento de onda de $\lambda = 440$ nm e os resultados foram expressos em kU da atividade da catalase por μg de proteína.

4.8. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA

O conteúdo de glutathione (GSH) foi determinado usando um método cinético baseado na reação do fluoróforo orto-ftalaldeído (OPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que reage com a GSH presente no sobrenadante após a lise celular (SENFT *et al.*, 2000) (Figura 23). Para o ensaio, as células Aag-2 foram infectadas com MAYV, lisadas com ácido perclórico (HClO_4), após 24, 48 e 72 horas, e transferidas para uma placa de 96 poços preta. Antes da leitura das amostras, uma curva basal foi realizada com Glutathione Reduzida (UBS) 0.1 mM

para validação do teste. Em cada poço da placa, foi pipetado 20 μ L de OPA e incubada por 10 minutos. A intensidade da fluorescência foi detectada a excitação a 475 nm e emissão a 525 nm no GloMax (Promega). Os resultados do teste foram expressos em nmol por μ g de proteína.

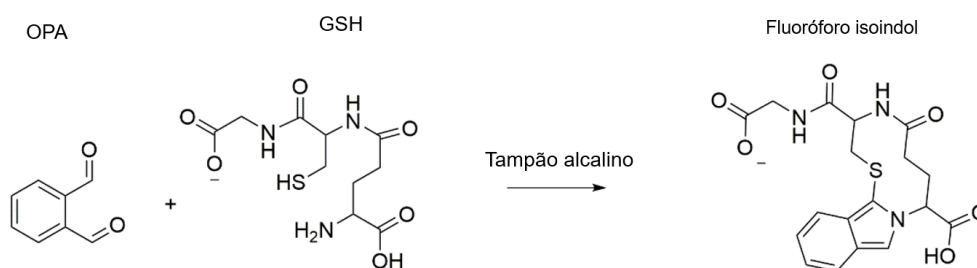


Figura 23: Reação de glutatona (GSH) com o fluoróforo orto-ftalaldeído (OPA) que gera composto fluorescente em meio alcalino. **Fonte:** Adaptado de FRANCIOSO *et al.*, 2021.

4.9. MARCADOR DE DANO OXIDATIVO

Para quantificar a lipoperoxidação, as células Aag-2, infectadas ou não com MAYV, foram coletadas após diferentes horas de infecção (24, 48 e 72h) e incubadas em um microtubo de 1,5 mL com 8,1% de SDS, 20% de ácido acético e 0,6% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Em condições de alta temperatura e pH ácido, o TBA reage com o malonaldeído (MDA) na proporção (2:1), um dos produtos finais liberados durante a peroxidação lipídica, formando um composto colorimétrico (OHKAWA, 1979). A mistura foi aquecida a 95° C por 1 hora no banho-seco. Posteriormente, foi pipetado 200 μ L em uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida a um comprimento de onda de $\lambda = 490$ nm no aparelho de espectrofotômetro GloMax (Promega, Madison, WI, EUA). Os resultados foram expressos em absorbância de 490 nm por μ g de proteína.

4.10. OXIMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO

Para avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial, células Aag-2, não infectadas e infectadas com MAYV (M.O.I. 5) após 24, 48, 72 horas p.i., foram coletadas de garrafas T75, contadas em câmara de Neubauer e separadas para o experimento. A taxa de consumo de oxigênio foi medida usando o respirômetro de alta-resolução (OROBOROS Oxygraph-k) a 28 °C em agitação contínua de 750 r.p.m. com 0,5 mL de suspensão de células e, como tampão de respiração, 1,5 mL de meio TC100. O equipamento foi calibrado no dia do experimento

utilizando meio TC100. O consumo de oxigênio foi avaliado em diferentes estados respiratórios através da adição sequencial de inibidores e desacopladores e os valores foram normalizados pela quantidade de células adicionadas ao equipamento. O consumo basal de oxigênio foi calculado após adição das células e a estabilização do fluxo de oxigênio. Diferentes substratos foram adicionados à câmara do equipamento contendo as células e o oxigênio foi medido após a estabilização do sinal. Para o experimento, foram adicionados à câmara de experimentação: (i) oligomicina (1 mg/mL) como inibidor da ATP sintase, que permite inferir o estado de vazamento de prótons, do inglês ‘próton leak’; (ii) o desacoplador carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), com pulsos consecutivos de 2 mM, para analisar a capacidade de respiração máxima; rotenona (1 mg/mL) para avaliar a respiração dependente do complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e, por último, a respiração foi inibida por antimicina-A (5 mM) para analisar o consumo residual de oxigênio, não relacionado com o metabolismo mitocondrial. O experimento foi realizado com um n de três por tempos de infecção e o controle não infectado.

Tabela 2. Compostos usados para analisar a cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias de células Aag-2 não infectadas e infectadas com MAYV.

Inibidores	Concentração	Propósito
Oligomicina	1 mg/mL	Inibidor da ATP sintase
Rotenona	1 mg/mL	Inibidor do complexo I
Antimicina A	5 mM	Inibidor do complexo III
CCCP	2 mM	Agente desacoplador

4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas com o GraphPad Prism software, versão 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados com valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes para os testes realizados e os dados foram expressos nos gráficos em barras como média $\pm$ desvio padrão determinados e comparados por teste t de Student.

5. RESULTADOS

5.1. Microscopia óptica da infecção em C6/36

Para a amplificação do estoque viral, células da linhagem C6/36, derivadas de *Aedes albopictus*, foram infectadas com 100 µL do MAYV ATCC e incubadas a 28° C por um período de seis dias. A análise citomorfológica das células C6/36 infectadas revelou alterações estruturais distintas. Observou-se a presença de vacúolos no citoplasma (indicados por setas brancas na figura 24), o que possivelmente reflete processos de estresse celular ou envolvimento de outras organelas no momento da replicação viral como previamente descrito por Qiao e Liu (2022).

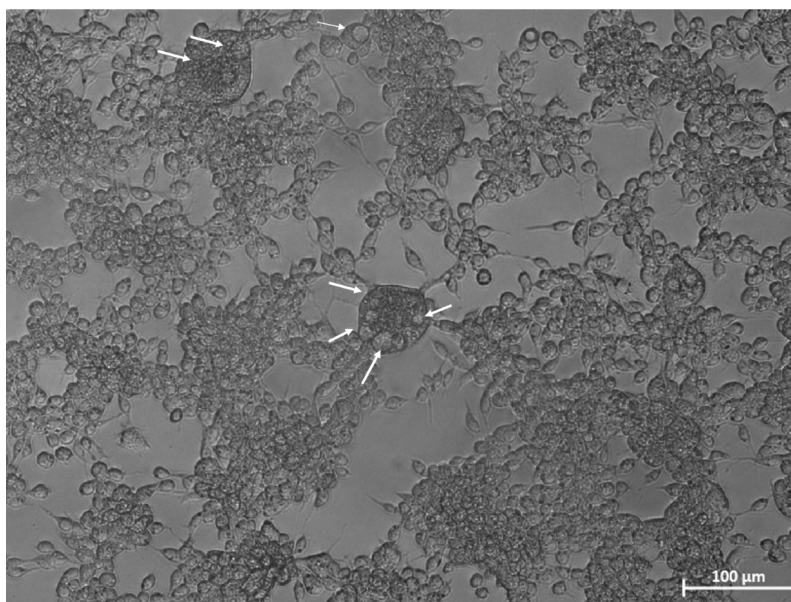


Figura 24. Alterações citomorfológicas em células C6/36, derivadas de *Aedes albopictus*, infectadas pelo vírus Mayaro. A análise microscópica em aumento de 20 X revelou presença de vacúolos no citoplasma (setas brancas), sugerindo alterações estruturais associadas à replicação viral.

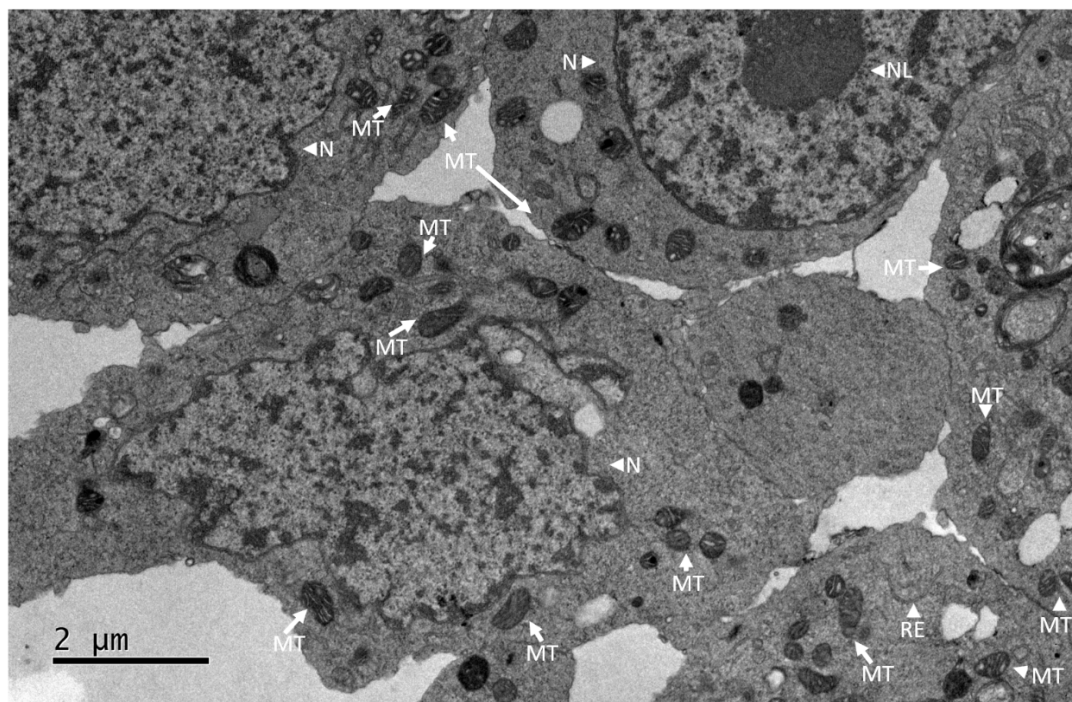
5.2. Análise ultraestrutural da infecção em Aag-2

Os estoques de MAYV propagados em C6-36 foram utilizados para infecção viral em células de Aag-2. Não foram observadas mudanças citoformológicas similares às aquelas observadas em C6-36; embora tenha sido observado uma diminuição do número de aglomerados celulares, característicos do crescimento de Aag-2. Esses aglomerados formam massas arredondadas, semelhantes a organoides e após infecção com MAYV, o número de

tamanho de aglomerados se reduziram (dados não mostrados). Diante desse fato, propôs-se a análise ultraestrutural de células infectadas e não infectadas por MAYV em tempos diferentes de infecção.

Foi realizada uma análise ultraestrutural das células Aag-2 por microscopia eletrônica de transmissão, com o objetivo de avaliar alterações causadas pela infecção por MAYV, em comparação com as células controle. Este experimento já havia sido executado, porém com um M.O.I. de 0.5 (VASCONCELOS *et al.*, 2020). A célula da linhagem Aag-2 observada apresentou um núcleo (indicado por seta branca e sigla N) volumoso com zonas de nucléolo (indicado por seta branca e sigla NL) proeminente, sugerindo intensa atividade transcricional e síntese ribossomal (Figura 25a/b). Observa-se ainda a presença de mitocôndrias (indicado por seta branca e sigla MT) abundantes na região citoplasmática periférica ao núcleo, caracterizadas por membranas internas bem definidas, indicando atividade metabólica e potencial bioenergético. A membrana plasmática apresentava integridade estrutural, enquanto o retículo endoplasmático (indicado por seta branca e sigla RE) foi observado disperso. As amostras infectadas com MAYV M.O.I. 5 foram coletadas em 24, 48 e 72 h p.i. e submetidas ao processo de emblocamento. No entanto, não foi possível obter cortes ultrafinos adequados para visualização no microscópio eletrônico JEOL JEM-1011.

A)



B)

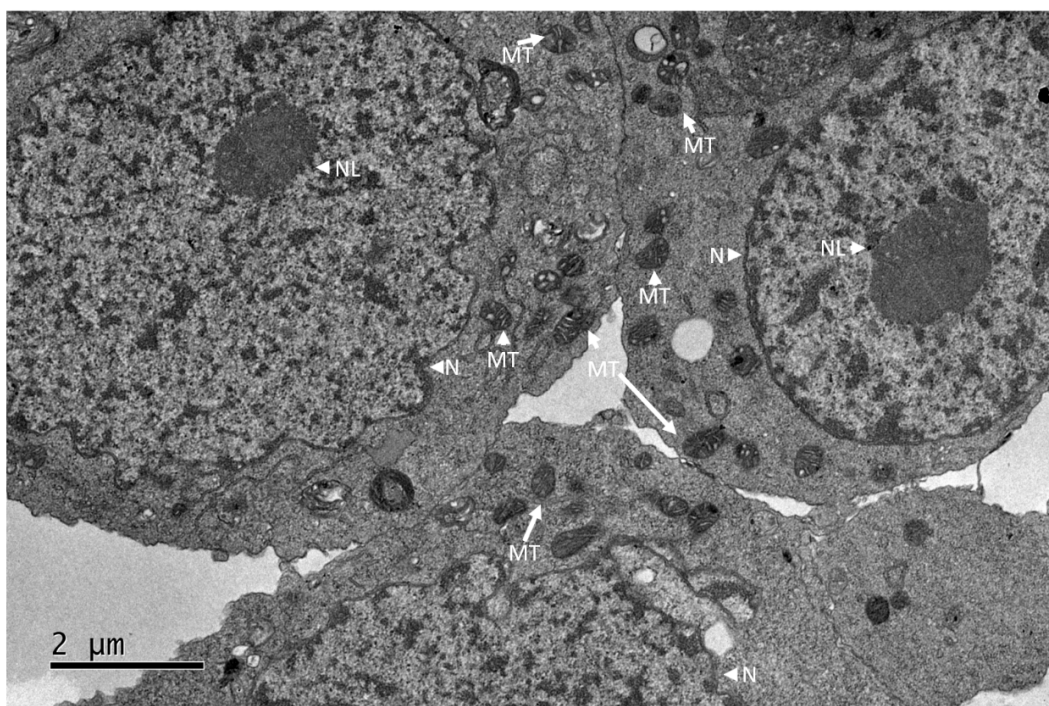


Figura 25: Microscopia eletrônica de transmissão de Aag-2 a 2000x. A figura revela dois campos distintos de um mesmo corte de células Aag-2, derivada de *Aedes aegypti*, onde há cinco células na imagem (A) e três células na imagem (B) com características morfológicas preservadas, evidenciando mitocôndrias abundantes (MT), um núcleo expressivo (N) com nucléolo proeminente (NL), membrana plasmática bicamada bem definida e um retículo endoplasmático (RE) (A) disperso ao longo do citoplasma.

5.3. Verificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são marcadores essenciais do funcionamento mitocondrial, desempenhando um papel central na sinalização celular, imunidade e no estresse oxidativo. Existem diversas técnicas para a detecção e quantificação das EROs, incluindo ensaios baseados em sondas fluorescentes, como H₂DCFH e dihidrorodamina, ensaios colorimétricos, como o nitroblue tetrazolium (NBT), e ensaios quimioluminescentes, como a lucigenina. Cada uma dessas abordagens apresenta diferentes níveis de especificidade, sendo algumas mais gerais, ligando-se a múltiplas espécies reativas, enquanto outras são mais específicas para uma espécie reativa.

A análise da fluorescência revelou níveis semelhantes de EROs entre o grupo controle e o grupo infectado a 24 h pós-infecção, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles, sugerindo uma produção basal e manutenção de níveis radicais. No entanto, a 48 h p.i., observou-se um aumento expressivo na produção de EROs, atingindo um valor 4,5 vezes

superior ao dos grupos controle e 24 h p.i. Em 72 h p.i., a produção de EROs reduziu-se em relação ao pico de 48 h p.i., mas ainda permaneceu significativamente elevada em comparação aos grupos controle e 24 h p.i. A diminuição entre 48 e 72 h p.i. foi de três vezes, sugerindo um possível mecanismo celular compensatório que atenuou os níveis de EROs em estágio tardio da infecção (Figura 26).

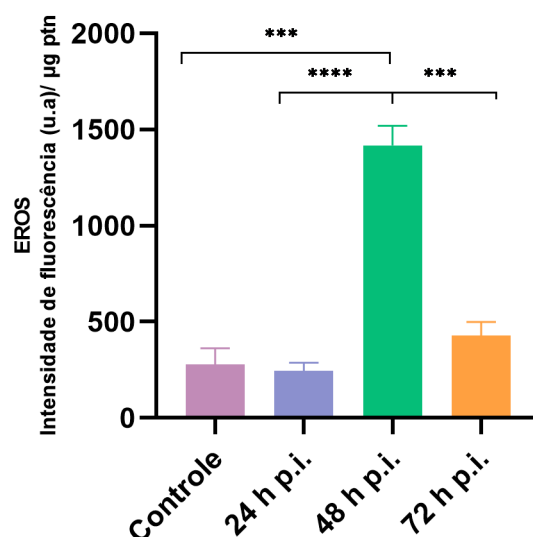


Figura 26. Quantificação das espécies reativas de oxigênio em células Aag-2 infectadas e não infectadas pelo vírus Mayaro. Células Aag-2 foram infectadas com MAYV M.O.I. 5 e incubadas por diferentes períodos de tempo – 24, 48 e 72 h pós-infecção. As espécies reativas de oxigênio (EROs) foram quantificadas utilizando o fluoróforo H₂DCFDA. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, calculados a partir de três réplicas biológicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student, considerando * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, e **** $P < 0,0001$.

5.4. Análise da resposta do sistema antioxidante enzimático e não-enzimático

O sistema antioxidante é um sistema celular que na homeostase redox controlando finamente o nível de EROs na célula controlando danos que possam ser causados pelo excesso, como danos em membranas, proteínas e ácidos nucleicos. O sistema pode ser amplamente dividido em sistema enzimático, que inclui enzimas como a SOD e a CAT, responsáveis pela neutralização das EROs, e o não-enzimático, que envolve moléculas orgânicas como a glutathiona, que atua como captadora de radicais livres para equilibrar o metabolismo redox.

Após a infecção por MAYV na linhagem Aag-2 com M.O.I. 5, observou-se na atividade da catalase uma tendência ao aumento entre 24 e 48 horas p.i., sem diferenças estatisticamente

significativas em relação ao grupo controle. Esse resultado sugere que, nesse período inicial, a enzima não é imediatamente modulada pela infecção, embora haja presença de EROs. No entanto, a 72 horas p.i., foi observado um aumento de 1,4 vezes na atividade da catalase, indicando uma possível resposta celular tardia ao aumento de EROs gerado pela infecção. Esse aumento pode estar associado a um mecanismo compensatório que contribui com a tolerância das células à infecção (Figura 27A).

No caso de atividade das SODs, conjunto de enzimas presentes em diferentes compartimentos e responsáveis por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a atividade foi quantificada espectrofotometricamente, baseada na inibição da formação de adrenocromo, um subproduto da oxidação da epinefrina mediada pela enzima. Observou-se uma tendência de aumento na atividade da SOD em 24 horas pós-infecção, em comparação ao controle e aos demais tempos analisados. No entanto, a 48 e 72 horas p.i., foi observada uma redução de quatro vezes na atividade enzimática em relação à média do controle, indicando uma regulação negativa da atividade em estágios mais avançados da infecção (Figura 27B).

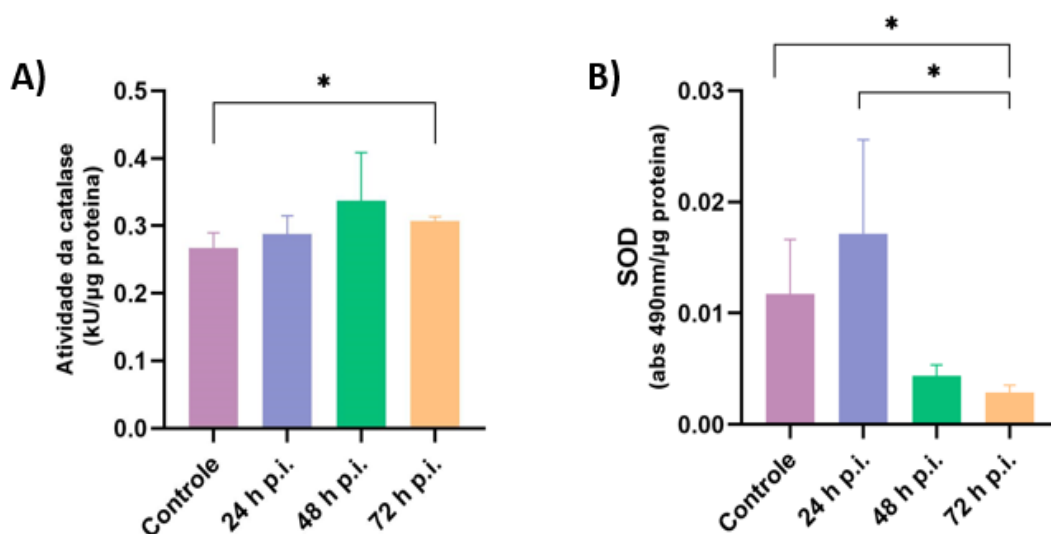


Figura 27: Análise da resposta do sistema antioxidante enzimático em células Aag-2 infectadas e não infectadas pelo vírus Mayaro. Os lisados totais de células foram preparados a partir de células Aag-2 não infectadas e infectadas com MAYV M.O.I 5 durante 24, 48 e 72 h para medir as atividades enzimáticas da SOD (A) e da CAT (B). Todos os dados são expressos com o cálculo da média $\pm$ desvio padrão obtido por três réplicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student, considerando * $P < 0.05$.

A glutathiona é considerada um dos antioxidantes mais importantes do sistema antioxidante não-enzimático, pois atua principalmente como um agente redutor, doando elétrons para neutralizar radicais livres, como o H_2O_2 . Neste estudo, o conteúdo total de glutathiona reduzida

(GSH) foi quantificado pela fluorescência gerada após a reação entre GSH e orto-ftalaldeído (OPA). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de GSH nos tempos de 24 e 48 h p.i. com MAYV em comparação ao controle. No entanto, foi observada uma redução de 1,2 vezes nos níveis de GSH, com significância estatística, a 72 horas p.i., em comparação com os níveis medidos a 48 h p.i. (Figura 28).

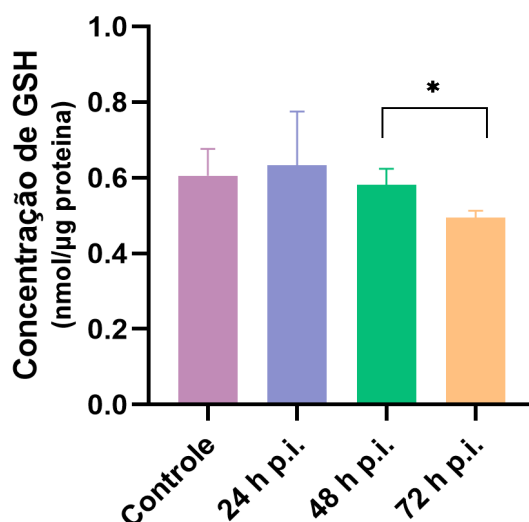


Figura 28: Determinação da concentração total de glutathiona em células Aag-2 infectadas e não infectadas por vírus Mayaro. Células Aag-2 foram infectadas com MAYV M.O.I. 5 e incubadas por diferentes períodos de tempo – 24, 48 e 72 h pós-infecção. A concentração total de glutathiona foi quantificada por meio da fluorescência emitida após sua ligação com orto-ftalaldeído. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, calculados a partir de três réplicas biológicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student, considerando * $P < 0,05$.

5.5. Análises de potenciais danos oxidativos: lipoperoxidação

Para avaliar se a infecção por MAYV em células Aag-2 induzem danos oxidativos, foi realizado o teste Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (sigla do inglês, TBARS) para medir a lipoperoxidação. Os danos oxidativos são lesões celulares causadas pelo excesso de EROs, que podem danificar biomoléculas, como os lipídios das membranas celulares, resultando em lipoperoxidação.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as células controle Aag-2 não-infectadas e as infectadas com MAYV (M.O.I. 5), mas notou-se uma tendência de lipoperoxidação nas horas subsequentes à infecção (Figura 29). Isso sugere uma possível heterogeneidade entre as populações celulares da linhagem Aag-2 testadas, que pode

influenciar a suscetibilidade das células a danos nas membranas, dependendo do tipo celular presente.

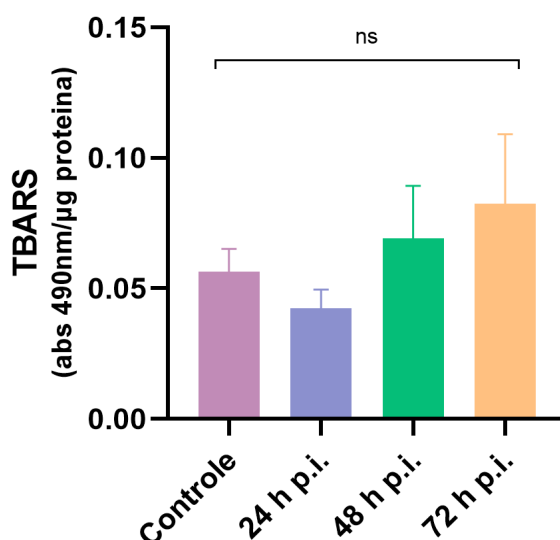


Figura 29: Lipoperoxidação em células Aag-2 infectadas e não infectadas por vírus Mayaro. Células Aag-2 foram infectadas com MAYV M.O.I. 5 e incubadas por diferentes períodos de tempo – 24, 48 e 72 h pós-infecção. TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), mede os níveis de peroxidação lipídica através da reação do malonaldeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, calculados a partir de três réplicas biológicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. NS: Não relevante estatisticamente relevante.

5.6. Função mitocondrial

No presente estudo, foi realizado uma análise da taxa de consumo de oxigênio em células Aag-2 controle e infectadas com MAYV M.O.I. 5 a 24, 48 e 72 horas p.i. com intuito de avaliar as alterações funcionais mitocondriais associadas à infecção viral. Antes de medir a taxa de consumo, as células foram contadas e usadas como parâmetro de correção nos níveis de consumo de oxigênio aferido entre as amostras.

É possível observar na Figura 30A a taxa de fluxo de oxigênio em diferentes estados respiratórios, divididos em basal, vazamento de prótons, respiração máxima e respiração máxima do complexo I. O consumo basal de oxigênio foi significativamente reduzido apenas a 72 h p.i. em comparação ao controle, indicando uma menor demanda energética ou um comprometimento na eficiência metabólica das mitocôndrias em tempos tardios da infecção (Figura 30B). O vazamento de prótons, que reflete a dissipação do gradiente de prótons sem acoplamento à produção de ATP, também apresentou uma diminuição em 72 h p.i., sugerindo

uma menor atividade da cadeia transportadora de elétrons e menor dissipação de energia em resposta à infecção ou associado à menor geração de espécies reativas de oxigênio (Figura 30C). A respiração máxima foi reduzida em células infectadas aos 72 hpi em comparação ao controle, reforçando a ideia de que a infecção afeta a eficiência da cadeia transportadora de elétrons, limitando a capacidade de resposta metabólica das mitocôndrias em situações de alta demanda energética (Figura 30D). Por fim, a respiração máxima do complexo I não apresentou diferenças significativas entre os grupos avaliados e demonstram uma taxa de consumo reduzida em todas as amostras analisadas (Figura 30E).

Esse resultado sugere que, apesar da redução generalizada no consumo de oxigênio nos demais estados respiratórios, a atividade específica do complexo I não foi alterada pela infecção. Isso pode indicar que a redução do consumo de oxigênio observado decorre de uma disfunção global da cadeia respiratória, envolvendo outros complexos, ou de uma regulação metabólica tempo-dependente, ou seja, que afeta mais diretamente às etapas posteriores do metabolismo mitocondrial.

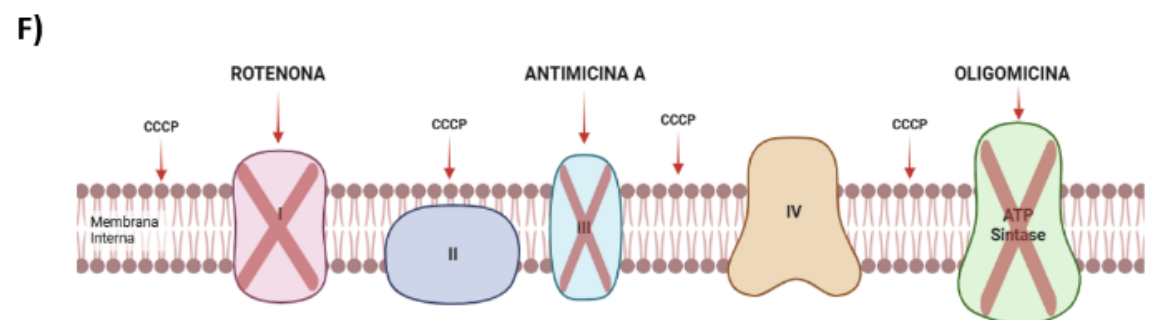
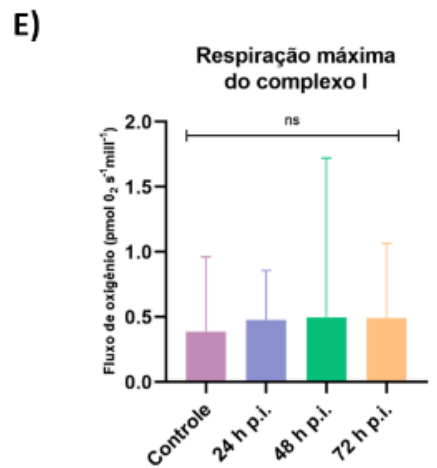
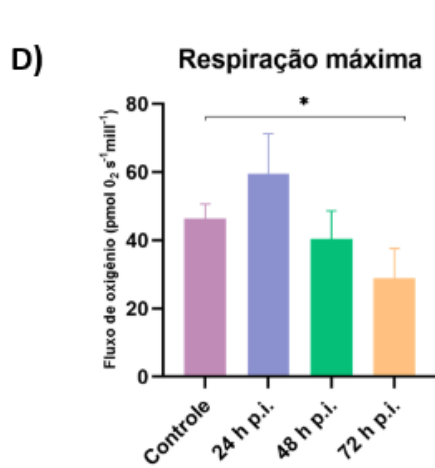
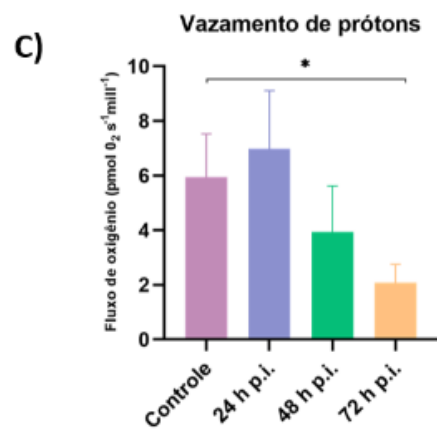
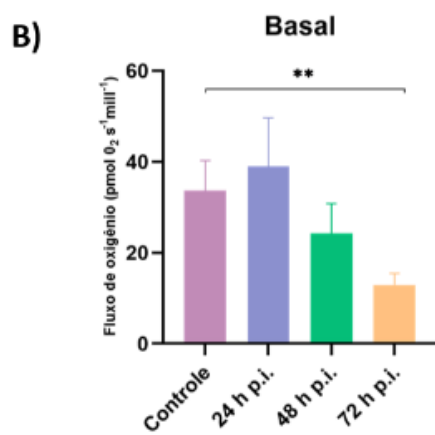
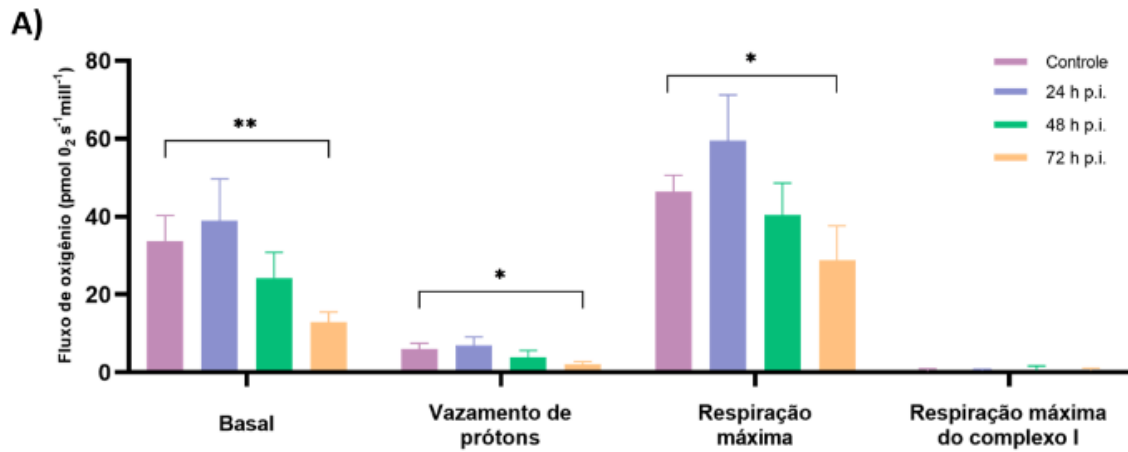


Figura 30: O vírus Mayaro induz mudanças na função mitocondrial das células Aag-2. As células Aag-2 não infectadas e infectadas com MAYV M.O.I. 5 em diferentes tempos pós infecção foram analisadas para determinar os parâmetros de respiração. **(A)** Perfil de consumo de oxigênio mitocondrial. **(B)** respiração basal. **(C)** Vazamento de prótons. **(D)** Respiração máxima. **(E)** Respiração máxima do complexo I. A taxa de consumo de oxigênio foi medida usando o respirômetro de alta-resolução OROBOROS em 1,5 mL de meio TCC sobre constante agitação à 28° C, com adição sequencial de oligomicina, CCCP, rotenona e antimicina-A. Os químicos atuam como inibidor da ATP sintase, desacoplador mitocondrial, inibidor do complexo I e inibidor do complexo III, respectivamente **(F)**. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, calculados a partir de três réplicas biológicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student, considerando * $P < 0,05$. CCCP: Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona; MAYV: Vírus Mayaro. **Fonte: (F)** A figura foi projetada usando Biorender.

6. DISCUSSÃO

As linhagens celulares de insetos são ferramentas valiosas no campo científico devido à sua facilidade de cultivo, manipulação e à capacidade de gerar resultados reproduzíveis que apresentam, ainda que de forma limitada, condições semelhantes às encontradas em tecidos. Esses modelos são essenciais para elucidar a resposta dos insetos a diversos desafios, como infecções virais, permitindo a investigação dos mecanismos imunológicos, respostas antivirais ou de persistência, além de aspectos morfofisiológicos e moleculares da interação vírus-hospedeiro (LWANDE *et al.*, 2020). Dentre essas linhagens, a linhagem embrionária derivada de *Aedes aegypti*, Aag-2, desenvolvida por Peleg em 1968, foi pouco explorada por quase três décadas. No entanto, estudos realizados por Gao *et al.* (1999) demonstraram sua capacidade de secretar defensinas em resposta a bactérias Gram-positivas inativadas pelo calor (BARLETTA *et al.*, 2012), marcando um ponto importante no uso dessa linhagem para investigar respostas imunológicas e mecanismos de defesa em mosquitos. Desde então, o interesse em usar a linhagem Aag-2 como modelo de estudo aumentou significativamente, revelando suas vantagens em relação à C6/36 para pesquisas com *Aedes*, o que reforça sua relevância para estudos no campo da biologia e da imunologia de insetos.

No presente trabalho foram investigadas possíveis alterações bioquímicas e funcionais em células Aag-2 infectadas pelo Mayaro (MAYV), com ênfase na modulação da atividade do sistema antioxidante, parâmetros associados ao estresse oxidativo e no consumo de oxigênio pelo funcionamento da mitocôndria. As células foram analisadas em diferentes tempos pós-infecção, com enfoque na análise citomorfológica das células, produção de espécies reativas de oxigênio, a atividade de enzimas antioxidantes e os marcadores de dano oxidativo, além da avaliação da função mitocondrial por respirometria de alta resolução.

A infecção viral pode induzir efeitos citopáticos distintos dependendo do vírus e da linhagem celular. Vasconcelos *et al.* (2020) descrevem que células Aag-2, quando infectadas com MAYV em M.O.I de 0.5, apresentam um efeito citopático caracterizado pelo formato estrelado das células e a formação de estruturas semelhantes a sincícios. No entanto, essa fusão celular ocorre com menor intensidade em comparação com a infecção pela mesma linhagem com CHIKV, sugerindo uma possível diferença na virulência entre os dois vírus do gênero *Alphavirus*. A formação de sincícios não é um relato descrito apenas das células Aag-2, também foi relatada em C6/36, uma linhagem derivada de *Aedes albopictus*, durante a infecção por DENV por Qiao e Liu *et al.* (2022), onde os autores descreveram que essa infecção resultou

na formação de estruturas multinucleadas devido à fusão celular, um fenômeno característico da interação de certos arbovírus com suas células hospedeiras.

A linhagem celular C6/36, é amplamente utilizada em pesquisas sobre arbovírus devido à sua alta permissividade à infecção viral e à deficiência no sistema de RNA interferente (RNAi), tornando-se uma ferramenta valiosa para a amplificação de estoques de isolados virais (FREDERICKS *et al.*, 2019). Ao serem infectadas com MAYV, o mesmo isolado utilizado na linhagem Aag-2, as células C6/36 apresentaram vacúolos citoplasmáticos, indicando uma resposta celular à infecção. A ocorrência desse fenômeno na linhagem C6/36 durante a infecção por alfavírus já foi descrita por Lucchi (2023), que observou a vacuolização em testes com MAYV e CHIKV. Além disso, Qiao e Liu (2022) relataram um padrão semelhante ao infectar células C6/36 com o vírus Sindbis (SINV), sugerindo que a vacuolização citoplasmática pode ser uma característica conservada da infecção por alfavírus em células de insetos.

Essa resposta celular em linhagens de mosquito diverge com os efeitos observados em linhagens de mamíferos. Ribeiro *et al.* (2018) descreveram que, em culturas de células de mamíferos infectadas com MAYV, ocorre morte celular do tipo lítico, caracterizada pela formação de rugas na membrana das células infectadas, aumento da refração celular e subsequente destruição completa da monocamada. Esse efeito citopático foi relatado em BHK-21, linhagem derivado de fibroblastos renais de hamster, VERO, derivada de células epiteliais renais de *Chlorocebus aethiops*, e LLC-MK2, células epiteliais renais de *Macaca mulatta*, indicando uma resposta celular mais agressiva nos hospedeiros vertebrados em comparação às linhagens derivadas de mosquitos.

A linhagem celular Aag-2 é persistentemente infectada por diversos vírus específicos de insetos, incluindo Cell Fusing Agent Virus (CFAV), Phasi Charoen-like Virus (PCLV), Aedes anphevirus (AeAV) e Culex Y Virus (CYV) (FREDERICKS *et al.*, 2019; FRANZKE *et al.*, 2018). Esses vírus são classificados em um grupo intitulado como ‘insect-specific viruses’ (ISVs) podem atuar como moduladores da replicação e transmissão dos arbovírus, influenciando diretamente a permissividade celular e a competência vetorial dos mosquitos (CARVALHO; LONG, 2021).

O CFAV pode apresentar um efeito ambíguo, enquanto em alguns experimentos reduziu a disseminação dos arbovírus DENV e ZIKV em mosquitos vivos (BAIDALIUK *et al.*, 2019) e em outros estudos demonstrou potencial para aumentar a replicação do DENV, ao induzir a expressão da ribonuclease RNaseK, que facilita a entrada de vírus que dependem da via de endocitose ou dependente de pH (ZHANG *et al.*, 2017). O AeAV, identificado em células Aag-2 juntamente com CFAV e PCLV, não demonstrou impacto direto na replicação de arbovírus,

indicando um papel latente sem efeito na resposta antiviral (DI GIALONARDO *et al.*, 2018). Da mesma forma, de acordo com Göertz *et al.* (2019) o Culex Y Virus (CYV), encontrado em células de *Culex* e *Aedes*, também não apresentou efeitos claros sobre a replicação viral, embora sua interação com o sistema de RNA interferente dos mosquitos ainda precise ser melhor compreendida. Já o PCLV, apesar de sua alta prevalência em *Aedes aegypti*, não apresentou impacto significativo na replicação de DENV, ZIKV ou outros arbovírus em condições laboratoriais (MUNIVENKATAPPA *et al.*, 2021). A diferença de mecanismos de ação desses ISVs demonstra a complexidade das interações entre ISVs-arbovírus, reforçando a necessidade de mais estudos para esclarecer como essas infecções persistentes implicam a transmissão e a virulência de arbovírus nos vetores.

Esta dissertação não responde à pergunta de como a infecção influencia na estrutura das organelas nas células infectadas por MAYV. Entretanto, os resultados aqui encontrados indicam uma influência na produção de espécies reativas e no sistema antioxidante nas células AAg-2 e relação ao funcionamento mitocondrial, sugerindo que o MAYV modula a resposta antioxidante das células do vetor, sendo o estresse oxidativo resultante possivelmente controlado pelo sistema antioxidante enzimático e não-enzimático.

A primeira evidência científica de que um vírus poderia induzir estresse oxidativo por meio do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi reportada em 1979 por Peterhans. Desde então, inúmeros estudos têm demonstrado que diferentes vírus são capazes de desencadear um desequilíbrio no estado redox celular por meio de distintos mecanismos moleculares, afetando diretamente a patogênese viral e a progressão da infecção. A indução do estresse oxidativo pode ocorrer tanto pela ativação de vias pró-inflamatórias, que aumentam a produção de radicais livres, quanto pela inibição dos sistemas antioxidantes endógenos, favorecendo a replicação viral e contribuindo para danos celulares (DEMIRCI-ÇEKİÇ *et al.*, 2022).

Dentre os vírus que apresentam essa capacidade, destacam-se o vírus do papiloma humano (HPV), o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da hepatite C (HCV), ambos associados à inflamação crônica hepática e ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), cuja infecção crônica leva a alterações oxidativas que contribuem para a disfunção imunológica e o agravamento da doença (GREENSPAN E ARUOMA, 1994; MAHMOOD *et al.*, 2004; BOLUKBAS *et al.*, 2005; HIGGS *et al.*, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2014). Os arbovírus também apresenta influência da infecção sobre a produção de espécies reativas, onde a análise de camundongos expostos ao antígeno NS1 do DENV obteve intensa resposta inflamatória e danos endoteliais mediados por EROs (YEN et

al., 2008) e Almeida et al. (2020) demonstrou que a infecção por ZIKV aumenta significativamente a produção de EROs e produtos de peroxidação lipídica, além de reduzir as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em duas linhagens, U87-MG e HepG2, derivadas glioblastoma e e cancro de fígado de humano, respectivamente.

Outros membros do gênero *Alphavirus* também são capazes de gerar um quadro de estresse oxidativo nas células do hospedeiro. A infecção pelo CHIKV, por exemplo, induz estresse oxidativo no mosquito *Ae. aegypti*, levando a danos oxidativos e desencadeia autofagia nas células, onde esse estresse é sugestivo de uma resposta celular contra a infecção desse alfavírus (ATKINS *et al.*, 2013; KUMAR *et al.* 2023). Em células de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* infectadas com DENV, a expressão de p53, uma proteína fundamental na regulação do ciclo celular e na resposta ao estresse celular, é aumentada em resposta às EROs, facilitando a disseminação viral e promovendo a sobrevivência celular por meio da regulação da expressão da catalase. No entanto, o papel das EROs mitocondriais na ativação da p53 ainda é desconhecida (CHENG *et al.*, 2018). No caso do vírus Mayaro, ele é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio de maneira transiente, como demonstrado por Camini et al. (2017), que observaram em modelos celulares de mamíferos e em C6/36 infectados com Mayaro. No presente estudo, células Aag-2 apresentaram modulação no equilíbrio redox e na função mitocondrial ao longo do curso da infecção, onde em 48 horas pós-infecção foi relatado um aumento significativo, seguido por uma redução em 72 horas, quando os níveis retornaram a valores próximos aos observados nas células controle. Uma ativação temporária da produção de EROS pode ser sugerida, possivelmente associada à resposta antiviral inicial das células do vetor, seguida por uma regulação compensatória mediada por mecanismos antioxidantes endógenos (DEMIRCI-ÇEKİÇ *et al.*, 2022). Ao contrário do que ocorre em células de mamíferos, onde a infecção por arbovírus frequentemente leva à morte celular, as células Aag-2 não apresentaram sinais de apoptose ou lise durante a infecção por MAYV. Isso sugere que, embora a infecção não seja molecularmente assintomática, ela não compromete a viabilidade celular. Esse comportamento indica que as células de mosquitos mantêm a viabilidade durante infecções virais, permitindo a persistência do vírus sem causar morte celular significativa (CAMINI *et al.*, 2017).

O impacto das espécies reativas de oxigênio nas funções celulares é diretamente influenciado tanto pela sua concentração quanto pela duração da exposição celular a essas moléculas (RESHI *et al.*, 2014). O estresse oxidativo é geralmente explicado por duas hipóteses, tanto na presença de quantidades elevadas de EROs, quanto em um sistema

antioxidante enzimático e/ou não enzimático prejudicado (DRÖGE, 2002). Em estágios iniciais da infecção, a produção de espécies reativas de oxigênio desempenha um papel essencial na defesa do hospedeiro, atuando como um mecanismo de resposta imunológica inata capaz de limitar a replicação viral e, em alguns casos, induzir apoptose como forma de conter a disseminação do patógeno (JACOBSON, 1996).

A avaliação da atividade antioxidante enzimática nesse estudo demonstrou que, em 72 horas pós-infecção, houve uma diminuição na atividade da superóxido dismutase (SOD), enquanto a atividade da catalase (CAT) apresentou um aumento leve, que pode ser possivelmente compensatório. Essa modulação sugere um mecanismo de adaptação celular ao desbalanço na homeostase redox gerado pela infecção viral, em que a redução da SOD pode estar associada à menor disponibilidade de substrato ou à regulação negativa da enzima frente à resposta antioxidante. Yoshinaka et al. (1999) demonstraram que o alfavírus Sindbis causou infecção persistente na linhagem de células fetais de pulmão humano MCR-5 e que essa persistência se deveu ao acúmulo de grandes quantidades de Mn-SOD mitocondrial nas células infectadas. Os autores sugeriram que um fator celular que regulava a via oxidativa modulava o resultado da infecção pelo vírus Sindbis, destacando a importância do estresse oxidativo nas infecções por alfavírus. Camini et al. (2017) descreveram que a infecção por MAYV induz alterações nas enzimas antioxidantes, incluindo a regulação da SOD e CAT, o que sugere que essas modificações fazem parte da resposta celular ao vírus no vetor.

Paralelamente, como as enzimas SOD converte o ânion superóxido em H_2O_2 e a CAT e o ciclo redox da glutathione converte H_2O_2 em água e oxigênio, também avaliamos o conteúdo total de glutathione nas células infectadas pelo MAYV. Foi encontrado uma redução dos níveis de glutathione, indicando um consumo elevado deste antioxidante não enzimático, possivelmente como forma de neutralizar possíveis danos oxidativos acarretados pelo aumento de espécies reativas. Dhanwani et al. (2012) observaram um declínio significativo nos níveis de glutathione (36 e 48 h p.i.) em células SH-SY5Y infectadas com CHIKV. Tian et al. (2010) demonstraram que a infecção por DENV-2 diminuiu significativamente os níveis de glutathione em células HepG2 e que a produção de novas partículas virais diminuiu consideravelmente após o tratamento com glutathione exógena.

A lipoperoxidação dessas células foi medida como alternativa de verificar possíveis danos oxidativos nas células infectadas. Foi observado uma possível tendência à lipoperoxidação o que força a hipótese de que o estresse oxidativo esteja sendo desencadeado pela infecção viral, embora os sistemas antioxidantes celulares atuem para mitigar seus efeitos deletérios. Sob essas condições, ocorre dano oxidativo a biomoléculas essenciais, incluindo lipídios de membrana,

proteínas estruturais e enzimáticas, além de modificações no DNA, comprometendo a integridade e funcionalidade celular (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1994). Além dos efeitos citotóxicos diretos, há evidências de que o estresse oxidativo pode favorecer a replicação viral em diferentes infecções, criando um ambiente celular mais permissivo à replicação do vírus, seja por meio da ativação de vias de sinalização associadas à replicação viral ou pela supressão da resposta antiviral do hospedeiro (RESHI *et al.*, 2014).

A função mitocondrial também foi afetada de maneira expressiva, evidenciada pela redução do consumo de oxigênio em todos os estados de respiração mitocondrial após 72 horas de infecção. Esse achado sugere que o vírus Mayaro impacta diretamente a bioenergética celular, possivelmente comprometendo a eficiência da cadeia transportadora de elétrons e, consequentemente, a produção de ATP. Esse comportamento indica uma ativação temporária da produção dessas espécies, possivelmente associada à resposta antiviral inicial das células do vetor, seguida por um ajuste mediado por mecanismos antioxidantes celulares. A dinâmica observada está de acordo com estudos prévios que demonstram que arbovírus, incluindo membros da família *Togaviridae* e *Flaviviridae*, podem induzir estresse oxidativo transitório, promovendo inicialmente um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e, posteriormente, uma modulação compensatória do sistema antioxidante celular (ZHANG *et al.*, 2019). A alteração pode ser explicada também pela disfunção mitocondrial gerada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio quanto por mecanismos virais direcionados à reprogramação metabólica das células hospedeiras, visando otimizar a replicação viral. Santana-Román *et al.* (2021) demonstraram que a infecção pelo vírus da dengue em células de *Aedes albopictus* também leva à redução do consumo de oxigênio e ao comprometimento da função mitocondrial, mostrando que arbovírus podem modular a respiração celular do vetor de forma semelhante. Outra hipótese que pode ser levantada com esse achado é que o vírus pode comprometer a eficiência bioenergética celular, possivelmente afetando a produção de ATP e outros processos metabólicos essenciais. Estudos proteômicos indicaram que proteínas relacionadas ao metabolismo energético são diferencialmente expressas durante a infecção por MAYV, reforçando a ideia de que o vírus manipula o metabolismo celular para favorecer sua replicação (VASCONCELLOS *et al.*, 2020).

Estudos adicionais que avaliem a modulação da expressão gênica, a ultraestrutura celular em diferentes tempos pós-infecção e a cinética de produção e brotamento de vírions poderão fornecer uma compreensão mais detalhada da interação vírus-hospedeiro, bem como do papel das EROs e do sistema antioxidante na progressão da infecção. A elucidação desses mecanismos pode fornecer novas perspectivas sobre a dinâmica da infecção viral em mosquitos

vetores, permitindo identificar possíveis alvos para o controle da replicação viral e a transmissão do arbovírus. De modo geral, nossos dados podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos adaptativos adotados por *Aedes aegypti* durante a infecção pelo MAYV, evidenciando a importância do equilíbrio redox e da função mitocondrial para a tolerância do vetor ao vírus.

7. CONCLUSÃO

Os experimentos realizados neste estudo contribuem para a compreensão dos mecanismos de interação entre o vírus Mayaro, isolado ATCC M.O.I. 5, e as células de *Aedes aegypti*, Aag-2, destacando o impacto da infecção na bioenergética mitocondrial e na regulação da homeostase redox. Foi evidenciado que, após 72 horas pós-infecção (h p.i.), há uma redução generalizada nos estados de respiração mitocondrial, sugerindo que o MAYV modula ativamente as mitocôndrias das células do vetor e essa diminuição do consumo de oxigênio nos estágios tardios da infecção pode estar relacionado a uma reprogramação metabólica associada à preservação da integridade celular, favorecendo a persistência do vírus no vetor. A ausência de citotoxicidade evidente nas células de mosquito indica que a infecção não é molecularmente assintomática, mas sim regulada por um delicado balanço entre a atividade antioxidante e os mecanismos virais de evasão da resposta imune inata do vetor.

A regulação das EROs é um aspecto crítico na interação vírus-hospedeiro, sendo possivelmente um dos fatores determinantes na transmissibilidade do MAYV. A modulação da resposta antioxidante pode refletir um mecanismo conservado de arbovírus para otimizar sua transmissão pelos vetores, minimizando os danos celulares e prolongando a infecção. Dessa forma, o impacto da homeostase redox e da dinâmica mitocondrial precisa ser mais explorado para determinar de que forma essas alterações influenciam a competência vetorial e a eficácia na transmissão viral.

Com base nesses resultados, estudos futuros devem focar na modulação da expressão gênica ao longo da infecção, na ultraestrutura celular em diferentes tempos, e na cinética de produção e brotamento de vírions. Esses estudos permitirão uma compreensão mais detalhada do papel das EROs e do sistema antioxidante na progressão da infecção, bem como o impacto metabólico da infecção viral em células de vetores a fim de compreender a interação entre vírus-vetor.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras, investigações adicionais são necessárias aprofundar e melhor elucidar o conhecimento sobre a interação do vírus Mayaro com o vetor *Aedes aegypti*, como estudos que explorem:

- Análise da expressão gênica relacionada à ativação do sistema antioxidante
- Caracterização ultraestrutural das células infectadas com MAYV
- Determinação da cinética de produção e liberação de vírions
- Comparação da infecção nas células com outras arboviroses ou em situação de co-infecção
- Avaliação da influência de vírus de infecções persistentes de Aag-2 na replicação do Mayaro

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, G. R. Métodos diagnósticos para o vírus Mayaro: revisão sistemática e avaliação molecular em pacientes arbovirose like em unidade municipal de saúde de Goiânia-Goiás. 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás.

ACOSTA-AMPUDIA, Y.; MONSALVE, D. M.; RODRIGUEZ, Y.; PACHECO, Y.; ANAYA, J. M.; RAMIREZ-SANTANA, C. Mayaro: an emerging viral thread? *Emerging Microbes Infections*. v. 7, n. 163, 2018. doi: 10.1038/s4142-018-0163-5

AITKEN, T. H.; DOWNS, W. G.; ANDERSON, C.R.; SPENCE, L.; CASALS, J. Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. *Science*. v. 1, n. 131, p. 3405:986, 1960. doi: 10.1126/science.131.3405.986.

ALMEIDA, L. S.; COTA, A. L. S.; RODRIGUES, D. F. Saneamento, arboviroses e determinantes ambientais: impactos na saúde humana. *Ciência & Saúde Coletiva*. v. 25, n. 10, p. 3857 – 3868, 2020. doi: 10.1590/1413-812320202510.30712018

ALOMAR. A. A.; ALTO, B. W. Efeitos mediados pela temperatura na competência do vetor do vírus Mayaro dos vetores do mosquito *Aedes aegypti* na Flórida. *Vírus*. v. 14, n. 5, p. 880. <https://doi.org/10.3390/v14050880>

ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; POIAN, A. T. Da. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. *Biomed Res Int*. v. 2013, n. 973516, 2013. doi: 10.1155/2013/973516

ATKINS, G. The pathogenesis of Alphaviruses. *International Scholarly Research Notices*. v. 2013, n. 861912, p. 1 – 22, 2013. doi:10.5402/2013/861912

AUGUSTE, A.J.; LIRIA, J.; FORRESTER, N.L.; GIAMBALVO, D.; MONCADA, M.; LONG, K.C.; MORÓN, D.; DE MANZIONE, N.; TESH, R.B.; HALSEY, E.S.; KOCHER, T.J.; HERNANDEZ, R.; NAVARRO, J.C.; WEAVER, S.C. Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. *Emerg Infect Dis*. v. 21, n. 10, p. 1742-50, 2015. doi: 10.3201/eid2110.141660

ARAÚJO, M.; CASTANHEIRA, E.; SOUSA, S. The buzz on insecticides: a review of uses, molecular structures, adverse effects, and alternatives. *Molecules*. v. 28, n. 8, p. 3641, 2023. doi: [org/10.3390/molecules28083641](https://doi.org/10.3390/molecules28083641).

ASGARIAN, T.S.; VATANDOOST, H.; HANAFI-BOJD, A.A.; NIKPOOR, F. Worldwide Status of Insecticide Resistance of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*, Vectors of Arboviruses of Chikungunya, Dengue, Zika and Yellow Fever. *J Arthropod Borne Dis*. v. 31, n. 17, p. 1-27, 2023. doi: [10.18502/jad.v17i1.13198](https://doi.org/10.18502/jad.v17i1.13198).

AZEVEDO, R.S.S.; SILVA, E.V.P.; CARVALHO, V.L.; RODRIGUES, S.G.; NETO, J.P.N.; MONTEIRO, H.A.O.; PEIXOTO, V.S.; CHIANG, J.O.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C. Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis*. v. 15, p. 1830–1832, 2019. doi: [10.3201/eid1511.090461](https://doi.org/10.3201/eid1511.090461)

BAIDALIUK, A., MIOT, E.F.; FEQUIME, S.; MOLTINI-CONCLOIS, I., DELAIQUE, F.; DABO, S.; DICKSON, L.B.; AUBRY, F.; MERKLING, S.H.; CAO-LORMEAU, V.M.; LAMBRECHTS, L. Cell-Fusing Agent Virus Reduces Arbovirus Dissemination in *Aedes aegypti* Mosquitoes In Vivo. *J Virol*. v. 93, n. 18, p. e007005-19, 2019. doi: [10.1128/JVI.00705-19](https://doi.org/10.1128/JVI.00705-19).

BARBOSA, I, R.; SILVA, L, P.; Influência dos determinantes sociais e ambientais na distribuição espacial da dengue no município de Natal-RN. *Revista Ciência Plural*. v. 1, n. 3, p. 62-75, 2015

BATISTA, T. L. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE in silico DA MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE GENES DE SELENOPROTEÍNAS EM *Aedes spp.* 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

BARLETTA, A.B.F.; SILVA, M.C.L.N.; SORGINE, M.H.F. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasites Vectors*. v.5, n. 148, 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-148>.

BECKMANN, J. F.; RONA, J. A.; HOCHSTRASSER, M. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nature microbiology*. v. 2, n. 1, 2017. doi: [10.1038/NMICROBIOL.2017.7](https://doi.org/10.1038/NMICROBIOL.2017.7).

- BLAIR, C. D. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* 2011 Mar;6(3):265-77. doi: 10.2217/fmb.11.11.
- BOLUKBAS, C.; BOLUKBAS, F.F.; HOROZ, M.; ASLAN, M.; CELIK, H.; DIS., O.. Erel Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection *BMC Infect. Dis.* v. 31, p. 5-95, 2005.
- BONINI, M. G.; ROTA, C.; TOMASI, A.; MASON, R. P. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophecy? *Free Radical Biology and Medicine.* v. 40, n. 6, p. 968-975, 2006. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.042
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry.* v. 7, n. 72, p. 248, 1976. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007. doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006.
- BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. Part I. Chemistry and antioxidant functions. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Annals of the New York Academy of Sciences.* v. 570, p. 7-22, 1989.
- CARPENTER, S. J., LACASSE, W. J. 1955. Mosquitoes of North America (North of Mexico). University of California Press, Berkeley, CA. 360 pp.
- CARVALHO, V.L.; LONG, M.T. Insect-Specific Viruses: An overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. *Virology.* v. 557, p. 34-43, 2021. doi: 10.1016/j.virol.2021.01.007.
- CARVALHO-MARTINS, M.C.; OLIVEIRA, A.S.S.S.; DA SILVA, L.A.A.; PRIMO, M.G.S.; CARVALHO, V.N Biological Indicators of Oxidative Stress [Malondialdehyde, Catalase, Glutathione Peroxidase, and Superoxide Dismutase] and Their Application in Nutrition. In: Patel, V.B., Preedy, V.R. (eds) *Biomarkers in Nutrition . Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07389-2_49

CHENG, C.C.; SOFIYATUN, E.; CHEN, W.J.; WANG, L.C. Life as a Vector of Dengue Virus: The Antioxidant Strategy of Mosquito Cells to Survive Viral Infection. *Antioxidants* (Basel). v. 10, n. 3, p. 395, 2021. doi: 10.3390/antiox10030395.

CHENG, R.; MUKHOPADHYAY, S.; MERTIS, A.; BOLLING, B.; NASCAR, F.; COFFEY, L.L.; POWERS, A.; WEAVER, S.C.; ICTV. ICTV virus taxonomy profile: *Togaviridae*. *Journal of General Virology*. v. 99, n. 6, 2018. doi: 10.1099/jgv.0.001072

CHOUIN-CARNEIRO, T.; ANT, T.H.; HERD, C.; LOUIS, F.; FAILLOUX, A.B.; SINKINS, S.P. Wolbachia strain wAlbA blocks Zika virus transmission in *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol*. v. 34, n. 1, p. 116-119, 2020. doi: 10.1111/mve.12384.

COSTA, L. S. da; SILVA, A. P. P. da; DA POIAN, A. T.; EL-BACHA, T. Mitochondrial Bioenergetic Alterations in Mouse Neuroblastoma Cells Infected with Sindbis Virus: Implications to Viral Replication and Neuronal Death. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. e33871, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0033871.

CRUZ, D. L. V. Víruses de importância médica. 2021. Disponível em: https://www.academia.edu/download/68397380/VIROSES_DE_IMPORTANCIA_MEDICA.pdf. Acesso em: 17 jun. 2024

DHANWANI, R.; KHAN, M.; BHASKAR, A.S.; SINGH, R.; PATRO, I.K.; RAO, P.V.; PARIDA, M.M. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. *Virus Res*. v. 163, n. 2, p. 563-72, 2012. doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.009.

DIAGNE, C. T.; BENGUE, M.; CHOUMET, V.; HAMEL, R.; POMPON, J.; MISSE, D. Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. *Pathogens*. v. 9, n. 738, 2020. doi:10.3390/pathogens9090738

DEMIRCI-ÇEKİÇ, S.; ÖZKAN, G.; AVAN, A.N.; UZUNBOY, S.; ÇAPANOĞLU, E.; APAK, R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal*. v. 5, n. 114477, 2022. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114477.

DONALISIO, M. R.; FREITAS A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arbovíruses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Revista Saúde Pública*. v.51, 2016. doi.org/10.1590/S1518-8787.2017051006889.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

ESTOFOLETE, C.F.; MOTA, M.T.; VEDOVELLO, D.; GÓNGORA, D.V., MAIA, I.L.; NOGUEIRA, M.L. Mayaro fever in an HIV-infected patient suspected of having Chikungunya fever. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 49, n. 5, p. 648-652, 2016. doi: 10.1590/0037-8682-0093-2016

FIGUEIREDO, L. T. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.48, n. 3. p. 233-234, 2015. doi: 10.1590/0037-8682-0179-2015. PMID: 26107998.

FIGUEIREDO, R.M.P.; THATCHER, B.D.; LIMA, M.L.; ALMEIDA, T.C; ALECRIM, W.D.; GUERRA, M.V.F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 37, n. 6, p. 476-9, 2004.

FRANCIOSO, A.; FANELLI, S.; CAVALLARO, R.A.; FONTANA, M.; MATTIOLI, R.; D'ERME, M.; MOSCA, L. Fluorometric Optimized Determination of Total Glutathione in Erythrocytes. *Separations.* v. 8, n. 6, p. 83, 2021. doi.org/10.3390/separations8060083

FRANCISCO, C. M.; SILVA, W. F. Fatores que influenciam no repasto sanguíneo de mosquitos de importância médica: um levantamento bibliográfico. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 7, n. 3, p. 60–65, 2019. doi: 10.22239/2317-269X.01254.

FRANZKE, K.; LEGGEWIE, M.; SREENU, V.B.; JANSEN, S.; HEITMANN, A.; WELCH, S.R.; BRENNAN, B.; ELLIOTT, R.M.; TANNICH, E.; BECKER, S.C.; SCHNETTLER, E. Detection, infection dynamics and small RNA response against Culex Y virus in mosquito-derived cells. *J Gen Virol.* v. 99, n.12, p. 1739-1745, 2018. doi: 10.1099/jgv.0.001173.

FRITSH, S. D.; WEICHHART, T. Effects of interferons and viruses on metabolism. *Frontiers in Immunology.* v. 7, 2016. doi: 10.3389/fimmu.2016.00630

FREDERICKS, A. C.; RUSSELL, T. A.; WALLACE, L. E.; DAVIDSON, A. D.; FERNANDEZ-SESMA, A.; MARINGER, K. *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.* v. 13, n. 11, p. e0007346, 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0007346

FELIX, L. S. Aspectos celulares e moleculares do processo de interação dos vírus dengue e zika com o mosquito vetor. 2022. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: Identificação, biologia, epidemiologia. Vol. 2. 1ª. Ed. São Paulo; Editora da Universidade de São Paulo, 2002. p. 91

GASCHLER, M.M.; STOCKWELL, B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 482, n.3, p. 419-425, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.

GESTO, J.S.M.; RIBEIRO, G.S.; ROCHA, M.N.; DIAS, F.B.S.; PEIXOTO, J.; CARVALHO, F.D.; PEREIRA, T.N.; MOREIRA, L.A. Reduced competence to arboviruses following the sustainable invasion of *Wolbachia* into native *Aedes aegypti* from Southeastern Brazil. *Sci Rep.* v. 11, n.1, p. 10039, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-89409-8.

GÖERTZ, G.P.; MIESEN, P.; OVERHEUL, G.J.; VAN-RIJ, R.P.; VAN-OERS, M.M.; PIJLMAN, GP. Mosquito Small RNA Responses to West Nile and Insect-Specific Virus Infections in *Aedes* and *Culex* Mosquito Cells. *Viruses.* v. 11, n. 3, p. 271, 2019. doi: 10.3390/v11030271.

GREENSPAN, H.C.; ARUOMA, O.I. Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. *Immunol.* v. 15, pp. 209-213, 1994.

GRACE, T.D. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature.* v. 195, p, 788-789, 1962. doi:10.1038/195788a0.

GROTTO, D., VALENTINI, J., BOEIRA, S., PANIZ, C., MARIA, L. S., VICENTINI, J., MORO, A., CHARÃO, M., GARCIA, S. C., CARDOSO, S. G. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. *Química Nova.* v. 31, n. 2, p. 275-279, 2008. doi:10.1590/S0100-40422008000200016.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL B. Antioxidants: elixirs of life or media hype ? In: *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease.* Oxford: Oxford University Press, 1994. cap. 3, p 40-62.

HADWAN, M. H. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissue. BMC Biochemistry. v.19, n.7. 2018. doi: <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>.

HERNANDEZ, R.; SINODIS, C.; BROWN, D. T. Sindbis Virus: Propagation, Quantification, and Storage. Current Protocols in Microbiology. v. 16, n. 1, p. 15B.1.1 – 15B.1.41, 2010. doi: 10.1002/9780471426259.mc15b01s16

HERNANDEZ, R.; BROWN, D. T; PAREDES, A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. Advances in Virology. v. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/259382

HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. The Journal of Medical Research. v. 44, n. 3, p. 329, 1924.

HIGGS, M.R.; CHOUTEAU, P.; H. Lerat ‘Liver let die’: oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. J. Gen. Virol., v. 95, pp. 991-1004, 2014.

HOLMES, C, O.; BASORE, K.; FREMOUNT, H, D.; DIAMANTE, S, M. A molecular understanding of alphavirus entry. PLoS pathogens, v. 16, n. 10, e1008876, 2020. doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876.

HUYANG, Y.S.; HIGGS, S.; VALANDINGHAM, D. L. Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. Front Microbiol., v.10, p. 22, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00022

IWAMURA, T.; GUZMAN-HOLST, A.; MURRAY, K. A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. Nat. Commun. 2020, v. 11, 2130. doi:10.1038/s41467-020-16010-4

JACOBSON, M.D. Reactive oxygen species and programmed cell death. Trends Biochem Sci. v, 21, n. 3, p. 83-5, 1996

JOMOVA, K.; ALOMAR, S.Y.; ALWASEL, S.H.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K.; VALKO, M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight

antioxidants. Arch Toxicol. v. 98, n. 5, p. 1323-1367, 2024. doi: 10.1007/s00204-024-03696-4.

KECK, F.; BROOKS-FAULCONER, T.; LARK, T.; RAVISHANKAR, P.; BAILEY, C.; SALVADOR-MORALES, C.; NARAYANAN, Altered mitochondrial dynamics as a consequence of Venezuelan Equine encephalitis virus infection. Virulence, v. 8, n. 8, p. 1849–1866, 2017. DOI: 10.1080/21505594.2016.1276690.

KOH, E.H.; LEE, W.J.; LEE, S.A.; KIM, E.H.; CHO, E.H.; JEONG, E.; KIM, D.W.; KIM, M.S.; PARK, J.Y.; PARK, K.G.; LEE, H.J.; LEE, I.K.; LIM, S.; JANG, H.C.; LEE, K.H.; LEE, K.U. Effects of alpha-lipoic acid on body weight in obese subjects. Am J Med. v. 85, p. e1-8, 2011. doi: 10.1016/j.amjmed.2010.08.005.

KOONIN, E. V.; KRUPOVIC, M.; AGOL, V.I. A classificação de vírus de Baltimore 50 anos depois: como ela se posiciona à luz da evolução do vírus? Microbiol Mol Biol Rev. v. 85, n. 3, p. e0005321, 2021. doi:10.1128/MMBR.00053-21.

KOW, C. Y., KOON, L. L., YIN, P. F. Detection of Dengue Viruses in Field Caught Male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by Type Specific PCR. Journal of Medical Entomology. v. 38, n. 4, p. 475–479, 1 jul. 2001. doi: 10.1603/0022-2585-38.4.475.

KUMAR, S.; MISRA, U.K.; KALITA, J.; KHANNA, V.K.; KHAN, M.Y. Imbalance in oxidant/antioxidant system in different brain regions of rat after the infection of Japanese encephalitis virus. Neurochem. Int. v. 55, p. 6408-654, 2009.

LAURENT, T.; KUMAR, P.; LIESE, S.; ZARE, F.; JONASSON, M.; CARLSON, A.; CARLSON, L-A. Architecture of the chikungunya virus replication organelle. eLife, v. 11, p. e83042, 2022. DOI: 10.7554/eLife.83042.

LEE, W. S. WEBSTER, J. A., MADZOKERE, E. T., Stephenson, E.B.; Herrero, L. J. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. Parasites & Vectors 2019 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–12, 11, 2019. doi: 10.1186/S13071-019-3433-8.

LEUNG, J. Y.; NG, M. M.; CHU, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Advances in Virology*, v. 249640, 2011. doi.org/10.1155/2011/249640

LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and immunity*, v. 71, n. 9, p. 5324–5331, 2003. doi: 10.1128/IAI.71.9.5324-5331.2003.

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

LORENZ, C.; FREITAS-RIBEIRO, A.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Mayaro virus distribution in South America. *Acta Trop.* v. 198, n. 105093, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105093.

LUCCHI, D. B. M. Análise comparativa das cinéticas de infecção entre os alphavírus Chikungunya e Mayaro em diferentes modelos celulares imortalizados. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de São Paulo.

LWANDE, O. W.; OBANDA, V.; LINDSTROM, A.; AHLM, C.; EVANDER, M.; NASLUND, J.; BUCHT, G. Globe-trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: risk factors for arbovirus pandemics. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. v. 20, n. 2, p. 71 – 81, 2020. doi:10.1089/vbz.2019.2486

MACHADO, C. J. S.; MIAGOSTOVICH, MP; LEITE, J.P.G; VILANI, R.M. Promoção da relação saúde-saneamento-cidade por meio da Virologia Ambiental. *Revista de informação legislativa*, v. 50, n. 199, p. 321-345, 2013.

MADEWELL, Z. Arboviruses and Their Vectors. *Sul Med J.* v. 113, p. 520-523, 2020. doi:10.14423/SMJ.0000000000001152.

MAHMOOD, S.; KAWANAKA, M.; KAMEI, A.; IZUMI, A.; NAKATA, K.; NIIYAMA, G.; IKEDA, H.; HANANO, S.; SUEHIRO, M.; TOGAWA, K.; YAMADA, G. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress markers in chronic hepatitis C. *Antioxid. Redox. Signal.*, v. 6, p. 19, 2004.

MARCONDES, C. B. Entomologia Médica e Veterinária. 1ª. Ed. São Paulo; Atheneu, 2001. p. 423

MARTINS, M. C. C.; SANTOS, A. S. S.; OLIVEIRA, L. A. A.; PRIMO, M. G. S. Biological indicators of oxidative stress malondialdehyde, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase and their application in nutrition. Springer, 2022. doi: doi.org/10.1007/978-3-031-07389-2_49.

MARINGER, K.; YOUSUF, A.; HEESOM, K. J.; FAN, J.; LEE, D.; FERNANDEZ-SESMA, A.; BESSANT, C.; MATTHEWS, D. A.; DAVIDSON, A. D. Proteomics informed by transcriptomics for characterising active transposable elements and genome annotation in *Aedes aegypti*. BMC Genomics. v. 18, n. 1, p. 101, 2017. doi: 10.1186/s12864-016-3432-5.

MESQUITA, T. C. R., ROSA, A. P., BORGES, A. C. Mudanças Climáticas e seu Impacto na Incidência de Arboviroses: Uma Revisão Sistemática de Estudos Recentes. Revista Brasileira De Geografia Física, v. 14, n. 6, p. 3361-3377, 2021. doi:/10.26848/rbgf.v14.6.p3355-3371

MIRSA, H. P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, J. Biol. Chem. v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MOURÃO, M.P.; BASTOS, M.D.E.S.; DE FIGUEIREDO, R.P.; GIMAQUE, J.B.; GALUSSO-EDOS, S.; KRAMER, V.M.; DE OLIVEIRA, C.M.; NAVECA, F.G.; FIGUEIREDO, L.T. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. Vector Borne Zoonotic Dis. v. 12, n. 1, p. 42-6, 2012. doi: 10.1089/vbz.2011.0669.

MORAIS, V., SANTANA, L., BEZERRA, J., CRUZ, F., DE SOUZA, T., TAHMASEBI, R., RAPOSO, R., MARCATTI, R., BARBOSA, E., HEFFORD, P., BUCCHERI, R., SABINO, E., DA COSTA, A. Detection of coinfection with Primate Erythroparvovirus 1 and arboviruses (DENV, CHIKV and ZIKV) in individuals with acute febrile illness in the state of Rio Grande do Norte in 2016. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 17, 2023. doi:0.1371/journal.pntd.0011701.

doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3

MOTA, M. T. DE O., RIBEIRO, M. R., VEDOVELLO, D., NOGUEIRA, M. L. Mayaro Virus: a Neglected Arbovirus of the Americas. *Future Virology*, v. 10, n. 9, p. 1109 - 1122, 2015. doi:10.2217/fvl.15.76.

MUÑOZ, M., NAVARRO, J. C. Vírus Mayaro: um arbovírus reemergente na Venezuela e na América Latina. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, v. 32, n. 2, p. 286–302, 2012. doi:10.1590/S0120-41572012000300017

MUNIVENKATAPPA, A.; NYAYANIT, D.A.; YADAV, P.D.; RANGAPPA, M.; PATIL, S.; MAJUMDAR, T.; MOHANDAS, S.; SINHA, D.P.; JAYASWAMY, M.M.; OMPRAKASH, P. Identification of Phasi Charoen-Like Phasivirus in Field Collected *Aedes aegypti* from Karnataka State, India. *Vector Borne Zoonotic Dis.* v.21, n.11, p. 900-909, 2021. doi: 10.1089/vbz.2021.0011. Epub 2021 Sep 14. PMID: 34520272.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NAPOLÉÃO-PEGO, P.; GOMES, L. P.; PROVANCE-JR, D. W.; DE-SIMONE, S. G. Mayaro vírus disease. *Journal of Human Virology & Retrovirology*. v. 1, n. 3, p. 00018, 2014. doi:10.15406/jhvr.2014.01.00018

NASLUND, J.; AHLN, C.; ISLAM, K.; EVANDER, M.; BUCHT, G.; LWANDE, O. W. Emerging mosquito-borne viruses linked to *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: global status and preventive strategies. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. v. 21, n. 10, p. 731 – 826, 2021. doi:10.1089/vbz.2020.2762

NAVARRETE-ESPINOSA, J.; GÓMEZ-DANTÉS, H. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. v. 44, n. 4, p. 347-53, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. São Paulo: Artmed, 2014

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PAN, X., PIKE, A., JOSHI, D., BIAN, G., MCFADDEN, M.J., LU P., LIANG, X., ZHANG, F., RAIKEL, A.S., XI, Z. The bacterium *Wolbachia* exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. ISME Journal, v. 12, n. 1, p. 277–288, 2018. doi: 10.1038/ismej.2017.174.

PARRY, R. H.; ASGARI, S. Aedes Anphevirus: an Insect-Specific Virus Distributed Worldwide in *Aedes aegypti* Mosquitoes That Has Complex Interplays with *Wolbachia* and Dengue Virus Infection in Cells. Journal of Virology, v. 92, 2018. doi: 10.1128/JVI.00224-18.

PELEG, J. Growth of arboviruses in primary tissue culture of *Aedes aegypti* embryos. Am J Trop Med Hyg. v. 17, p. 219-223, 1968.

PETERHANS, E. Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. Biochem Biophys Res Commun. v, 91, n. 1, p. 383-92, 1979. doi: 10.1016/0006-291x(79)90630-2.

PIAZZI, C. F. Mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio pelos complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de São Paulo.

PIZZORNO, J. Glutathione! Integr Med (Encinitas), v. 13, n. 1, p. 8-12, 2014.

POWERS, A.M.; AGUILAR, P.V.; CHANDLER, L.J.; BRAULT, A.C.; MEAKINS, T.A.; WATTS, D.; RUSSELL, K.L.; OLSON, J.; VASCONCELOS, P.F.; DA ROSA, A.T.; WEAVER, S.C.; TESH, R.B. Genetic relationships among mayaro and una viruses suggest distinct patterns of transmission. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 75, n. 3, p. 461–469, 2006.

QIAO, J.; LIU, Q. Interplay between autophagy and Sindbis virus in cells derived from key arbovirus vectors, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes. Cell Signal, v. 90, p. 110204, 2022.

REED, W. Recent researches concerning the etiology, propagation and prevention of yellow fever by the U.S. Army Commission. J. Hyg., Camb. v. 2, p. 101-19, 1902. doi: 10.1017/s0022172400001856

RESHI, M.L.; SU, Y.C.; HONG, J.R. RNA viruses: ROS-mediated cell death. Int. J. Cell. Biol., v. 2014, p. 467452, 2014. doi: 10.1155/2014/467452.

REY JR, LOUNIBOS P. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. *Biomédica*, 35: 177 - 85. 2015. doi: 10.7705/biomedica.v35i2.2514.

RODRIGUEZ, J. L.; COSTLOW, J. L.; SHEEDY, M.; YOON, K. T.; GABALDON, A. M.; STEEL, J. J. Sindbis virus replication reduces dependence on mitochondrial metabolism during infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 12, n. 859814, 2022.

SAEAUE, L.; MORALES, N. P.; KOMALAMISRA, N.; MORALES VARGAS, R. E. Antioxidative systems defense against oxidative stress induced by blood meal in *Aedes aegypti*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, [S.l.], v. 42, n. 3, p. 542–549, 2011.

SANTOS, S. A. K. Vírus Mayaro: Doença Infeciosa da Região Amazônica. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Educação e Meio Ambiente.

SANTANA-ROMÁN, M.E.; MAYCOTTE, P.; URIBE-CARVAJAL, S.; URIBE-ALVAREZ, C.; ALVARADO-MEDINA, N.; KHAN, M.; SIDDIQUI, A.; PANDO-ROBLES, V. Monitoring Mitochondrial Function in *Aedes albopictus* C6/36 Cell Line during Dengue Virus Infection. *Insects*. v. 12, n.10, p. 934. doi: 10.3390/insects12100934.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010. doi:10.1038/nrmicro2368

SCOTT, J.C.; BRACKNEY, D.E.; CAMPBELL, C.L.; BONDU-HAWKINS, V.; HJELLE, B.; EBEL, G.D.; OLSON, K.E.; BLAIR, C.D. Comparison of dengue virus type 2-specific small RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010, 4: e848. 10.1371/journal.pntd.0000848.

SENFT, A.; DALTON, T. P.; SHERTZER, H. G. Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*. v. 280, n. 1, p. 80-86, 2000. doi.org/10.1006/abio.2000.4498

SILVA, J. W. P. Aspectos ecológicos de vetores putativos do vírus Mayaro e vírus Oropouche em estratificações verticais e horizontais em ambientes florestais e antropizados em uma comunidade rural no Amazonas. 2017. Dissertação de Mestrado. Instituto Leônidas e Maria Deane.

STOLLAR, V.; THOMAS, V. L. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*. v. 64, n. 2, p. 367 – 377, 1975. doi: 10.1016/0042-6822(75)90113-0.

TAVEIRA, L.A., FONTES, L.R., NATAL, D. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2001.

TEIXEIRA, R. B. Papel das espécies reativas de oxigênio sobre os níveis de citocinas inflamatórias e proteínas apoptóticas no hipertireoidismo experimental. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/115697>.

THEILACKER, C.; HELD, J.; ALLERING, L.; EMMERICH, P.; SCHMIDT CHANASIT, J.; KERNWV. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. *BMC Infect Dis*, v. 13, p. 369, 2013.

TIAN, Y.; JIANG, W.; GAO, N.; ZHANG, J.; CHEN, W.; FAN, D.; ZHOU, D.; AN, J. Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 397, n. 3, p. 420-4, 2010. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.108.

TIKHE, V, T.; DIMOPOULOS, G. Mosquito antiviral immune pathways. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 116, p. 103964, 2021. DOI: 10.1016/j.dci.2020.103964.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. v. 552, p. 335-44, 2003. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.

USP. Pesquisadores da FMRP-USP identificam o vírus Mayaro circulando no estado de São Paulo. *Revista de Clínica Médica da FMRP-USP*, 2019. Disponível em: <https://rcm.fmrp.usp.br/pesquisadores-da-fmrp-usp-identificam-o-virus-mayaro-circulando-no-estado-de-sao-paulo/>. Acesso em: 28 dez. 2024.

VALLE, D.; BELLINATO, D.F.; VIANA-MEDEIROS, P.F.; LIMA, J.B.P.; MARTINS JUNIOR, A.J. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 114, p. e.180544, 2019. doi: 10.1590/0074-02760180544.

VARGAS, P. A.; LIMA, R. S.; PEREIRA, G. C.; MENEZES, R. A. Resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas químicos: uma revisão sistemática. *Cadernos de Biologia*, v. 37, n. 2, p. 87-102, 2022. doi: doi.org/10.13140/RG.2.2.44458.26772.

VASCONCELLOS, A. F.; MANDACARU, S. C.; OLIVEIRA, A. S.; FONTES, W.; MELO, R. M.; SOUSA, M. V.; RESENDE, R. O.; CHARNEAU, S. Dynamic proteomic analysis of *Aedes aegypti* Aag2 cells infected with Mayaro vírus. *Parasites Vectors*. v. 13, n. 297, 2020. doi.org/10.1186/s13071-020-04167-2

VASCONCELLOS, A.F.; MELO, R.M.; MANDACARU, S.C.; DE OLIVEIRA, L.S.; DE OLIVEIRA, A.S.; MORAES, E.C.D.S.; TRUGILHO, M.R.O.; RICART, C.A.O.; BÃO, S.N.; RESENDE, R.O.; CHARNEAU S. *Aedes aegypti* Aag-2 Cell Proteome Modulation in Response to Chikungunya Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. v. 12, p. 1–15, 2022. doi:10.3389/fcimb.2022.920425.

VIEIRA, C. J.; SILVA, D.J.; BARRETO, E. S.; SIQUEIRA, C. E.; COLOMBO, T. E.; OZANIC, K.; SCHMIDT, D. J.; DRUMOND, B. P.; MONDINI, A.; NOGUEIRA, M. L.; BRONZONI, R.V. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. *Acta Trop*. 2015

WALKER, T., JEFFRIES, C., MANSFIELD, K. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasit Vectors*, v. 20, n. 7, p. 382, 2014. doi: 10.1186/1756-3305-7-382.

WEAVER, C, S.; 2013 Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention – *PubMed* 21(8), 360–363. doi:10.1016/j.tim.2013.03.003

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*. v. 85, n. 2, p. 328-45. 2010.

WEI, L.L.L.; TOM, R.; KIM, Y.C. Mayaro Virus: An Emerging Alphavirus in the Americas. *Viruses*. v. 16, n. 8, p. 1297, 2024. doi: 10.3390/v16081297

WILLIAMS, V.M.; FILIPPOVA, M.; FILIPPOV, V.; PAYNE, K.J.; DUERKSEN-HUGHES., P. Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage. *J. Virol.* v. 88, pp. 6751-6761, 2014.

WHITE, S.K.; MAVIAN, C.; ELBADRY, M.A.; DE ROCHARS, V.M.; PAISIE, T.; TELISMA, T.; SALEMI, M.; LEDNICKY, J.A., MORRIS, J.G. Detection and phylogenetic characterization of arbovirus dual-infections among persons during a chikungunya fever outbreak, Haiti 2014. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 May 31;12(5):e0006505. doi: 10.1371/journal.pntd.0006505.

World Health Organization: Launch of the global Arbovirus initiative. 2022. Acessado em 12/08/2024, disponível em <<https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/03/31/default-calendar/global-arbo>>

YEN, Y.T.; CHEN, H.C.; LIN, Y.D.; SHIEH, C.C.; WU-HSIEH, B.A. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J. Virol.*, v. 82, p. 12312-12324, 2018.

YOSHINAKA Y, TAKAHASHI Y, NAKAMURA S, KATOH I, TAKIO K, IKAWA Y. Induction of manganese-superoxide dismutase in MRC-5 cells persistently infected with an alphavirus, sindbis. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 261, n. 1, p. 139-43, 1999. doi: 10.1006/bbrc.1999.0593.

ZAID, A., BURT, F., LIU, X. Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. *Lancet Infect Dis* v. 21, e123–e133, 2021. doi:10.1016/S14733099(20)30491-6.

ZHANG, G., ASAD, S.; KHRAMYKH, A.A.; ASGARI, S. Cell fusing agent virus and dengue virus mutually interact in *Aedes aegypti* cell lines. *Sci Rep.* v. 7, n. 1, p. 6935, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-07279-5.