

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA ANÁLISES DE METAVIROMA A
PARTIR DE AMOSTRAS DE MOSQUITOS E CULTURAS CELULARES

por

EVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

Sob Orientação do Professor Marcelo Henrique Santos Paiva - UFPE

RESUMO

Os vírus identificados em mosquitos são subdivididos em dois grupos: os arbovírus, transmitidos a vertebrados e capazes de realizar replicação em ambos os vetores e hospedeiros; e os vírus específicos de insetos (ISVs), que apresentam capacidade de replicação restrita ao hospedeiro invertebrado. Os descritos ISVs apresentam capacidade de modular respostas e efeitos contra arbovírus quando em coinfecção nos mosquitos, logo, um melhor entendimento acerca desses ISVs torna-se essencial para análises de possíveis interferências em estudos de arbovirologia. Na última década, o uso de ferramentas da metagenômica na vigilância de arbovírus tem se mostrado eficiente na descoberta de arbovírus circulantes e de novos ISVs, devido a sensibilidade e alto rendimento das técnicas empregadas em *Next-Generation Sequencing* (NGS). Sendo assim, o objetivo deste trabalho de dissertação foi estabelecer um protocolo para detecção de vírus (arbovírus e ISVs) em mosquitos e células (C6/36), de linhagens de laboratório, bem como identificar os ISVs nos respectivos grupos. Dois métodos foram testados para detecção desses vírus: por PCR convencional com o uso de *primers* degenerados para flavivírus e alfavírus, em amostras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*; e sequenciamento em larga escala, realizado tanto em amostras de mosquitos, quanto em células C6/36. Como resultado, não foi possível detectar ISVs por meio

da técnica de PCR convencional. Por outro lado, a análise de metaviroma por NGS revelou a presença dos vírus *Culex* bunyavírus e Wutai mosquito phasivirus em amostras de *Cx. quinquefasciatus*; e *Culex* densovirus em amostras de células C6/36 advindas de culturas de DENV1, DENV2 e DENV3. Adicionalmente, o genoma de *Culex* densovirus apresentou cobertura de 100%, com profundidade de 21.872x. Os resultados obtidos no presente trabalho disponibilizam um protocolo de metaviroma eficiente na detecção de ISVs e arbovírus, reforçando a necessidade de análises de metaviroma em mosquitos e células empregados em estudos de arbovirologia.

PALAVRAS-CHAVE: NGS, mosquitos vetores, ISVs, Flaviviridae, Togaviridae e Parvoviridae

ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR METAVIROME ANALYSIS FROM
MOSQUITOES AND CELL CULTURES SAMPLES

por

EVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

Sob Orientação do Professor Marcelo Henrique Santos Paiva

ABSTRACT

Viruses identified in mosquitoes are subdivided into two groups: arboviruses, transmitted to vertebrates and able to replicate in both vectors and hosts, and insect-specific viruses (ISVs), which have replication capacity restricted to the invertebrate host. ISVs have the capacity to modulate responses and effects against arboviruses when co-infected in mosquitoes, therefore, the prospection of these ISVs becomes essential for analyzes of possible interferences in arbovirology studies. In the last decade, the use of metagenomics tools in the surveillance of medically important arboviruses has been shown to be efficient in the discovery of new ISVs, due to the sensitivity and high throughput of the techniques employed in next-generation sequencing (NGS). Therefore, the objective of this work was to establish a protocol for the detection of virus (ISVs and arboviruses) in mosquitoes and C6/36 cells from laboratory strains, and perform the identification of ISVs in the respective groups. Two methods for virus detection were tested: by conventional PCR using degenerate *primers* for flaviviruses and alphaviruses, using *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* samples; and next-generation sequencing, in samples of laboratory mosquitoes and C6/36 cells. It was not possible to detect ISVs using the conventional PCR technique. Metavirome analysis by NGS reveals three viruses: Culex bunyavirus and Wutai mosquito phasivirus in samples of *Cx. quinquefasciatus*. Culex densovirus was detected in three of four supernatant samples from C6/36

cells from DENV1, DENV2 and DENV3 cultures. Culex densovirus had 100% coverage of the genome with a depth of 21.872x. The results obtained in the present work provide an efficient metaviroma protocol for the detection of ISVs and arboviruses, reinforcing the need for metaviroma analyzes in mosquitoes and cells used in arbovirology studies.

KEY WORDS: NGS, vector mosquitoes, ISVs, Flaviviridae, Togaviridae and Parvoviridae

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA ANÁLISES DE METAVIROMA A
PARTIR DE AMOSTRAS DE MOSQUITOS E CULTURAS CELULARES

por

EVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Entomologia.

RECIFE - PE

Fevereiro-2023

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA ANÁLISES DE METAVIROMA A
PARTIR DE AMOSTRAS DE MOSQUITOS E CULTURAS CELULARES

por

EVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

Comitê de Orientação:

Marcelo Henrique Santos Paiva - UFPE

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA ANÁLISES DE METAVIROMA A
PARTIR DE AMOSTRAS DE MOSQUITOS E CULTURAS CELULARES

por

EVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

Banca Examinadora:

José Dijair Antonino de Souza Junior - UFRPE

Renato Antonio dos Santos Oliveira - UFPE

Marcelo Henrique Santos Paiva - UFPE

Evaldo Joaquim de Farias Filho
Mestre em Entomologia

Marcelo Henrique Santos Paiva - UFPE
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F224e de Farias Filho, Evaldo Joaquim
Estabelecimento de um protocolo para análises de metaviroma a partir de amostras de mosquitos e culturas celulares / Evaldo Joaquim de Farias Filho. - 2023.
73 f. : il.
- Orientador: Marcelo Henrique Santos Paiva.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Recife, 2023.
1. NGS. 2. Mosquitos vetores. 3. ISVs. 4. Flaviviridae. 5. Togaviridae. I. Paiva, Marcelo Henrique Santos, orient. II. Título

CDD 632.7

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Walmeria Lacerda de Farias, pelo amor incondicional e por sonhar junto a mim,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia (PPGE).

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES – PROEX), pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa.

Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), pelo apoio e infraestrutura cedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Marcelo Paiva, pelo apoio, confiança, acolhimento, e todo conhecimento científico que me foi passado durante esse período.

Aos meus amigos do PPGE, Vitor Quintela, Ianne Nobre e Elton Galdino, pelos pedais, sorrisos e conhecimento compartilhado durante esses anos, levarei vocês sempre comigo.

Aos meus colegas do departamento de Entomologia do IAM, em especial a Laís Ceschini, por todo apoio e conhecimentos transmitidos na bancada.

Aos meus amigos, Juci Brito, Kezia Gomes, Vitor Melo e Pedro Marinho. Não posso mensurar em palavras minha gratidão por TUDO que vivemos, desejo novos e bons caminhos para nós.

Aos meus pais, Walmeria e Evaldo por me incentivarem e me apoiarem, e por sempre me acolherem da melhor forma.

Às minhas irmãs e sobrinha, Edjara, Jamilly e Gaby, por todo apoio e parceria.

À minha vó Maria e minha tia Zilda, pelas orações e todo amor direcionado.

À toda minha família do Ilê Axé Obá Xangô, em especial minha Iyá Marlene e meu Bàbá Luiz, pelas orações, apoio e principalmente por me acalmarem e cuidarem tão bem de mim.

Agradeço a Olorum, Ogiyan e Osun, pelo progresso e por fazerem de mim um conquistador.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	viii
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	1
Vírus específicos de insetos; classificação geral e histórico	1
Origem e discussão evolutiva	2
Principais famílias virais que agrupam ISVs	3
Flaviviridae	3
Togaviridae	4
Bunyaviridae	5
Parvoviridae	6
Mecanismos de transmissão e fisiologia da infecção por ISVs	7
Competência vetorial e interação ISVs-arbovírus / ISVs-inseto	8
Perspectivas: vacinas e métodos de controle por ISVs	10
Estudos de metaviroma e o impacto na descoberta de novos ISVs	12
LITERATURA CITADA.....	13
2 ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR METAVIROME ANALYSIS FROM MOSQUITOES AND CELL CULTURES SAMPLES.....	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24

INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	36
AGRADECIMENTOS.....	39
LITERATURA CITADA.....	39
MATERIAL SUPLEMENTAR	59
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Vírus específicos de insetos; classificação geral e histórico

Os vírus identificados em mosquitos são subdivididos em dois grupos: aqueles transmitidos a vertebrados, capazes de realizar replicação em ambos os vetores e hospedeiros (arbovírus); e os vírus específicos de insetos (ISVs), os quais infectam e se replicam restritamente em insetos (Franzke *et al.* 2018). A descoberta dos ISVs abriu novas perspectivas sobre a extensão da diversidade e evolução viral, a influência da competência vetorial, bem como o potencial uso como agentes de controle biológico, e ainda em novas plataformas de vacinas (Vasilakis & Tesh 2015).

Stollar & Thomas (1975) registraram o primeiro ISV em células de *Ae. aegypti*. Devido aos efeitos visíveis nas células, este ISV foi denominado vírus agente de fusão celular (CFAV). Estes pesquisadores demonstraram que os efeitos observados não eram propagados a linhagens de células de vertebrados, tampouco puderam isolar os vírus nestas células, sugerindo especificidade celular para o grupo dos artrópodes (Stollar & Thomas, 1975). A descoberta do CFAV desencadeou uma série de estudos acerca das propriedades, estrutura e classificação desse vírus (Igarashi *et al.* 1976; Westaway *et al.* 1985). CFAV foi classificado dentro da família Flaviviridae e caracterizado molecularmente como vírus de RNA de sentido positivo (Cammisa-Parks *et al.* 1992). O primeiro ISV isolado em populações selvagens de mosquitos foi relatado em 2003 no Quênia, o vírus Kamiti River (KRV) (Crabtree *et al.* 2003). Posteriormente, os ISVs Quang Binh (QBV) e Nakiwogo (NAKV) foram isolados em mosquitos *Culex tritaeniorhynchus* e *Mansonia africana nigerrimade*, no Vietnã e Uganda, respectivamente (Crabtree *et al.* 2009, Cook *et al.* 2009).

Origem e discussão evolutiva

Os ISVs são encontrados em diversas regiões do globo. Vírus do gênero *Flavivirus* são identificados na Itália, Portugal, Espanha, Reino Unido, República Tcheca e Grécia (Calzolari *et al.* 2012, Cerutti *et al.* 2012, Osório *et al.* 2014, Vázquez *et al.* 2012, Papa *et al.* 2014); sequências relacionadas ao gênero flavivírus também foram detectadas em outras regiões a parte da Europa, revelando que estes vírus são amplamente distribuídos (Hoshino *et al.* 2012, Ochieng *et al.* 2013, Pabbaraju *et al.* 2014, Datta *et al.* 2015) (GenBank: EF423170-1). Estes vírus também foram identificados em flebotomíneos (família Psychodidae) e dípteros hematófagos taxonomicamente distantes da família Culicidae, na Argélia (Moureau *et al.* 2010) e Espanha (Sánchez-Seco *et al.* 2010; Calzolari *et al.* 2016). Esses dados asseguram que alguns grupos de ISVs podem ser amplamente distribuídos e também infectarem diferentes espécies de insetos, levando a questionamentos científicos acerca da origem e adaptações (Gómez *et al.* 2022).

Vários grupos de ISVs compartilham semelhanças a nível filogenético com arbovírus patogênicos, o que sugere processos de evolução a partir desses grupos. As hipóteses discutidas são que surgiram adaptações que tornaram os ISVs capazes de se replicar em vertebrados ou o inverso, onde os ISVs perderam a capacidade de replicação em vertebrados (Erasmus *et al.* 2017). Apesar do conhecimento restrito, as classificações filogenéticas incluem os ISVs em grupos de vírus infectantes de aves, mamíferos (roedores, primatas, animais domésticos), outros artrópodes e até vírus de plantas. O hábito alimentar dos mosquitos é a principal hipótese para a infecção por ISVs, como é o caso dos vírus derivados de plantas, no qual a dieta dos mosquitos com base em seiva de vegetais possibilita a entrada e possíveis adaptações para replicação nestes organismos. Também existe a hipótese de que ocorreu o inverso, onde vírus de mosquitos passam a se replicar outros organismos (Junglen & Drosten 2013; Bolling *et al.* 2015; Vasilakis & Tesh 2015; Carvalho & Long 2021).

Principais famílias virais que agrupam ISVs

Nos últimos anos múltiplas epidemias foram causadas por arbovírus transmitidos por artrópodes, resultando em graves problemas de saúde pública em todo o mundo. (Zanotto & Leite 2018). Com o advento de novas tecnologias e o barateamento das reações, como o sequenciamento em larga escala, bem como o avanço das ferramentas de bioinformática, foi dado o início de uma nova era de descobertas virais (Bolling *et al.* 2015). Muitos dos novos vírus descobertos recentemente foram isolados de mosquitos de vários gêneros, como *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*. Com isso, descobriu-se que esses ISVs são membros de famílias virais tradicionalmente associadas a patógenos arbovirais humanos, incluindo, entre outras, as famílias Flaviviridae, Togaviridae e Bunyaviridae (Roundy *et al.* 2017), que são caracterizadas na sequência.

Flaviviridae

A família Flaviviridae é composta por vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples. Sendo vírus envelopados de diâmetro próximo a 45 nm, com tamanho de aproximadamente 10 kb de comprimento, que codificam uma ou mais poliproteínas grandes que são clivadas pré e pós tradução, gerando proteínas virais maduras. As proteínas estruturais do vírion são: capsídeo (c), pré-membrana (prM) e envelope (E), sendo estas codificadas na extremidade 5' do genoma, enquanto os genes que codificam proteínas não estruturais (NS) estão localizados mais abaixo (Westaway *et al.* 1985; Chambers *et al.* 1990). Nas recentes revisões da família Flaviviridae, quatro gêneros são descritos: *Pegivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Flavivirus*. Nesses grupos são incluídos vírus de importância médica para humanos, vírus de importância veterinária e vírus associados a insetos (Круглов 2019; Bamford *et al.* 2022).

Um novo subgrupo dentro do gênero *Flavivirus* foi identificado, sendo este restrito a mosquitos quanto ao ciclo infeccioso (Bamford *et al.* 2022). Esses vírus foram classificados como flavivírus

específicos de insetos (ISFs) e são capazes de infectar vários gêneros de mosquitos, mas principalmente *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (Shi *et al.* 2016, 2018). O isolamento e a caracterização de ISFs fornecem informações essenciais sobre a história evolutiva do gênero *Flavivirus* (Harrison *et al.* 2020). Nos últimos anos, houve um aumento na identificação de novos vírus “semelhantes a flavivírus”, sendo a maioria destes identificados em invertebrados, mas que ainda não foram incorporados à taxonomia oficial por apresentarem variações na estrutura do genoma, como o comprimento variando até 20 kb (Parry & Asgari 2019; Porter *et al.* 2020; Paraskevopoulou *et al.* 2021).

Togaviridae

A família Togaviridae integra dois gêneros atualmente, sendo eles: *Rubivirus*, que agrupa o vírus da rubéola e mantém o ciclo apenas entre hospedeiros humanos, e *Alphavirus*, que corresponde a diversos arbovírus transmitidos a humanos por meio de culicídeos vetores, além de vírus específicos de insetos, que são abundantes neste gênero (Lefkowitz *et al.* 2018). Na caracterização estrutural, os alfavírus são envelopados e apresentam simetria icosaédrica, são vírus de RNA de cadeia simples. Os vírions têm 60-70 nm de diâmetro. O genoma viral é organizado em dois módulos: dois terços da extremidade 5' metilada codificam proteínas não estruturais (nsPs). A terceira extremidade 3' poliadenilada codifica as proteínas estruturais (E1, E2, E3 e 6K). As proteínas não estruturais têm um papel fundamental durante a transcrição e replicação do RNA viral. O genoma viral tem comprimento de 10 a 12 kb e localiza-se no capsídeo viral produzido pela proteína C (proteína do capsídeo). Ambos os elementos compõem o nucleocapsídeo envolto por um envelope de lipoproteína. Em geral, os classificados da família Togaviridae têm um ciclo de transmissão diferente e 23% e 10% de divergência de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (Griffin 2007).

Alguns ISVs são agrupados na família Togaviridae, especificamente no gênero *Alphavirus*. Dentre eles: Agua Salud Alphavirus (ASALV) encontrado em mosquitos da espécie *Culex declarator* (Hermanns *et al.* 2020); Alfavírus Taï Forest (TALV) encontrado em *Culex decens* (Hermanns *et al.* 2017); alfavírus Mwinilunga (MWAV), em *Culex quiquefasciatus* (Torii *et al.* 2018) e Eilat vírus (EILV), encontrado em amostras de *Anopheles coustani*, sendo esse um dos primeiros classificados do gênero *Alphavirus* descrito como ISV (Nasar *et al.* 2012; 2015).

Bunyaviridae

A família Bunyaviridae compreende a maior família de vírus de ácido ribonucleico (RNA), com cerca de 350 membros distinguíveis sorologicamente catalogados (King *et al.* 2012). Os vírus classificados nesta família são de RNA de cadeia simples, sentido negativo, envelopados e com genoma segmentado tripartido, que utiliza estratégias de replicação de sentido negativo ou ambisenso. São organizados estruturalmente em três segmentos de RNA (segmentos S, M e L). O segmento S codifica a proteína do nucleocapsídeo (N); o segmento M codifica as duas glicoproteínas (Gn e Gc) e o segmento L codifica a RdRp (RNA dependente de polimerase) (Hobson-Peters *et al.* 2016; Ribeiro *et al.* 2019).

Cinco gêneros compõem a família Bunyaviridae: *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*, com base em características estruturais e antigênicas. Os *Tospovirus* são caracterizados por infectar plantas, enquanto os quatro demais gêneros agrupam agentes infectantes de vertebrados. No gênero *Hantavírus*, o meio de transmissão ocorre por roedores, enquanto todos os bunyavírus são transmitidos por artrópodes vetores, como mosquitos, carrapatos e flebotomíneos (Hobson-Peters *et al.* 2016; Marklewitz *et al.* 2013, 2015). Dentro da ampla família *Bunyaviridae*, estão vários patógenos emergentes/reemergentes de interesse clínico e veterinário, incluindo, entre

outros, o vírus da febre do Rift Valley (RVFV), o vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo (CCHFV) e os hantavírus hemorrágicos (Roundy *et al.* 2017).

Parvoviridae

A família Parvoviridae agrupa vírus encontrados nos principais clados de vertebrados e invertebrados (Cotmore *et al.* 2014). São vírus compostos por ácido desoxirribonucleico (DNA), linear, de fita simples (ssDNA), variando de 4 a 6 kilobases (kb), apresentam tamanho pequeno, de 23-28 nm, formatação icosaédrica e sem envelope viral. Esses vírus se compõem de duas regiões codificantes principais que determinam a expressão de proteínas não estruturais (NS) e estruturais (VP), a maior é chamada proteína não estrutural 1, ou NS1, porta um domínio da superfamília helicase altamente conservado com helicase e atividade ATPase (Cotmore *et al.* 2019).

Essa classificação viral passou por um desmembramento das subfamílias Densovirinae (infectantes de invertebrados) e Parvovirinae (infectantes de vertebrados) em 2020, após uma revisão taxonômica, que considerou critérios filogenéticos e valores de similaridade de sequências de aminoácidos calculados a partir de comparações das sequências da proteína NS1 ou de seu domínio de helicase (Pénzes *et al.* 2020). O aparecimento de novos classificados associado a diferenças estruturais e genéticas leva a uma nova subdivisão do grupo em duas subfamílias: Densovirinae e Brevihamaparvovirus, sendo os ISVs agrupados nesta última subdivisão (Pénzes *et al.* 2020). Diversos vírus isolados de linhagens celulares de mosquitos foram classificados em Brevihamaparvovírus (Afanasiev *et al.* 1991; Ren *et al.* 2008), bem como vírus identificados em mosquitos selvagens, dentre as diferentes espécies de *Aedes* e *Culex* da Ásia (Kittayapong *et al.* 2001), Américas (Sadeghi *et al.* 2018), Europa (Silva *et al.* 2019) e África (Morais *et al.* 2020). Tais dados sugerem uma ampla distribuição desses classificados (Morais *et al.* 2022).

Mecanismos de transmissão e fisiologia da infecção por ISVs

Os vírus que infectam mosquitos, sejam arbovírus ou ISVs, são grupos mantidos na natureza por dois mecanismos citados no meio científico, sendo eles: transmissão horizontal, envolvendo mosquitos vetores e vertebrados. Neste tipo de transmissão a alimentação é uma análise indispensável na determinação do viroma (Lambrechts & Scott 2009; Fragkoudis *et al.* 2009). Outro formato comum é a transmissão vertical, onde a fêmea infectada transmite os vírus para sua prole, tal processo sustenta o mantimento subsequente (Duggal *et al.* 2019). Neste caso, ocorrem duas formas de transmissão para a prole: a transmissão transovariana, onde os vírus infectam os tecidos germinativos dos mosquitos fêmeas e, por consequência, infectam os ovos; e o método transovular, pelo qual os ovos são diretamente infectados pelos vírus na passagem pelo oviduto (Duggal *et al.* 2019, Rosen 1988). Diferentes estudos detectaram ISVs em formas imaturas (ovos e larvas) de mosquitos que não entraram em contato com repasto sanguíneo, ou não tiveram qualquer interação inseto-inseto, assegurando a transmissão vertical (Ye *et al.* 2020, Agboli *et al.* 2019).

A via de transmissão venérea também é mencionada por Agarwal e colaboradores (2017) na transmissão de ISVs. A detecção de vírus específicos de insetos em mosquitos machos e fêmeas sugere o modo de transmissão vertical, mas também pode indicar a transmissão venérea, que é a transmissão do vírus de um mosquito macho infectado para uma fêmea durante o processo de cópula (Heinig-Hartberger *et al.* 2023). Estudos mostraram que este tipo de transmissão pode ocorrer como um dos mecanismos de mantimento dos ISVs, mesmo representando um papel menor em comparação com a transmissão vertical (Bolling *et al.* 2012; Saiyasombat *et al.* 2011).

Nos mecanismos de infecção horizontal, os vírus passam por vias de defesa do inseto. Assim como todo organismo, os insetos apresentam em seu complexo fisiológico, um sistema de defesa contra qualquer corpo não integrado considerado patógeno. Na infecção viral, os mosquitos dependem do RNA de interferência (RNAi) como sua defesa primária, onde ocorre a seguinte

mecanismo: O RNA de cadeia dupla intracelular (dsRNA) é clivado em pequenas moléculas efetoras de RNA (sRNA) direcionando o silenciamento de sequências de RNA complementares. Múltiplas vias, incluindo small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA) e PIWI-*interacting* RNA (piRNA), contribuem para este processo (Keene *et al.* 2004; Brackney, Beane & Ebel 2009; Sánchez-Vargas *et al.* 2009). Basicamente quando essa via é ativada ocorre a degradação do RNA viral, inibindo a replicação dessas partículas (Lee *et al.* 2019).

Os mecanismos que tornam esses vírus específicos na infecção de insetos relacionam-se aos estágios do ciclo de infecção celular de vertebrados, por meio de respostas antivirais. Uma outra condição discutida acerca dos mecanismos de transmissão de ISVs para vertebrados é a temperatura diferenciada entre os vertebrados e os invertebrados, especificamente os mosquitos (Harrison *et al.* 2020). Uma proteína antiviral, denominada dedo de zinco (ZFP), ocorre em células de vertebrados se ligando a dinucleotídeos CG no RNA viral para limitar a replicação do vírus (Gao, Guo & Goff 2002). Estudos recentes lançam insights sobre a porção desses dinucleotídeos CG em genomas de ISVs ser mais abundante em comparação aos arbovírus (Blitvich & Firth 2015), logo, Colmant e colaboradores (2021) investigaram a supressão da via, obtendo respostas que indicam que a proteína ZFP de vertebrados desempenha uma barreira importante na proteção celular contra infecção por ISVs (Colmant *et al.* 2021).

Competência vetorial e interação ISVs-arbovírus / ISVs-inseto

Diversos estudos têm sido conduzidos para a descoberta de novos vírus e principalmente para a compreensão do papel dos ISVs a nível fisiológico, no que diz respeito a interação entre a partícula viral e o hospedeiro (Cansado-Utrilla *et al.* 2021; Gao *et al.* 2020). A especificidade celular, bem como a capacidade de ativação do sistema imune inato de alguns vírus, pode modular os efeitos de replicação para arbovírus patogênicos, seja favorecendo ou inibindo o crescimento do mesmo no

hospedeiro. Esses efeitos são promissores em diversas áreas, como o controle biológico de mosquitos com o uso destes ISVs, bloqueio de infecções por arbovírus e até o desenvolvimento de vacinas com a utilização de ISVs (Patterson *et al.* 2020).

Um estudo desenvolvido por Olmo e colaboradores (2023), mostrou que mosquitos selvagens da espécie *Ae. aegypti* quando infectados pelos vírus: Phasi Charoen-like (PCLV) e Humaita Tubiacanga vírus (HTV) têm um aumento de 200% nas chances de estarem também infectados por DENV. O estudo também mostrou que a presença desses ISVs aumenta a capacidade de transmitir os arbovírus DENV e ZIKV para o hospedeiro vertebrado, utilizando camundongos como modelo de infecção (Olmo *et al.* 2023).

Kenney e colaboradores (2014) revelaram em seus estudos que a infecção de células de mosquito por um ISV, Nhumirim (NHUV) resulta na redução significativa da produção viral de três distintos vírus: o vírus do Nilo Ocidental (WNV), Vírus da encefalite de St. Louis (SLEV) e vírus da encefalite japonesa. Esse efeito se mostra mais eficiente em estados de coinfeção do NHUV com WNV e SLEV, reduzindo o pico da infecção em mais de um milhão de vezes e 10.000 vezes, respectivamente (Kenney *et al.* 2014).

O ISV *Culex* Flavivirus (CxFV) apresenta efeitos na competência vetorial para o vírus do Nilo Ocidental (WNV), segundo um estudo realizado em 2012, por Bolling e colaboradores. Nos experimentos de competência vetorial ocorre uma supressão na replicação do WNV nos casos de infecção de CxFV em *Cx. pipiens*. O estudo também revela a disseminação tardia de superinfecção do arbovírus WNV, sugerindo que o CxFV afeta a intensidade da transmissão enzoótica do WNV (Bolling *et al.* 2012).

Schultz e colaboradores (2018) revelam que o vírus Phasi Charoen-like (PCLV) estava presente em linhagens de células de *Ae. aegypti* infectadas com ZIKV. O mesmo ISV não infectava linhagens de células de *Ae. albopictus*. Em estudos anteriores do grupo, foi observado que o vírus

Zika não infectava as linhagens de células *Ae. aegypti*, sugerindo que o PCLV interfere no crescimento do ZIKV nesta linhagem. Esses dados asseguram que a infecção por ISVs em linhagens de células pode modular os efeitos de infecção e/ou crescimento de arbovírus (Schultz *et al.* 2018).

Perspectivas: vacinas e métodos de controle por ISVs

Os ISVs e respectivas descobertas apresentam mecanismos promissores no meio científico atualmente. Estudos sobre controle biológico de arbovírus, controle de vetores, vacinas e desenvolvimento de plataformas de diagnóstico são desempenhados frequentemente como busca de inovação nesse importante campo (Carvalho *et al.* 2021). Segundo a Organização mundial de Saúde (OMS), a vacinação é a profilaxia de melhor eficácia e segurança contra doenças infecciosas (WHO 2023). Poucas arboviroses possuem vacinas com efeito validado atualmente, a vacina contra febre amarela e a vacina contra DENV são as únicas registradas, sendo a vacina de dengue considerada inviável para alguns sorotipos e não tão estendida aos programas de saúde, vacinas contra CHIKV e ZIKV também se mostram promissoras, mas ainda estão em fases de teste (Carvalho *et al.* 2021).

Como descrito neste capítulo, os ISVs infectam naturalmente mosquitos e flebotomíneos, utilizando-se de suas células para replicar-se, mas são incapazes de se replicar em vertebrados e suas células (Vasilakis & Tesh 2015; Bolling *et al.* 2015). Com base na semelhança entre alguns ISVs e arbovírus foram propostas vacinas usando ISVs, por meio de tecnologias de recombinação gerando quimeras. Esse mecanismo consiste basicamente na recombinação entre proteínas estruturais de arbovírus e ISVs, trazendo ao vertebrado a ativação da imunidade sem que haja replicação do vírus no organismo (Hobson-Peters, *et al.* 2019). Essa estratégia é mais segura em comparação com vacinas atenuadas que exibem risco de infecção em casos de inativação parcial dos arbovírus empregados. Além disso, quando comparadas com vacinas inativadas, essas construções não

precisam de inativação química ou física, o que muitas vezes diminui ou mesmo anula a imunogenicidade e antigenicidade ao vírus selvagem (Erasmus *et al.* 2017).

O ISV Eilat (EILV) (Togaviridae, *Alphavirus*) foi usado como plataforma na produção de uma vacina contra CHIKV. O vírus quimérico teve replicação bem-sucedida, semelhante ao CHIKV, nos estágios iniciais (fixação e entrada para entrega de RNA viral) em células de vertebrados, contudo foi defeituoso na replicação produtiva. A respectiva vacina foi inoculada em animais de laboratório (roedores) e não houve detecção dos vírus, o que mostra a ausência de replicação da quimera. Esta vacina quimérica EILV/CHIKV resultou em imunogenicidade rápida, robusta e durável. De acordo com os resultados, uma única dose da vacina foi eficaz em dois modelos de camundongos diferentes e um modelo de NHP gerando rapidamente anticorpos (dentro de 4 dias) e com duração de mais de 290 dias (Erasmus *et al.* 2017). Após a proposta, a vacina EILV/CHIKV foi novamente testada por outro grupo, se mostrando novamente como forte indutor da imunidade inata e adaptativa em camundongos, sendo caracterizada também como de baixo custo para produção (Adam *et al.* 2021).

Patógenos do gênero *Flavivirus*, DENV, vírus da febre amarela (YFV), ZIKV, WNV e JEV foram combinados com um ISV descoberto recentemente: vírus Binjari (BINJV). Os genes das proteínas preM e E foram trocados por genes de cada um dos arbovírus mencionados usando uma metodologia modificada de Reação de Extensão da Polimerase Circular (CPER) e foram confirmados como semelhantes aos arbovírus parentais quanto a estrutura e caracteres imunológicos. Essas construções se replicaram bem nas células de mosquito, e apresentaram defeitos de replicação em células de vertebrados, como esperado. A respectiva vacina denominada BINJV/ZIKV-prME, foi inoculada em camundongos IFNAR $-/-$ com dose única de 2 ou 20 μ g, gerando uma resposta imune significativa caracterizada pela produção de IgG1 e IgG2c específicos para ZIKV, IgG total e anticorpos neutralizantes (Hobson-Peters *et al.* 2019; Vet *et al.* 2020).

O uso dessa metodologia com a vacina experimental BINJV/WNVKUN-prME (contra a cepa Kunjin do vírus do oeste do Nilo (WNV) foi liberada pelas autoridades australianas para aplicação restrita a animais que vivem ao ar livre em fazendas, sob condições mínimas de biocontenção, objetivando o impedimento de infecções por WNV (Hobson-Peters *et al.* 2019).

Estudos de metaviroma e o impacto na descoberta de novos ISVs

Nem todos os vírus causam efeitos citopáticos visíveis, e a metagenômica possibilitou a identificação destes. A vigilância dos perfis de viroma na identificação de arbovírus, além de importante na prevenção e controle desses agentes, traz uma gama de resultados e descobertas de novos vírus desconhecidos, devido a sensibilidade e alto rendimento das técnicas empregadas no sequenciamento em larga escala. Nas técnicas tradicionais de detecção viral eram realizadas a triagem a nível de família ou gênero dos vírus detectados, ocorrendo um baixo rendimento na identificação e classificação destes vírus (He *et al.* 2021). Os primeiros ISVs eram classificados em flavivírus específicos de insetos (ISFs), pois eram restritos a identificações deste gênero (Crabtree *et al.* 2003). As principais técnicas utilizadas na identificação destes vírus eram por RT-PCR convencional, utilizando *primers* universais de flavivírus, seguido de sequenciamento de primeira geração (Método de Sanger) (Blitvich *et al.* 2009).

Nos últimos dez anos uma série de estudos de metaviroma foram incluídos no meio científico, trazendo uma ampla caracterização de novos agentes, além de um crescimento nas entradas de novos genomas virais associados a insetos no GenBank (de Almeida *et al.* 2021). Em um único estudo realizado na região de Shaanxi-Gansu-Ningxia, na China, em 2019, foram caracterizadas a abundância e diversidade viral do gênero *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*: 116 classificações virais foram identificadas em 31 famílias virais, incluindo Flaviviridae, Togaviridae, Phasmaviridae, Phenuiviridae, e alguns vírus ainda não descritos (He *et al.* 2021).

Outro estudo de metaviroma conduzido em 2022 na região de Medellín, na Colômbia, foram identificados em *Ae. aegypti* pelo menos 17 classificações virais, sendo 16 destes vírus específicos de insetos. O vírus da dengue 3 foi detectado em uma amostra e foi o único vírus patogênico detectado. Já em *Ae. albopictus*, foram detectados 11 ISVs e um vírus de planta. Estes dados mostram que a composição do viroma parece ser específica da espécie. O estudo sugere, ainda, que os viromas são temporariamente estáveis, já que maioria dos vírus associados a ambas as espécies foi detectada em diferentes períodos de amostragem (Calle-Tobón *et al.* 2022).

No Brasil, Lara Pinto e colaboradores, 2017, analisaram o viroma de glândulas salivares de culicídeos de diferentes espécies, revelando a presença de sete vírus específicos de insetos, seis dos quais representam novas espécies Rhabdoviridae (vírus Lobeira), Chuviridae (vírus Cumbaru e Croada), Totiviridae (vírus Murici) e Partitiviridae (vírus Araticum e Angico). Além disso, dois pools de mosquitos apresentaram sequências do vírus Kaiowa, que já haviam sido relatadas no Pantanal Sul do Brasil (Lara Pinto *et al.* 2017).

A prospecção de vírus em insetos e células modelo torna-se indispensável em estudos de virologia, sabendo-se atualmente os efeitos dos ISVs em interação com arbovírus, que podem interferir e modular respostas não-alvo (Nouri *et al.* 2018). De acordo com os estudos aqui apresentados, as análises de metaviroma mostram-se altamente sensíveis nesse objetivo. Poucos protocolos são descritos no meio científico para tais fins (Bolling *et al.* 2015, Moonen *et al.* 2023), havendo então a necessidade de implementação e estabelecimento de protocolos eficientes na detecção de ISVs.

Literatura Citada

Adam, A., H. Luo, S. R. Osman, B. Wang, C. M. Roundy, A. J. Auguste & T. Wang. 2021. Optimized production and immunogenicity of an insect virus-based chikungunya virus candidate vaccine in cell culture and animal models. *Emerg. Microbes Infect.* 10(1), 305-316.

- Afanasiev, B. N., E. E. Galyov, L. P. Buchatsky & Y. V. Kozlov. 1991.** Nucleotide sequence and genornic organization of aedes densonucleosis virus. *Virology*, 185(1), 323-336.
- Agboli, E., M. Leggewie, M. Altinli & E. Schnettler. 2019.** Mosquito-specific viruses transmission and interaction. *Viruses*, 11(9), 873.
- Bamford, C. G., W. M. de Souza, R. Parry & R. J. Gifford. 2022.** Comparative analysis of genome-encoded viral sequences reveals the evolutionary history of flavivirids (family Flaviviridae). *Virus Evol.* 8(2), veac085.
- Blitvich, B. J., & A. E. Firth. 2015.** Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*, 7(4), 1927-1959.
- Blitvich, B. J., M. Lin, K. S. Dorman, V. Soto, E. Hovav, B. J. Tucker & L. C. Bartholomay 2009.** Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex* flavivirus, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *J. Med. Entomol.* 46(4), 934-941.
- Bolling, B. G., S. C. Weaver, R. B. Tesh & N. Vasilakis. 2015.** Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses*, 7(9), 4911-4928.
- Bolling, B. G., F. J. Olea-Popelka, L. Eisen, C. G. Moore & C. D. Blair. 2012.** Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology*, 427(2), 90-97.
- Brackney, D. E., J. E. Beane & G. D. Ebel. 2009.** RNAi targeting of West Nile virus in mosquito midguts promotes virus diversification. *PLoS pathogens*, 5(7), e1000502.
- Calle-Tobón, A., J. Pérez-Pérez, N. Forero-Pineda, O. T. Chávez, W. Rojas-Montoya, G. Rúa-Uribe & A. Gómez-Palacio. 2022.** Local-scale virome depiction in Medellín, Colombia, supports significant differences between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Plos one*, 17(7), e0263143.
- Calzolari, M., L. Ze-Ze, D. Růžek, A. Vazquez, C. Jeffries, F. Defilippo & M. Dottori. 2012.** Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J. Gen. Virol.* 93(6), 1215-1225.
- Calzolari, M., L. Zé-Zé, A. Vázquez, M. P. S. Seco, F. Amaro & M. Dottori. 2016.** Insect-specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 381-388.
- Cammisa-Parks, H., L. A. Cisar, A. Kane & V. Stollar. 1992.** The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA

and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology*, 189(2), 511-524.

Cansado-Utrilla, C., S. Y. Zhao, P. J. McCall, K. L. Coon & G. L. Hughes. 2021. The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. *Microbiome*, 9(1), 1-11.

Carvalho, V. L., & M. T. Long. 2021. Insect-specific viruses: an overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. *Virology*, 557, 34-43.

Cerutti, F., M. Giacobini, A. Mosca, I. Grasso, L. Rambozzi, L. Rossi, & L. Bertolotti. 2012. Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasites & vectors*, 5(1), 1-7.

Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler & C. M. Rice. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44(1), 649-688.

Colmant, A. M., J. Hobson-Peters, T. A. Slijkerman, J. J. Harrison, G. P. Pijlman, M. M. van Oers & J. J. Fros. 2021. Insect-specific flavivirus replication in mammalian cells is inhibited by physiological temperature and the zinc-finger antiviral protein. *Viruses*, 13(4), 573.

Cook, S., G. Moureau, R. E. Harbach, L. Mukwaya, K. Goodger, F. Ssenfuka & X. de Lamballerie. 2009. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex* flavivirus (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J. Gen. Virol.* 90(Pt 11), 2669.

Cotmore, S. F., M. Agbandje-McKenna, J. A. Chiorini, D. V. Mukha, D. J. Pintel, J. Qiu & A. J. Davison. 2014. The family parvoviridae. *Arch. Virol.* 159(5), 1239-1247.

Cotmore, S. F., M. Agbandje-McKenna, M. Canuti, J. A. Chiorini, A. M. Eis-Hubinger, J. Hughes & P. Tijssen. 2019. ICTV virus taxonomy profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.* 100(3), 367-368.

Crabtree, M. B., P. T. Nga & B. R. Miller. 2009. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Arch. Virol.* 154, 857-860.

Crabtree, M. B., R. C. Sang, V. Stollar, L. M. Dunster & B. R. Miller. 2003. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Arch. Virol.* 148(6).

Datta, S., R. Gopalakrishnan, S. Chatterjee, & V. Veer. 2015. Phylogenetic characterization of a novel insect-specific flavivirus detected in a *Culex* pool, collected from Assam, India. *Intervirology*, 58(3), 149-154.

de Almeida, J. P., E. R. Aguiar, J. N. Armache, R. P. Olmo & J. T. Marques. 2021. The virome of vector mosquitoes. *Curr Opin Virol.* 49, 7-12.

- Duggal, N. K., K. E. Langwig, G. D. Ebel & A. C. Brault. 2019.** On the fly: interactions between birds, mosquitoes, and environment that have molded West Nile virus genomic structure over two decades. *J. Med. Entomol.*, 56(6), 1467-1474.
- Erasmus, J. H., & S. C. Weaver. 2017.** Biotechnological applications of an insect-specific alphavirus. *DNA and Cell Biology*, 36(12), 1045-1049.
- Erasmus, J. H., A. J. Auguste, J. T. Kaelber, H. Luo, S. L. Rossi, K. Fenton & S. C. Weaver. 2017.** A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nature medicine*, 23(2), 192-199.
- Fragkoudis, R., Attarzadeh-Yazdi, G., Nash, A. A., Fazakerley, J. K., & Kohl, A. 2009.** Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J. Gen. Virol.* 90(9), 2061-2072.
- Franzke, K., M. Leggewie, V. B. Sreenu, S. Jansen, A. Heitmann, S. R. Welch & E. Schnettler. 2018.** Detection, infection dynamics and small RNA response against Culex Y virus in mosquito-derived cells. *J. Gen. Virol.* 99(12), 1739-1745.
- Gao, G., X. Guo & S. P. Goff. 2002.** Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCH-type zinc finger protein. *Science*, 297(5587), 1703-1706.
- Gao, H., C. Cui, L. Wang, M. Jacobs-Lorena & S. Wang. 2020.** Mosquito microbiota and implications for disease control. *Trends Parasitol.* 36(2), 98-111.
- Gómez, M., D. Martinez, M. Muñoz & J. D. Ramírez, 2022.** Aedes aegypti and Ae. albopictus microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission?. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1-13.
- Griffin, D. E. 2007.** Alphaviruses. In: KNIPE, D. M. H., P.M. (Ed.). *Fields Virology*. v.2, p.2502-2601.
- Harrison, J. J., J. Hobson-Peters, A. M. Colmant, J. Koh, N. D. Newton, D. Warrilow & R. A. Hall. 2020.** Antigenic characterization of new lineage II insect-specific flaviviruses in Australian mosquitoes and identification of host restriction factors. *Msphere*, 5(3), e00095-20.
- He, X., Yin, Q., L. Zhou, L. Meng, W. Hu, F. Li & H. Wang. 2021.** Metagenomic sequencing reveals viral abundance and diversity in mosquitoes from the Shaanxi-Gansu-Ningxia region, China. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 15(4), e0009381.
- Heinig-Hartberger, M., F. Hellhammer, D. D. Zöller, S. Dornbusch, S. Bergmann, K. Vocadlova & S. C. Becker. 2023.** Culex Y Virus: A Native Virus of Culex Species Characterized In Vivo. *Viruses*, 15(1), 235.

- Hermanns, K., F. Zirkel, A. Kopp, M. Marklewitz, I. B. Rwego, A. Estrada & S. Junglen. 2017.** Discovery of a novel alphavirus related to Eilat virus. *J. Gen. Virol.* 98(1), 43-49.
- Hermanns, K., M. Marklewitz, F. Zirkel, G. J. Overheul, R. A. Page, J. R. Loaiza & S. Junglen. 2020.** Agua Salud alphavirus defines a novel lineage of insect-specific alphaviruses discovered in the New World. *J. Gen. Virol.* 101(1), 96.
- Hobson-Peters, J., D. Warrilow, B. J. McLean, D. Watterson, A. M. Colmant, A. F. van den Hurk & R. A. Hall. 2016.** Discovery and characterisation of a new insect-specific bunyavirus from *Culex* mosquitoes captured in northern Australia. *Virology*, 489, 269-281.
- Hobson-Peters, J., J. J. Harrison, D. Watterson, J. E. Hazlewood, L. J. Vet, N. D. Newton & R. A. Hall. 2019.** A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus. *Sci. Transl. Med.* 11(522), eaax7888.
- Hoshino, K., A. Takahashi-Nakaguchi, H. Isawa, T. Sasaki, Y. Higa, S. Kasai & M. Kobayashi. 2012.** Entomological surveillance for flaviviruses at migratory bird stopover sites in Hokkaido, Japan, and a new insect flavivirus detected in *Aedes galloisi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 49(1), 175-182.
- Igarashi, A., K. A. Harrap, J. Casals & V. Stollar. 1976.** Morphological, biochemical, and serological studies on a viral agent (CFA) which replicates in and causes fusion of *Aedes albopictus* (Singh) cells. *Virology*, 74(1), 174-187.
- Junglen, S., & C. Drosten. 2013.** Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. *Curr. Opin. Microbiol.* 16(4), 507-513.
- Keene, K. M., B. D. Foy, I. Sanchez-Vargas, B. J. Beaty, C. D. Blair & K. E. Olson. 2004.** RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(49), 17240-17245.
- Kenney, J. L., O. D. Solberg, S. A. Langevin & A. C. Brault. 2014.** Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important flaviviruses. *J. Gen. Virol.* 95(Pt 12), 2796–2808.
- King, A. M., M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz. 2012.** Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 9.
- Kittayapong, P., K. J. Baisley & S. L. O'Neill. 2001.** A mosquito densovirus infecting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(4), 612-7.
- Lambrechts, L., & T. W. Scott. 2009.** Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1660), 1369-1378.

- Lara Pinto, A. Z. D., M. Santos de Carvalho, F. L. de Melo, A. L. M. Ribeiro, B. Morais Ribeiro & R. Dezengrini Shlessarenko. 2017.** Novel viruses in salivary glands of mosquitoes from sylvatic Cerrado, Midwestern Brazil. *PLoS One*, 12(11), e0187429.
- Lee, W.S., J. A. Webster, E.T. Madzokere, E.B. Stephenson & L. J. Herrero. 2019.** Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-12.
- Lefkowitz, E. J., D. M. Dempsey, R. C. Hendrickson, R. J. Orton, S. G. Siddell & D. B. Smith. 2018.** Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic acids research*, 46(D1), D708-D717.
- Ma, E., Y. Zhu, Z. Liu, T. Wei, P. Wang & G. Cheng. 2021.** Interaction of viruses with the insect intestine. *Annu. Rev. Virol.* 8, 115-131.
- Marklewitz, M., F. Zirkel, A. Kurth, C. Drosten & S. Junglen. 2015.** Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggests arthropod origin of a pathogenic RNA virus family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(24), 7536-7541.
- Marklewitz, M., F. Zirkel, I. B. Rwego, H. Heidemann, P. Trippner, A. Kurth & S. Junglen. 2013.** Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. *J. Virol.* 87(23), 12850-12865.
- Morais, P., J. Pinto, C. P. Jorge, A. D. Troco, F. Fortes, C. A. Sousa & R. Parreira. 2020.** Insect-specific flaviviruses and densoviruses, suggested to have been transmitted vertically, found in mosquitoes collected in Angola: Genome detection and phylogenetic characterization of viral sequences. *Infect. Genet. Evol.* 80, 104191.
- Morais, P., N. S. Trovão, A. B. Abecasis & R. Parreira. 2022.** Insect-specific viruses in the Parvoviridae family: Genetic lineage characterization and spatiotemporal dynamics of the recently established Brevihamaparvovirus genus. *Virus Res.* 313, 198728.
- Moonen, J. P., M. Schinkel, T. van der Most, P. Miesen & R. P. van Rij. 2023.** Composition and global distribution of the mosquito virome-A comprehensive database of insect-specific viruses. *One Health*, 100490.
- Moureaux, G., L. Ninove, A. Izri, S. Cook, X. D. Lamballerie, & R. N. Charrel. 2010.** Flavivirus RNA in phlebotomine sandflies. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10(2), 195-197.
- Nasar, F., G. Palacios, R. V. Gorchakov, H. Guzman, A. P. T. Da Rosa, N. Savji & S. C. Weaver. 2012.** Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(36), 14622-14627.
- Nasar, F., R. V. Gorchakov, R. B. Tesh & S. C. Weaver. 2015.** Eilat virus host range restriction is present at multiple levels of the virus life cycle. *J. Virol.* 89(2), 1404-1418.

- Nouri, S., E. E. Matsumura, Y. W. Kuo & B. W. Falk 2018.** Insect-specific viruses: from discovery to potential translational applications. *Curr. Opin. Virol.* 33, 33-41.
- Ochieng, C., J. Lutomiah, A. Makio, H. Koka, E. Chepkorir, S. Yalwala & R. Sang. 2013.** Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007–2012. *Virol. J.* 10(1), 1-10.
- Olmo, R. P., Y. M. H. Tadjro, E. R. G. R. Aguiar, J. P. P. De Almeida, F. V. Ferreira, J. N. Armache, I. J. S. De Faria, A. G. A. Ferreira, S. C. G. Amadou, A. T. S. Silva, K. P. R. De Souza, A. P. P. Vilela, A. Babarit, C. H. Tan, M. Diallo, A. Gaye, C. Paupy, J. Obame-Nkoghe, T. M. Visser & J. T. Marques. 2023.** Mosquito vector competence for dengue is modulated by insect-specific viruses. *Nat. Microbiol.* 8(1), 135–149.
- Osório, H. C., L. Zé-Zé, F. Amaro & M. J. Alves. 2014.** Mosquito surveillance for prevention and control of emerging mosquito-borne diseases in Portugal—2008–2014. *Int J Environ Res Public Health.* 11(11), 11583-11596.
- Pabbaraju, K., K. C. Ho, S. Wong, J. D. Fox, B. Kaplen, S. Tyler & P. A. Tilley. 2014.** Surveillance of mosquito-borne viruses in Alberta using reverse transcription polymerase chain reaction with generic primers. *J. Med. Entomol.* 46(3), 640-648.
- Papa, A., E. Papadopoulou, S. Kalaitzopoulou, K. Tsioka & S. Mourelatos. 2014.** Detection of West Nile virus and insect-specific flavivirus RNA in *Culex* mosquitoes, central Macedonia, Greece. *Trans. R. Soc. Trop.* 108(9), 555-559.
- Paraskevopoulou, S., S. Käfer, F. Zirkel, A. Donath, M. Petersen, S. Liu & S. Junglen. 2021.** Viromics of extant insect orders unveil the evolution of the flavi-like superfamily. *Virus Evol.* 7(1), veab030.
- Parry, R., & S. Asgari. 2019.** Discovery of novel crustacean and cephalopod flaviviruses: insights into the evolution and circulation of flaviviruses between marine invertebrate and vertebrate hosts. *J. Virol.* 93(14), e00432-19.
- Patterson, E. I., J. Villinger, J. N. Muthoni, L. Dobel-Ober, & G. L. Hughes. 2020.** Exploiting insect-specific viruses as a novel strategy to control vector-borne disease. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 39, 50-56.
- Pénzes, J. J., M. Söderlund-Venermo, M. Canuti, A. M. Eis-Hübing, J. Hughes, S. F. Cotmore & B. Harrach. 2020.** Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch. Virol.* 165(9), 2133-2146.
- Porter, A. F., J. H. O. Pettersson, W. S. Chang, E. Harvey, K. Rose, M. Shi, & Holmes, E. C. 2020.** Novel hepaciviruses and pegivirus-like viruses in native Australian wildlife and non-human primates. *Virus Evol.* 6(2), veaa064.

- Ren, X., E. Hoiczyk & J. L. Rasgon. 2008.** Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS pathogens*, 4(8), e1000135.
- Rosen, L. 1988.** Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39(1), 123-126.
- Roundy, C. M., S. R. Azar, S. L. Rossi, S. C. Weaver & N. Vasilakis. 2017.** Insect-specific viruses: a historical overview and recent developments. *Adv. Virus Res.* 98, 119-146.
- Ribeiro, G. D. O., F. J. C. Monteiro, M. O. D. S. Rego, E. S. D. A. Ribeiro, D. F. D. Castro, M. M., Caseiro & É. Leal. 2019.** Detection of RNA-dependent RNA polymerase of Hubei reo-like virus 7 by next-generation sequencing in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from Brazil. *Viruses*, 11(2), 147.
- Sadeghi, M., E. Altan, X. Deng, C. M. Barker, Y. Fang, L. L. Coffey & E. Delwart. 2018.** Virome of > 12 thousand *Culex* mosquitoes from throughout California. *Virology*, 523, 74-88.
- Saiyasombat, R., B. G. Bolling, A. C. Brault, L. C. Bartholomay & B. J. Blitvich. 2011.** Evidence of efficient transovarial transmission of *Culex* flavivirus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 48(5), 1031-1038.
- Sánchez-Seco, M. P., A. Vázquez, X. Collao, L. Hernández, C. Aranda, S. Ruiz & A. Tenorio 2010.** Surveillance of arboviruses in Spanish wetlands: detection of new flavi- and phleboviruses. *Vector-Borne and Zoonotic Dis.* 10(2), 203-206.
- Sánchez-Vargas, I., J. C. Scott, B. K. Poole-Smith, A. W. Franz, V. Barbosa-Solomieu, J. Wilusz & C. D. Blair. 2009.** Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS pathogens*, 5(2), e1000299.
- Schultz, M. J., H. M. Frydman, & J. H. Connor. 2018.** Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in *Aedes* mosquito cells. *Virology*, 518, 406-413.
- Shi, M., X. D. Lin, N. Vasilakis, J. H. Tian, C. X. Li, L. J. Chen & Y. Z. Zhang. 2016.** Divergent viruses discovered in arthropods and vertebrates revise the evolutionary history of the Flaviviridae and related viruses. *J. Virol.* 90(2), 659-669.
- Shi, M., X. D. Lin, X. Chen, J. H. Tian, L. J. Chen, K. Li & Y. Z. Zhang. 2018.** The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature*, 556(7700), 197-202.
- Silva, M., P. Morais, C. Maia, C. B. de Sousa, A. P. G. de Almeida & R. Parreira. 2019.** A diverse assemblage of RNA and DNA viruses found in mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Res.* 274, 197769.
- Stollar, V. & V. L. Thomas, 1975.** An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, 64(2), 367-377.

- Torii, S., Y. Orba, B. M. Hang'ombe, A. S. Mweene, Y. Wada, P. D. Anindita & H. Sawa. 2018.** Discovery of Mwinilunga alphavirus: A novel alphavirus in *Culex* mosquitoes in Zambia. *Virus Res.* 250, 31-36.
- Vasilakis, N. & R. B. Tesh. 2015.** Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Curr Opin Virol.* 15, 69-74.
- Vázquez, A., M. P. Sánchez-Seco, G. Palacios, F. Molero, N. Reyes, S. Ruiz & A. Tenorio. 2012.** Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12(3), 223-229.
- Vet, L. J., Y. X. Setoh, A. A. Amarilla, G. Habarugira, W. W. Suen, N. D. Newton & H. Bielefeldt-Ohmann. 2020.** Protective efficacy of a chimeric insect-specific flavivirus vaccine against West Nile virus. *Vaccines*, 8(2), 258.
- Westaway, E. G., M. A. Brinton, Gaidamovich SYa, M. C., Horzinek, A. Igarashi, L. Kääriäinen, D. K. Lvov, J. S. Porterfield, P. K. Russell & D. W. Trent. 1985.** *Flaviviridae*. *Intervirology*, 24(4), 183–192.
- WHO. Vaccines and Immunization: What is Vaccination?** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/vaccines-and-immunization-what-is-vaccination> (acesso em 15 de janeiro de 2023).
- Ye, G., Y. Wang, X. Liu, Q. Dong, Q. Cai, Z. Yuan & H. Xia. 2020.** Transmission competence of a new mesonivirus, Yichang virus, in mosquitoes and its interference with representative flaviviruses. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 14(11), e0008920.
- Zanotto, P. M. D. A. & L. C. D. C. Leite. 2018.** The challenges imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Front. Immunol.* 9, 1964.
- Круглов, И. В. 2019.** *Flaviviridae—addition to the family. Проблемы здоровья и экологии*, (4), 4-10.

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA ANÁLISES DE METAVIROMA A
PARTIR DE AMOSTRAS DE MOSQUITOS E CULTURAS CELULARES*

EVALDO J. F. FILHO^{1,2}, LAÍS C. MACHADO², GABRIEL L. WALLAU² & MARCELO H. S. PAIVA^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Recife, PE, Brasil

²Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, PE, Brasil

* Farias Filho, E.J., L.C. Machado, G.L. Wallau, & M.H.S. Paiva. Establishment of a protocol for metavirome analysis from mosquitoes and cell cultures samples. To be submitted

RESUMO – Vírus específicos de insetos (ISVs) é uma classificação restrita a vírus que infectam apenas artrópodes, distintos dos arbovírus, que infectam também hospedeiros vertebrados, causando infecções em vários níveis, como o vírus da dengue, responsável por um grande número de mortes em humanos. A vigilância de arboviroses é uma necessidade mundial de saúde pública e impõe o uso de ferramentas altamente eficientes para detecção e caracterização desses vírus. Os avanços no uso da metagenômica, nesse campo, possibilita a identificação de novos vírus, incluindo os ISVs. Em culicídeos, os ISVs apresentam diversas respostas quando em coinfecção com arbovírus, seja aumentando ou reduzindo os níveis de infecção destes agentes. O uso de culicídeos e células C6/36 é comum em estudos de arbovirologia, mas pouco se explora o viroma integrado a estas linhagens e seus efeitos. Neste estudo foi testado um protocolo de PCR convencional, utilizando *primers* degenerados para genes conservados em *Flavivirus* e *Alphavirus*, a fim de identificar ISVs destes gêneros. No respectivo trabalho também foi estabelecido um protocolo de metaviroma por *Next-Generation Sequencing* (NGS), para análise do viroma de *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e células C6/36 de laboratório. Como resultados, foram sequenciados os genomas total e parcial de três ISVs: Wutai mosquito phasivirus, Culex bunyavirus e Culex densovirus em amostras de *Cx. quinquefasciatus* e células C6/36. Estes dados demonstram a eficiência de um protocolo de metaviroma para detecção de ISVs e reforçam a importância de realizar este tipo de prospecção em mosquitos e células utilizados em estudos de arbovirologia.

PALAVRAS-CHAVE: NGS, mosquitos vetores, ISVs, Culex bunyavírus, Wutai mosquito phasivirus e Culex densovirus.

ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR METAVIROME ANALYSIS FROM MOSQUITOES AND CELL CULTURES SAMPLES

ABSTRACT – Insect-specific viruses (ISVs) is a classification restricted to viruses that infect only arthropods, distinct from arboviruses, which also infect vertebrate hosts, causing infections at various levels, such as the DENV, responsible for a large number of deaths in humans. Surveillance of arboviruses is a global public health need and requires the use of highly efficient tools for detection and characterization of these viruses. Advances in the use of metagenomic analysis enable the identification of new viruses, including ISVs, in the field of entomology. In the Culicidae family, ISVs induce different responses when co-infected with arboviruses: increasing or reducing the levels of infection of these agents. The use of mosquitoes and C6/36 cells is common in arbovirology studies, but little is explored about the virome integrated into these lineages, and their effects. In this study, a conventional PCR protocol was tested, using degenerate *primers* referring to conserved genes in *Flavivirus* and *Alphavirus*, in order to identify ISVs of the respective genera. A metavirome protocol by Next-Generation Sequencing (NGS) was established for laboratory strains of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* and C6/36 cells. The total and partial genomes of three already classified ISVs were obtained: Wutai mosquito phasivirus, Culex bunyavirus and Culex densovirus in samples of Cx. quinquefasciatus and C6/36 cells. These results reveal the efficiency of a metavirome protocol for detecting ISVs in mosquitoes and cell lines and reinforce the importance of performing this prospecting in mosquitoes and cells used in arbovirology studies.

KEY WORDS: NGS, vector mosquitoes, ISVs, Culex bunyavirus, Wutai mosquito phasivirus and Culex densovirus.

Introdução

Vírus específicos de insetos (ISVs) é uma classificação referente aos vírus que apresentam restrição no ciclo de replicação, sendo estes dependentes do hospedeiro inseto/invertebrado (Bolling *et al.* 2015). Estes ISVs diferem dos arbovírus, que infectam insetos (vetores) e humanos, pois não causam doenças e não impactam a saúde pública global (Achee *et al.* 2019). Os ISVs estão agrupados em diversas famílias que também incluem arbovírus com potencial patogênico para hospedeiros humanos, como Flaviviridae e Togaviridae, que incluem os vírus da dengue e chikungunya, respectivamente (Öhlund, Lundén & Blomström 2019). O tropismo estrito torna os ISVs incapazes de se replicar em células de vertebrados, tal restrição faz com que este grupo não possua um ciclo viral comum de mantimento na natureza, diferindo dos arbovírus, que se mantém principalmente pela transmissão vetor-hospedeiro na hematofagia (Weaver & Barrett 2004). Torna-se claro que o principal meio de manutenção dos ISVs é por transmissão vertical, por via transovariana de mosquitos fêmeas infectadas para sua prole. Isso é corroborado por estudos de laboratório e de campo, onde os descendentes de mosquitos fêmeas testaram positivo para ISVs, incluindo formas imaturas, como ovos e larvas ainda sem contato com alimentação (Saiyasombat *et al.* 2011, Bolling *et al.* 2011, Auguste *et al.* 2015, Coatsworth *et al.* 2021).

Uma série de evidências têm revelado os mecanismos fisiológicos nas infecções por ISVs e vários experimentos demonstraram que alguns destes ISVs podem modular a replicação de certos arbovírus em linhagens de células e mosquitos (Gao *et al.* 2020, Cansado-Utrilla *et al.* 2021). Um estudo desenvolvido por Olomo *et al.* (2023), mostra que mosquitos de campo da espécie *Ae. aegypti* quando infectados pelos vírus: Phasi Charoen-like (PCLV) e Humaita Tubiacanga vírus (HTV) tem um aumento de 200% nas chances de estarem também infectados por DENV. O estudo também mostra que a presença desses vírus aumenta a capacidade de transmitir os arbovírus DENV e ZIKV

para o hospedeiro vertebrado, utilizando camundongos como modelo de infecção (Olomo *et al.* 2023).

Em estudos de arbovirologia é comum o uso de células C6/36 (uma linhagem de células de *Ae. albopictus*) devido ao número limitado de linhagens de células de insetos testadas em estudos de interações vírus/vetor. (Brackney *et al.* 2010). Em um estudo realizado por Schultz *et al.* (2018), foi revelado que o vírus Phasi Charoen-like (PCLV) estava presente em linhagens de células de *Ae. aegypti* infectadas com ZIKV. O mesmo ISV não infectava linhagens de células de *Ae. albopictus*. Em estudos anteriores do grupo, foi observado que o vírus Zika não infectava as linhagens de células *Ae. aegypti*, sugerindo que o PCLV interfere no crescimento do ZIKV nesta linhagem. Esses dados asseguram que a infecção por ISVs em linhagens de células pode modular os efeitos de infecção e/ou crescimento de arbovírus (Schultz *et al.* 2018).

Uma série de estudos de metaviroma foram publicados no meio científico nos últimos anos, com uma ampla caracterização de novos agentes, resultando em um crescimento nas entradas de novos genomas virais associados a insetos no GenBank (de Almeida *et al.* 2021). Estas descobertas são possíveis devido a sensibilidade e alto rendimento das técnicas empregadas no sequenciamento em larga escala (He *et al.* 2021). Em um estudo conduzido em 2022 na região de Medellín, na Colômbia, foi identificado pelo menos 17 classificações virais em *Ae. aegypti*, sendo 16 destes, vírus específicos de insetos. Em amostras de *Ae. albopictus*, foram detectados 11 ISVs. Estas evidências mostram que a composição do viroma é específica da espécie (Calle-Tobón *et al.* 2022). Ferramentas de alto rendimento apresentam custo elevado para caracterização do viroma, mas ainda assim devem ser aprimoradas para estes estudos, considerando que muitos desses ISVs não causam efeitos citopáticos visíveis em células e mosquitos, através da metagenômica é possível a identificação dos mesmos (Fujita *et al.* 2018).

Tendo em vista as hipóteses de que os ISVs são mantidos em populações de mosquitos por transmissão vertical, e que linhagens de células C6/36 também agregam ISVs, impõem-se as necessidades de identificação e caracterização dos ISVs que compõem linhagens de células e mosquitos de laboratório, a fim de trazer respostas ainda mais claras em estudos de arbovirologia utilizando esses organismos. Logo, o respectivo trabalho objetivou o estabelecimento de um protocolo de metaviroma eficiente para detecção de ISVs e arbovírus, bem como a caracterização do viroma de culicídeos e linhagens de células C6/36 estabelecidos em laboratório, além de realizar uma análise filogenética com os respectivos achados.

Material e Métodos

O respectivo trabalho foi conduzido em diferentes etapas utilizando mosquitos advindos de linhagens mantidas em laboratório (RecLab e CqSLab), mosquitos coletados em campo e linhagens de células C6/36 (*Ae. albopictus*). Os mosquitos de campo foram coletados na Região Metropolitana do Recife-PE, em quatro regiões: Olinda, Jaboatão dos Guararapes, Recife e Paulista, no ano de 2017.

Mosquitos Advindos de linhagens de Laboratório. As linhagens de *Ae. aegypti* (RecLab) e *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab) foram estabelecidas no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ-PE nos anos de 1996 e 2011, respectivamente. São insetos advindos dos municípios de Ipojuca, Olinda e Jaboatão (Região Metropolitana do Recife). Estas são mantidas no insetário do Departamento de Entomologia, IAM, sob condições de temperatura específicas ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($70 \pm 20\%$) e fotoperíodo 14:10 h (C/E). As formas imaturas das duas espécies são mantidas em recipientes plásticos retangulares (cubas), contendo água potável e são alimentadas com ração para gatos (Friskies®), administrada a cada dois dias. Os adultos são mantidos em gaiolas

com dimensões de 40 x 30 x 30 cm, feitas em tela e alumínio, alimentados diariamente em solução estéril de sacarose a 10%. A alimentação sanguínea para fêmeas das duas espécies é ofertada semanalmente, durante 45 a 60 minutos, utilizando sangue de coelho desfibrinado (Costa 2021).

Coletas da Amostragem de Campo. As amostras de campo foram coletadas no ano de 2017 pelo grupo de estudos do departamento de Entomologia do IAM, nas regiões de Olinda, Jaboatão dos Guararapes, Recife e Paulista (Região Metropolitana do Recife, PE, Brasil). Estas coletas foram realizadas através de aspiradores costais elétricos, em seguida os mosquitos coletados foram triados por espécie, sexo e estado alimentar. Para este trabalho foram utilizadas fêmeas da espécie *Cx. quinquefasciatus*, sem ingurgitação visível, armazenados a -80 °C até o processamento.

Cultura de Células C6/36. As células de *Aedes albopictus* utilizadas neste trabalho foram empregadas em estudos de arbovirologia no Departamento de Entomologia do IAM, com isolamento viral para DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Também foram utilizadas células sem infecção.

DETECÇÃO DE ISVs POR PCR CONVENCIONAL

Nesta etapa foi realizada uma metodologia para detecção de vírus por nested-RT-PCR utilizando *primers* degenerados referentes a sequências gênicas conservadas em grupos virais [NS5 para Flavivirus, Vásquez *et al.* (2012) e nsP4 para Alphavirus, Sánchez-Seco *et al.* (2001)].

Preparação de Inóculo para Extração do RNA. Foram processados 250 mosquitos fêmeas da linhagem RecLab, e 150 fêmeas da linhagem CqSLab. Os mosquitos foram divididos em pools de 100 e 50 indivíduos (tabela 1), estes foram então acondicionados em microtubos de 1,7 mL, foi

incluído 500 µl de H₂O (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water), em seguida os pools foram macerados utilizando pistilos autoclavados.

Extração do RNA total, Tratamento por Nuclease e Quantificação. Foi feita a extração do RNA total por TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo o protocolo padrão, utilizou-se 100 µl de sobrenadante do homogenato pós centrifuga. Foi feito o tratamento das amostras de RNA utilizando TURBO™ DNase, para remoção de contaminantes de DNA, nas seguintes condições: para cada tubo contendo 30 µl de RNA foi adicionado 1 µl de DNase TURBO e 3 µl de tampão 10x e incubado a 37°C por 30 minutos, ao retirar do banho maria as amostras foram colocadas no gelo, seguido de adição de 4,5 µl de EDTA e última incubação a 75°C por 10 minutos. Por fim, os tubos contendo as amostras foram incluídos no gelo seguido do armazenamento a -80°C. Por fim o RNA total foi quantificado, utilizando NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), os resultados foram analisados para os picos de 260 /280, e quantificação do ácido nucleico em ng.

PCR – One Step Synthesis. O RNA obtido na extração passou por uma diluição seriada (10, 100, 1.000, 10.000x), utilizou-se 3 µl de cada amostra e 27 µl de H₂O nesta etapa. Foram feitas duas reações para amplificação de cada gene específico utilizando os *primers* degenerados conforme identificados na tabela 2. Para amplificação do gene nsP4 (*Alphavirus*), foi feito um mix contendo: 7,36 µl de água; 25 µl de PCR Master Mix (Promega); 2,0 µl do Primer nsP4+1 (10U/µl); 2,0 µl do Primer nsP4-1 (10U/µl); 0,5 µl de DTT (1M); 8,0 µl de RNase OUT (1U/µl); 0,14 µl de AMV (15U/µl); 5,0 µl do RNA extraído na etapa anterior, totalizando 50 µl. As amostras foram então acondicionadas em termociclador nas seguintes condições: 48°C por 45 minutos; 94°C por 2 min para construção do cDNA, seguido de 40 ciclos nas condições de: 94°C por 30 segundos, 52°C por 1 min. 68°C por 30 s. e 68°C por 5 min. para amplificação dos fragmentos. Para a nested-PCR foi

feito um mix contendo: 13,5 µl de H₂O; 25,00 µl de PCR Master Mix (Promega); 4,0 µl do Primer nsP4+2 (10U/µl); 4,0 µl do Primer nsP4-2 (10U/µl); 2,5 µl de MgCl₂ e 1,0 µl do RNA produto da primeira reação, foi então submetido as seguintes condições: 94°C por 2 minutos para desnaturação seguido de 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos; 52°C por 1 min; 72°C por 15s e 72°C por 5 min. Para amplificação do gene NS5 de *Flavivirus*, na primeira reação foi feito um mix contendo: 8,36 µl de H₂O; 25,00 µl de PCR Master Mix (Promega); 3,0 µl do Primer NS5F1 (10U/µl); 3,0 µl do Primer NS5R1 (10U/µl); 0,5 µl do DTT (1M); 8,0 µl de RNase OUT (1U/µl); 0,14 µl de AMV (15U/µl); 2,0 µl de RNA extraído, nas condições de 50°C por 45 min; 95°C por 15 min. para a construção do cDNA, seguido de 40 ciclos de: 94°C por 1 min 50°C por 4 min; 72°C por 1 min e 72°C por 10 min. Na nested-PCR do segundo par de *primers* (NS5) foi feito um mix contendo 10,5 µl de H₂O; 25,00 µl de PCR Master Mix (Promega); 6,0 µl do Primer NS5F2 (10U/µl); 6,0 µl do Primer NS5R2 (10U/µl); 1,5 µl de MgCl₂; 1,0 µl do cDNA produto da primeira reação nas seguintes condições: 94°C por 5 min; 40 ciclos: 94°C por 1 min; 50°C por 3 min; 72°C por 1 min; 72°C por 10 min.

Eletroforese. As análises dos produtos de amplificação por PCR foram conduzidas para visualização por eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio. Foi utilizado um marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™), para comparação do tamanho dos fragmentos obtidos.

METAVIROMA

Estabelecimento de um Protocolo para Identificação de ISVs

Para o sequenciamento do viroma de mosquitos e linhagens de células de laboratório foram conduzidos dois ensaios com diferentes amostras (tabela 3 e 4).

Maceração de Amostras e Tratamento Prévio com DNase. Para a preparação das amostras, os mosquitos foram divididos em pools de 50 fêmeas ou 300 µl do sobrenadante de células C6/36. Os mosquitos foram suspensos em 600 µl de PBS e macerados com pistilo elétrico por 30 segundos (6 vezes x 5 segundos), o homogenato resultante foi acondicionado em gelo seco por 5 minutos e depois descongelado em temperatura ambiente, seguindo dois ciclos de congelamento e descongelamento, processo essencial para lise celular inicial. Foi feita uma etapa de centrifuga com o homogenato a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante do homogenato e o sobrenadante das amostras de células contendo RNA viral foi então coletado com uma seringa de 1mL estéril e filtrado em filtro de seringa estéril de 0,45 µm para remoção dos detritos celulares. Para prosseguir com o tratamento de nuclease, foi transferido 400 µl do filtrado para um novo tubo eppendorf de 1,5 µl, onde foram adicionados 14 µl de TURBO™ DNase (Ambion™) e 40 µl de tampão 10x Turbo, o filtrado foi então incubado a 37 °C por 10 minutos, seguido da adição de EDTA e nova incubação a 65°C por 10 minutos.

Isolamento do RNA Viral. Para o isolamento do RNA viral, foi utilizado o MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit, seguindo o protocolo padrão: Para lise celular, foi preparada a solução de lise, contendo 400 µl de Lysis/Binding Soln, concentrate, 2 µl de Carrier RNA e 400 µl de Isopropanol 100%. Para cada 400 µl de amostra foram adicionados 802 µl de solução de lise, seguido de homogeneização em vórtex por 30 segundos. Após a lise celular e liberação do ácido nucleico, foi incluído ao homogenato a solução Bead mix, contendo 10 µl de RNA Binding Beads e 10 µl de Lysis/Binding Enhancer para cada amostra, cada amostra foi agitada em velocidade moderada por quatro minutos para lise total dos respectivos vírus e ligação do RNA às esferas (beads) magnéticas. Após esse processo as amostras foram brevemente centrifugadas e movidas para uma estante magnética (MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands) para captura das beads magnéticas contendo o RNA viral. O sobrenadante foi então removido, com os tubos de processamento ainda nas estantes, e foram

seguidos para as etapas de lavagem: Dois ciclos de lavagem com Isopropanol (Solução de Lavagem 1, referente ao kit) e dois ciclos de lavagem com Etanol (Solução de Lavagem 2, referente ao kit) para remoção total das impurezas e melhor isolamento do RNA viral. Por fim foi feita a secagem do pellet seguido da adição de 30 µl do tampão de eluição e última captura das esferas para o isolamento do RNA viral. O RNA extraído foi então armazenado em deep freezer a -80°C até o uso.

Construção do cDNA, Síntese da Fita Complementar com Klenow e Quantificação. Para construção do cDNA, foi utilizado 1 µl da enzima Super Script III Reverse Transcriptase, 1µl de *primers* - Random hexamers (50ng/ul), 1µl de dNTP (10mM), 12 µl do RNA viral extraído, 1 µl de RNase Out, 4 µl do tampão da enzima Super Script III, 1 µl de DTT, o RNA foi então submetido as seguintes temperaturas: 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 min. e 70°C por 15 min. Para síntese complementar dos vírus de dupla fita ou vírus de DNA, utilizou-se 1 µl da DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (5U/ul), 3µl de random hexamers (50ng/ul), 2µl do tampão klenow, 2µl de dNTP (10mM) e 15µl de cDNA produto da etapa anterior em condição de 37°C por 60 minutos. Foi feita a quantificação do cDNA e produto final do tratamento com Klenow, utilizado um quantificador Qubit™ (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante, adaptado para 3 µl de amostra.

Preparação da Biblioteca. Na preparação da biblioteca para sequenciamento foi utilizado o kit Illumina® DNA Prep, seguindo as etapas de tagmentação do DNA, onde foi utilizado 25 µl da amostra do cDNA puro e 5 µl de H₂O Ultra Pura, foram adicionados os 30 µl resultantes de cada amostra em uma placa de PCR de 96 poços, em seguida foi incluído 20 µl do master mix (contendo BLT e TB1: Bead-Linked Transposomes e Tagmentation Buffer 1, respectivamente), foi feita a ressuspensão, seguido de termociclador a 55 °C por 15 minutos. Após a tagmentação foi feita a lavagem e remoção de impurezas adicionando 10 µl do TSE (Tagment Stop Buffer) com incubação

a 37 °C por 15 minutos. Em seguida a placa foi acoplada em uma estante magnética para captura das beads. O sobrenadante foi então removido e adicionado 100 µl do TWB (Tagment Wash Buffer) para lavagem. Após a ressuspensão com TWB as beads foram novamente capturadas e o sobrenadante foi removido e descartado. Foi incluído um mix de 40 µl de EPM (Enhanced PCR Mix) e H₂O ultra pura em cada amostra. Foi feita a indexação utilizando IDT® (Illumina Nextera), cada amostra recebeu a respectiva identificação e foi seguido para a etapa de PCR nas seguintes condições: 68 °C por 3 minutos, 98 °C por 3 minutos, 12 ciclos de 98 °C por 45 segundos, 62 °C por 30 segundos e 68 °C por 2 minutos, com temperatura final de 68 °C por 1 minuto. Foi realizada a última limpeza da biblioteca, 45 µl do sobrenadante da PCR foi transferido para novos poços, em seguida foi adicionado 40 µl de SPB (Sample Purification Beads), incubado em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foi feita a captura das beads em estante magnética e remoção do sobrenadante, na última lavagem foi adicionado 200 µl de etanol a 80%, incubado novamente por 30 segundos, seguido da remoção do sobrenadante e ressuspensão em 32 µl de RSB (Resuspension Buffer), onde foi incubado por 2 minutos e novamente acoplado a estante magnética para coleta do material da biblioteca. O volume final da eluição foi de 30 µl por amostra.

Quantificação da Biblioteca, Cálculo de Normalização e DNA Seq. Para a quantificação da biblioteca construída na etapa anterior foi utilizado o kit ProNex® NGS Library Quant Kit (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A PCR foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de: 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 45 segundos. Foram avaliadas as curvas padrão na faixa de -3,10 a -3,70. Foi conduzida também uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio, para visualização e determinação dos tamanhos dos fragmentos da biblioteca. Para o cálculo de normalização das amostras considerou-se uma média de 350 pb, e o valor de 17 pM. Por fim utilizou-se por fator de diluição 10.000x para

a biblioteca 1 e 1.000x para a biblioteca 2. Foi utilizado um cartucho V3 Illumina de 300 ciclos para ambos os sequenciamentos.

Análise dos Dados, Montagem de novo e Identificação de ISVs. No processo de trimagem, os reads foram avaliados no FastQC de acordo com a qualidade e foram eliminadas sequências com Phred <30, (Script I, material suplementar). Para a análise dos referentes dados do sequenciamento de amostras contendo os quatro sorotipos de DENV foi utilizado o Software ViralFlow. Foi utilizado o Diamond Para realizar a montagem de *novo* dos contigs utilizando os SPAdes e o Blast (Buchfink *et al.* 2015), seguindo um script em bash, escrito por Filipe Zimmer e Alexandre Freitas, adaptado (script II, material suplementar).

Análise Filogenética. Foram utilizadas as sequências alinhadas de cada vírus para realizar um BLASTN, as sequências semelhantes foram alinhadas e formatadas por PHYLIP, após o alinhamento foram geradas as árvores. Cada árvore foi construída usando o método de Máxima verossimilhança, baseada no modelo de seleção automática SMS (Smart Model Selection) da plataforma PhyML-ATCG, com o critério de seleção AIC (Akaike Information Criterion), foi utilizado suporte bootstrep para agrupamento da árvore.

Resultados

PCR Convencional para Detecção de ISVs

Extração de RNA por TRIzol. A extração do RNA conferiu valores ideais de acordo com a análise por espectrofotômetro, todos os pools apresentaram valores ≥ 1.8 , caracterizando a pureza da extração. Na quantificação em ng/ μ l do ácido nucleico os valores variaram de acordo com a

quantidade de mosquitos por extração, os pools de 100 mosquitos variaram entre 2.500 e 2.900 e os pools com 50 mosquitos variaram entre 1.500 e 1.513 (Tabela 1).

Deteção de ISVs com *Primers Degenerados*. Nas análises de amplificação dos fragmentos por PCR convencional todos os pools foram negativos para vírus das classificações *Flavivirus* e *Alphavirus*, incluindo ZIKV e MAYV utilizados como controle destes grupos, respectivamente. Apenas DENV e CHIKV foram positivos dentro dos controles utilizados para as respectivas classificações (Figs. 1 e 2).

Resultados de Metaviroma

Sequenciamento I; Total de reads e Dados Genômicos. O primeiro sequenciamento (tabela 3) foi bem sucedido, gerando um total de 15.078.730 reads, mapeando genomas conhecidos utilizados como controle (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4). Para a amostra 5 (DENV4), foram obtidos 2.217.906 reads, o sorotipo 4 de DENV teve 84% de cobertura do genoma, com profundidade média de 4.4x. Os outros três sorotipos tiveram cobertura <35% (tabela 5). Também foram identificados vírus específicos de insetos nas amostras referentes a *Cx. quinquefasciatus*. Sendo *Culex* bunyavírus e Wutai mosquito phasivirus (família Phasiviridae) identificados em *Cx. quinquefasciatus*, com cobertura de 75% e 64% e profundidade média de 10.4x e 8.4x, respectivamente (tabela 5). Em 3 das 4 amostras de células C6/36 identificou-se o vírus *Culex* densovirus, em culturas de DENV dos sorotipos 1,2 e 3. Este vírus teve cobertura de 100% do genoma e profundidade variando entre 8689x e 21872x (tabela 5). Após a trimagem das sequências foram selecionados os melhores hits e foi gerado um tabular contendo as informações de cada fragmento recuperado para os valores de identidade dos aminoácidos, tamanho do fragmento recuperado e evaluate dos respectivos vírus (tabela 6).

Sequenciamento II; Resultados do Input e Montagem da Biblioteca. O segundo sequenciamento não resultou em reads, após construção do cDNA e tratamento com a Klenow, até a etapa de montagem da biblioteca, foram feitas as respectivas quantificações e os valores obtidos foram abaixo de 3 ng/μl (Tabela 4) revelando uma baixa concentração de ácidos nucleicos nas amostras.

Filogenia dos ISVs Sequenciados em *Cx. quinquefasciatus* e Células C6/36. A análise filogenética dos vírus Culex bunyavirus e Wutai mosquito phasivirus (Figs. 3 e 4) agrupou esses ISVs próximos. O vírus Culex densovirus foi agrupado próximo ao genoma “Aedes aegypti bunyavirus” nas três árvores construídas para os genomas identificados nas amostras de DENV1, DENV2 e DENV3.

Discussão

O uso de PCR convencional utilizando *primers* degenerados para identificação de ISVs não se mostrou eficiente neste trabalho, logo, descartou-se a utilização deste método pela falha na amplificação dos vírus Mayaro e Zika, que são agrupados nos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* e portam as regiões conservadas dos respectivos genes (nsP4 e NS5). Estas falhas revelam que a técnica empregada não é sensível para estes domínios. Vázquez e colaboradores (2012), descrevem o uso dos *primers* degenerados do gene Ns5 para detecção de três vírus do gênero flavivírus: Spanish Ochlerotatus flavivírus, Spanish Culex flavivírus e Marisma Mosquito vírus (Vázquez *et al.* 2012). No estudo citado este protocolo se mostra eficaz, mas não foram encontradas evidências científicas para o uso destes *primers* na detecção de outros vírus. O perfil eletroforético deste trabalho exibiu uma banda de ~1200pb para o vírus DENV, divergindo do estudo citado (Vázquez *et al.* 2012), que revela a amplificação de um fragmento de 1019pb. Sánchez-Seco e colaboradores (2001) descrevem a técnica nested-RT-PCR para detecção de alfavírus pelo gene nsP4, onde foram testados os vírus:

Western Equine Encephalitis (WEEV), Semliki Forest (SFV), Chikungunya (CHKV) e O'nyong nyong (ONNV), todas as amostras foram amplificadas. Também não há registros do uso dos respectivos *primers* para a identificação de ISVs na literatura.

Apesar das técnicas de PCR convencional apresentarem baixo custo, estas não se mostram sensíveis na detecção de ISVs. As novas descobertas e diversidade desses ISVs também devem ser consideradas, muitos destes genomas são desconhecidos e não podem ser caracterizados por técnicas tradicionais. Parte-se, então, para implementação de um protocolo otimizado de metaviroma, utilizando a técnica de shotgun, por sequenciamento direto do cDNA.

O processo de maceração e extração é uma etapa crucial na metagenômica, pois garante a quebra mecânica a nível histológico e celular, onde aportam-se os vírus que são dependentes da maquinaria celular para replicação. Muitas técnicas garantem a liberação dos vírus para posterior isolamento e sequenciamento. No respectivo estudo foram empregadas duas etapas julgadas importantes por alguns autores: a maceração dos tecidos, contabilizada por 30 segundos com o uso de pistilo elétrico e dois ciclos de congelamento rápido à -80°C e descongelamento, que se aplica a degradação da membrana celular e do capsídeo viral (Eibach *et al.* 2019, Truchado *et al.* 2020).

Uma outra etapa indispensável no metaviroma é o tratamento das amostras com o uso de nucleases, que garante a degradação de ácidos nucleicos não-alvo do sequenciamento, gerando um número de reads de maior aproveitamento no método de shotgun. Neste trabalho utilizou-se TURBO DNase no tratamento dos inóculos pós maceração, eliminando possíveis moléculas de DNA genômico do hospedeiro (Jansen *et al.* 2021). Na construção do cDNA, empregou-se o uso da enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase, também foi utilizada a DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, para o enriquecimento das amostras e abrangência de grupos virais com genoma de DNA (Kramná & Cinek 2018). O uso das respectivas enzimas possibilitou o sequenciamento de densovirus

(ssDNA), apontando a eficiência da enzima na caracterização do mesmo, que obteve cobertura de 100% do genoma.

Os ISVs detectados nas amostras de *Cx. quinquefasciatus* reforçam a necessidade de realizar este tipo de abordagem previamente em estudos de arbovirologia. A linhagem CqSLab foi estabelecida há mais de 10 anos no departamento de Entomologia do IAM-FIOCRUZ-PE, a detecção dos vírus Wutai mosquito phasivirus e Culex bunyavirus nestes mosquitos sugere que a manutenção destes ISVs é consistente ao longo dos anos, além de corroborar com estudos que abordam a transmissão vertical como principal meio de manutenção (Coatsworth *et al.* 2021). No Brasil, o vírus Wutai mosquito phasivirus foi descrito em mosquitos selvagens das espécies *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, na cidade do Rio de Janeiro, por Ribeiro *et al.* (2019). O estudo citado agrupa esse ISV próximo a Culex bunyavirus, corroborando com a filogenia realizada aqui. O vírus Phasi-Charoen-like-Virus também está intimamente próximo de ambas classificações (Wutai mosquito phasivirus e Culex bunyavirus), recentemente, um estudo apontou que esse ISV aumenta a capacidade de transmissão dos vírus DENV e ZIKV do mosquito para o hospedeiro vertebrado, além de aumentar em 200% as chances de o vírus da dengue ser encontrado em coinfeção com esse ISV (Olmo *et al.* 2023). Devido a esta proximidade, deve-se considerar as possíveis implicações dos vírus Wutai mosquito phasivirus e Culex bunyavirus sob arbovírus de importância médica, considerando o uso de linhagens de mosquitos e células para tais estudos.

O vírus Culex pipiens pallens densovirus, identificado nas amostras de células C6/36 juntamente com os sorotipos de dengue 1,2 e 3 pode ter duas possíveis portas de entrada na cultura de células: pelo processo de infecção pelo arbovírus (DENV) utilizado nos estudos, ou este vírus ser integrante da respectiva linhagem de células, já que há entradas no Genbank com a referência C6/36 descrita por outros autores (Figs. 4 e 5) (Chen *et al.* 2004). O uso comum de C6/36 em estudos de arbovirologia *in vitro* é destacado na literatura, mas trata-se de uma linhagem que apresenta resposta

de RNAi antiviral limitada, sendo suscetível a quaisquer infecções (Brackney *et al.* 2010). A grande problemática do isolamento viral se dá pelo crescimento de outros agentes nesse meio, logo, os estudos que revelam a interferência dos ISVs sob arbovírus devem ser considerados minuciosamente.

No segundo sequenciamento não foram gerados reads, as amostras utilizadas neste sequenciamento, descritas na tabela 4, não apresentaram uma concentração de cDNA consistente em comparação as amostras da tabela 3. Considerando o tempo de estocagem dos mosquitos utilizados nestas amostras (coletados no ano de 2017), o baixo rendimento pode estar ligado a degradação do RNA. Também pode-se considerar o erro na construção da biblioteca, Schirmer e colaboradores (2016), demonstram que baixos valores de entrada (concentração de dsDNA) na construção de bibliotecas pode conferir erros na etapa de sequenciamento, utilizando o Nextera, empregado neste estudo (Schirmer *et al.* 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho resulta em um protocolo funcional, estabelecido para a detecção de vírus específicos de insetos e arbovírus em mosquitos e células C6/36 de *Aedes albopictus*, com uma abordagem de metaviroma por sequenciamento em larga escala. Os ISVs aqui identificados reforçam, ainda, a importância de realizar este tipo de prospecção em mosquitos e células utilizados em estudos de arbovirologia.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento parcial do estudo, ao Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE) pelo apoio e infraestrutura cedida para o desenvolvimento dos experimentos.

Literatura Citada

- Achee, N. L., J. P. Grieco, H. Vatandoost, G. Seixas, J. Pinto, L. Ching-Ng, ... & J. Vontas, 2019.** Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 13(1), e0006822.
- Auguste, A. J., J. T. Kaelber, E. B. Fokam, H. Guzman, C. V. Carrington, J. H. Erasmus, ... & S. C. Weaver. 2015.** A newly isolated reovirus has the simplest genomic and structural organization of any reovirus. *J Virol*, 89(1), 676-687.
- Bolling, B. G., L. Eisen, C. G. Moore, & C. D. Blair. 2011.** Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission. *Am. J. Trop. Med*, 85(1), 169.
- Bolling, B. G., S. C. Weaver, R. B. Tesh, & N. Vasilakis. 2015.** Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses*, 7(9), 4911-4928.
- Brackney, D. E., J. C. Scott, F. Sagawa, J. E. Woodward, N. A. Miller, F. D. Schilkey... & G. D. Ebel. 2010.** C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 4(10), e856.
- Buchfink, B., C. Xie, & D. H. Huson, 2015.** Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods*, 12(1), 59-60.
- Calle-Tobón, A., J. Pérez-Pérez, N. Forero-Pineda, O. T. Chávez, W. Rojas-Montoya, G. Rúa-Uribe, & A. Gómez-Palacio. 2022.** Local-scale virome depiction in Medellín, Colombia, supports significant differences between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Plos one*, 17(7), e0263143.
- Cammisa-Parks, H., L. A. Cisar, A. Kane, & V. Stollar. 1992.** The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology*, 189(2), 511-524.
- Cansado-Utrilla, C., S. Y. Zhao, P. J. McCall, K. L. Coon, & G. L. Hughes. 2021.** The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. *Microbiome*, 9(1), 1-11.
- Chen, S., L. Cheng, Q. Zhang, W. Lin, X. Lu, J. Brannan ... & J. Zhang. 2004.** Genetic, biochemical, and structural characterization of a new densovirus isolated from a chronically infected *Aedes albopictus* C6/36 cell line. *Virology*, 318(1), 123-133.
- Coatsworth, H., J. Bozic, J. Carrillo, E. A. Buckner, A. R. Rivers, R. R. Dinglasan, & D. K. Mathias. 2021.** Intrinsic variation in the vertically transmitted insect-specific core virome of *Aedes aegypti*. *bioRxiv*.

- Costa, M. M. C. 2021.** Avaliação de parâmetros da capacidade vetorial para arbovírus em populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Doctoral dissertation).
- de Almeida, J. P., E. R. Aguiar, J. N. Armache, R. P. Olmo, & J. T. Marques. 2021.** The virome of vector mosquitoes. *Curr Opin Virol*, 49, 7-12.
- Eibach, D., B. Hogan, N. Sarpong, D. Winter, N. S. Struck, Y. Adu-Sarkodie ... & D. Cadar. 2019.** Viral metagenomics revealed novel betatorquevirus species in pediatric inpatients with encephalitis/meningoencephalitis from Ghana. *Sci. Rep.* 9(1), 2360.
- Fujita, R., F. Kato, D. Kobayashi, K. Murota, T. Takasaki, S. Tajima... & K. Sawabe. 2018.** Persistent viruses in mosquito cultured cell line suppress multiplication of flaviviruses. *Heliyon*, 4(8), e00736.
- Gao, H., C. Cui, L. Wang, M. Jacobs-Lorena, & S. Wang. 2020.** Mosquito microbiota and implications for disease control. *Trends Parasitol.* 36(2), 98-111.
- He, X., Q. Yin, L. Zhou, L. Meng, W. Hu, F. Li ... & H. Wang. 2021.** Metagenomic sequencing reveals viral abundance and diversity in mosquitoes from the Shaanxi-Gansu-Ningxia region, China. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 15(4), e0009381.
- Igarashi, A., K. A. Harrap, J. Casals, & V. Stollar. 1976.** Morphological, biochemical, and serological studies on a viral agent (CFA) which replicates in and causes fusion of *Aedes albopictus* (Singh) cells. *Virology*, 74(1), 174-187.
- Jansen, S., D. Cadar, R. Lühken, W. P. Pfitzner, H. Jöst, S. Oerther... & A. Heitmann. 2021.** Vector competence of the invasive mosquito species *Aedes koreicus* for arboviruses and interference with a novel insect specific virus. *Viruses*, 13(12), 2507.
- Lefort, V., J. E. Longueville, & O. Gascuel. 2017.** SMS: smart model selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* 34(9), 2422-2424.
- Öhlund, P., H. Lundén, & A. L. Blomström. 2019.** Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus genes*, 55(2), 127-137.
- Olmo, R. P., Y. M. Tadjro, E. R. Aguiar, J. P. P. de Almeida, F. V. Ferreira, J. N. Armache... & J. T. Marques. 2023.** Mosquito vector competence for dengue is modulated by insect-specific viruses. *Nat. Microbiol.* 8(1), 135-149.
- Ribeiro, M. S., T. Ayllón, V. Malirat, D. C. P. Câmara, C. M. Giordano Dias, G. Louzada... & R. Campos Acevedo. 2019.** High prevalence of a newly discovered Wutai mosquito Phasivirus in mosquitoes from Rio de Janeiro, Brazil. *Insects*, 10(5), 135.
- Saiyasombat, R., B. G. Bolling, A. C. Brault, L. C. Bartholomay, & B. J. Blitvich, 2011.** Evidence of efficient transovarial transmission of *Culex flavivirus* by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 48(5), 1031-1038.

- Sánchez-Seco, M.P., D. Rosario, E. Quiroz, G. Guzmán, & A. Tenorio. 2001.** A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J. Virol. Methods*. 95:153-161.
- Schirmer, M., R. D'Amore, U. Z. Ijaz, N. Hall, & C. Quince. 2016.** Illumina error profiles: resolving fine-scale variation in metagenomic sequencing data. *BMC bioinformatics*, 17, 1-15.
- Schultz, M. J., H. M. Frydman, & J. H. Connor. 2018.** Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in *Aedes* mosquito cells. *Virology*, 518, 406-413.
- Stollar, V., V.L. Thomas. 1975.** An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, v. 64, n. 2, p. 367-377.
- Truchado, D. A., A. Llanos-Garrido, D. A. Oropesa-Olmedo, B. Cerrada, P. Cea, M. A. Moens ... & L. Benítez. 2020.** Comparative metagenomics of Palearctic and Neotropical avian cloacal viromes reveal geographic bias in virus discovery. *Microorganisms*, 8(12), 1869.
- Vázquez, A., M. P. Sánchez-Seco, G. Palacios, F. Molero, N. Reyes, S. Ruiz ... & A. Tenorio. 2012.** Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12(3), 223-229.
- Weaver, S. C., & A. D. Barrett. 2004.** Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(10), 789-801.
- Westaway, E. G., M. A. Brinton, Gaidamovich SYa, M. C. Horzinek, A. Igarashi, L. Kääriäinen, D. K. Lvov, J. S. Porterfield, P. K. Russell, & D. W. Trent. 1985.** Flaviviridae. *Intervirology*, 24(4), 183–192.

Tabela 1. Quantificação de ácido nucleico e níveis de absorbância das amostras de RNA extraídos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, por TRIzol. Dados obtidos por espectrofotômetro NanoDrop™ 2000.

Amostra (ID)	Nº de indivíduos (pool)	Ácido nucleico (ng/ ul)	260/280 (absorbância)	Tipo de amostra
P1 <i>Aedes aegypti</i> (RecLab)	100 ♀	2511,3	2,04	RNA
P2 <i>Aedes aegypti</i> (RecLab)	100 ♀	2913,9	2	RNA
P3 <i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSLab)	100 ♀	2840,2	2	RNA
P4 <i>Aedes aegypti</i> (RecLab)	50 ♀	1513,6	1,99	RNA
P5 <i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSLab)	50 ♀	1504,7	2,04	RNA

Tabela 2. *Primers* degenerados referentes aos alvos nsP4 e NS5 descritos para classificação de Alphavirus e Flavivirus respectivamente.

Alphavirus		Flavivírus	
ID primer	Sequência	ID primer	Sequência
Alpha1+	GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG	1NS5F	GCATCTAYAWCAYNATGGG
Alpha1-	KYTCYTCIGTRTGYYTIGTICCIGG	1NS5R	CCANACNYNRTTCCANAC
Alpha2+	GIAAYTGyAAYGTIACICARATG	2NS5F	GCNATNTGGTWYATGTGG
Alpha2-	GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC	2NS5R	CATRTCTTCNGTCGTCATCC

Tabela 3. Amostras de mosquitos e sobrenadante de células C6/ 36 de *Aedes albopictus* processadas para o sequenciamento I e quantificação das amostras por etapa.

Pool	Amostra	Infecção	Nº de indivíduos/ul	cDNA (ng/ul)	Output Biblioteca (ng/ul)	Total de reads (nt)
1	<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqsLab)	-	50	11.6	13.5	5364292
2	Sobrenadante C6/36	DENV1	300 ul	5.39	10.7	4845702
3	Sobrenadante C6/36	DENV2	300 ul	4.39	16.5	3510392
4	Sobrenadante C6/36	DENV3	300 ul	3.04	11.1	5743174
5	Sobrenadante C6/36	DENV4	300 ul	1.93	8.70	2217906
6	<i>Aedes aegypti</i> (campo)	CHIKV	50	0.54	4.26	51661
7	Controle negativo	-	-	0.2	0.4	44203
8	Controle negativo da biblioteca	-	-	-	0.0	200

Tabela 4. Amostras de mosquitos de campo e sobrenadante de células C6/ 36 de *Aedes albopictus* processadas para o sequenciamento II e quantificação das amostras por etapa.

Pool	Amostra	Infecção	Nº de indivíduos/ul	cDNA (ng/ul)	Output Biblioteca (ng/ul)	Total de reads (nt)
1	<i>Aedes aegypti</i> (RecLab)	-	50	1.02	0.98	-
2	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Recife)	-	50	0.49	0.32	-
3	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Olinda)	-	50	0.20	0.09	-
4	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Jaboatão)	-	50	0	-	-
5	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Paulista)	-	50	1.12	0.99	-
6	Sobrenadante C6/36	-	300 ul	2.29	1.28	-
7	Sobrenadante C6/36	DENV4	300 ul	2.49	0.4	-
8	Controle negativo da biblioteca	-	-	-	0.02	-

*Não foram gerados reads neste sequenciamento

Tabela 5. Resultados obtidos no ViralFlow dos 4 sorotipos de DENV e ISVs encontrados nas amostras de *Cx. quinquefasciatus* e células C6/36, os dados são referentes a cobertura genômica de cada vírus.

Pool	GenBank (ref)	Vírus	Reads	Reads mapeados	Cobertura	Profundidade média
2	KJ189369.1	DENV1	4845702	1328	32.7%	4.4x
3	NC_001474.2	DENV2	3510392	511	0,02%	1x
4	NC_001475.2	DENV3	5743174	910	0,4%	2x
5	NC_002640.1	DENV4	2217906	3726	84%	14x
1	MH188051.1	Culex bunyavirus	5364292	2811	75%	10.4 x
1	NC_031318.1	Wutai mosquito phasivirus	5364292	1024	64%	8.4 x
2	EF579757.1	Culex densovirus	4845702	850173	100%	11261 x
3	EF579757.1	Culex densovirus	3510392	1882830	100%	21872 x
4	EF579757.1	Culex densovirus	5743174	636979	100%	8689 x

Tabela 6. Sequencias virais obtidas no Diamond e respectivos dados de identidade e comprimento em aminoácidos para cada vírus obtido no Sequenciamento I.

Pool	Vírus	Melhor hit	Identidade % (aa)	Comprimento (aa)	E-value	Classificação	Tipo de genoma
2	DENV1	AAO20974.1_polyprotein_[Dengue_virus_1]	98.0	102	4.69e-55	Flaviviridae	ssRNA
		AAP80402.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_1]	97.0	100	1.18e-58		
		ATG84982.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_1]	100	82	1.66e-43		
		AHG23202.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_1]	95.6	90	1.65e-48		
		AAK59271.1_envelope_glycoprotein,_partial_[Dengue_virus_1]	100	72	151		
		ATG84982.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_1]	93.5	123	3.37e-74		
		AAP80402.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_1]	98.3	116	212		
		CRG63326.1_partial_RNA_dependent_RNA_polymerase,_partial_[Dengue_virus]	98.2	112	231		
3	DENV2	ACZ74559.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_2]	100	68	9.55e-41	Flaviviridae	ssRNA
4	DENV3	YP_001531171.3_Nonstructural_protein_NS2B_[Dengue_virus_3]	95.5	66	7.37e-36	Flaviviridae	ssRNA
		ABV54906.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_3]	100	71	4.43e-36		
		ABV54904.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_3]	97.6	125	1.17e-77		
		BAF94061.1_polyprotein,_partial_[Dengue_virus_3]	98.0	102	209		
5	DENV4	ANS54455.1_NS2B-NS3,_partial_[Dengue_virus_4]	98.6	74	1.01e-38	Flaviviridae	ssRNA
		ABY86706.1_nonstructural_protein_5,_partial_[Dengue_virus_4]	98.4	124	1.49e-82		
		ACQ44395.1_polyprotein_[Dengue_virus_4]	99.2	122	1.56e-78		
		AKN20409.1_envelope_protein,_partial_[Dengue_virus_4]	99.7	290	1.11e-210		
		NP_740321.1_NS3_protein_[Dengue_virus_4]	99.2	260	3.38e-179		
		ACQ44395.1_polyprotein_[Dengue_virus_4]	98.2	163	3.16e-107		
		APT69939.1_envelope_protein,_partial_[Dengue_virus_4]	100	97	3.51e-63		
		AMK47852.1_envelope_glycoprotein,_partial_[Dengue_virus]	97.6	209	1.12e-137		
		ACH61714.1_polyprotein_[Dengue_virus_4]	100	199	1.51e-114		

		ALQ10738.1_polyprotein_partial_[Dengue_virus_4]	100	195	1.59e-138		
		AIQ84226.1_polyprotein_[Dengue_virus_4]	100	409	6.77e-256		
		AAO83387.1_polyprotein_partial_[Dengue_virus_4]	100	79	1.66e-52		
1	Culex bunyavirus	AXQ04880.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Culex_Bunya_virus_1]	98.7	152	2.47e-95	Phasiviridae	ssRNA
		AXQ04878.1_glycoprotein_precursor_[Culex_Bunyavirus_1]	100	71	1.95e-36		
		AXQ04880.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Culex_Bunya_virus_1]	97.4	117	223		
		AXQ04879.1_nucleocapsid_protein_[Culex_Bunyavirus_1]	99.2	126	3.39e-74		
		AXQ04878.1_glycoprotein_precursor_[Culex_Bunyavirus_1]	96.5	395	9.02e-276		
1	Wutai mosquito phasivirus	YP_009305140.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	94.4	71	147	Phasiviridae	ssRNA
		YP_009305140.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	98.6	70	135		
		YP_009305141.1_glycoprotein_precursor_[Wutai_mosquito_phasivirus]	97.5	314	8.45e-212		
		YP_009305141.1_glycoprotein_precursor_[Wutai_mosquito_phasivirus]	97.6	293	3.04e-191		
		QIC54212.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	100	127	256		
		YP_009305141.1_glycoprotein_precursor_[Wutai_mosquito_phasivirus]	91.4	70	127		
		YP_009305140.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	97.4	230	1.15e-144		
		YP_009305140.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	97.9	94	184		
		YP_009305140.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	96.7	92	4.04e-50		
		YP_009305140.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	97.8	90	184		
		QIC54212.1_RNA-dependent_RNA_polymerase_[Wutai_mosquito_phasivirus]	98.3	178	1.11e-104		
2	Culex Densovirus	ABU94978.1_non-structural_protein_1_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	100	182	2.40e-18	Parvoviridae	ssDNA

	ABU94986.1_capsid_protein_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	94.1	286	535		
	ABU94971.1_capsid_protein_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	100	18	2.67e-04		
	ABU94971.1_capsid_protein_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	100	29	66.6		
	AFH02733.1_NS1_partial_[Culex_pipiens_densovirus]	100	24	3.68e-07		
	YP_002265408.1_viral_capsid_protein_[Anopheles_gambiae_densovirus]	98.7	75	1.03e-44		
	YP_002854229.1_nonstructural_protein_1_[Aedes_aegypti_densovirus_2]	94.0	581	0		
3	Culex Densovirus	ABU94986.1_capsid_protein_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	91.4	355	669	Parvoviridae ssDNA
	YP_004222723.1_non-structural_protein_1_[Mosquito_densovirus_BR/07]	100	48	4.84e-25		
	YP_002854231.1_capsid_protein_[Aedes_aegypti_densovirus_2]	80.4	56	102		
	APA19411.1_NS1_[Aedes_albopictus_densovirus_5]	100	49	2.14e-23		
	YP_004222723.1_non-structural_protein_1_[Mosquito_densovirus_BR/07]	100	42	5.45e-23		
	P27453.1_RecName: Full=Capsid_protein_VP1/VP2;_AltName:[Aedes_densonucleosis_virus_(STRAIN_GKV_002_002)]	96.5	228	6.17e-154		
	AAP78907.1_non-structural_protein_1_[Aedes_albopictus_C6/36_cell_densovirus]	56.7	30	45.8		
	YP_004222725.1_capsid_protein_[Mosquito_densovirus_BR/07]	76.9	26	9.80e-04		
	P27453.1_RecName: Full=Capsid_protein_VP1/VP2;_[Aedes_densonucleosis_virus_(STRAIN_GKV_002_002)]	62.9	35	2.79e-04		
	NP_694827.1_NS1_partial_[Aedes_albopictus_densovirus_2]	97.1	35	3.25e-11		
	QBF54135.1_nonstructural_protein_1_partial_[Mosquito_densovirus]	100	18	3.48e-04		
	AAT96539.1_non-structural_protein_1_partial_[Aedes_aegypti_Thai_densovirus]	74.1	27	45.1		
	AAM28943.1_non-structural_protein_1_[Aedes_albopictus_C6/36_cell_densovirus]	74.1	27	46.6		
	AFH02734.1_NS1_partial_[Culex_pipiens_densovirus]	98.8	160	2.54e-106		
	YP_004222723.1_non-structural_protein_1_[Mosquito_densovirus_BR/07]	71.4	28	47.4		

		ABU94966.1_non-structural_protein_1_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	97.0	33	6.49e-15		
		AAT96539.1_non-structural_protein_1,_partial_[Aedes_aegypti_Thai_densovirus]	93.5	31	62.4		
		ALF05513.1_non-structural_protein,_partial_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	98.7	156	306		
		ABU94987.1_non-structural_protein_1_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	96.7	30	66.6		
		AJI02599.1_capsid_protein_[Mosquito_densovirus_HB-3]	85.7	28	1.08e-07		
		YP_004222723.1_non-structural_protein_1_[Mosquito_densovirus_BR/07]	96.4	28	2.52e-09		
		YP_004222725.1_capsid_protein_[Mosquito_densovirus_BR/07]	96.2	26	57.8		
		AAT96552.1_non-structural_protein_1,_partial_[Aedes_aegypti_Thai_densovirus]	85.7	21	1.86e-04		
		ABU94987.1_non-structural_protein_1_[Culex_pipiens_pallens_densovirus]	100	144	289		
		YP_004222724.1_non-structural_protein_2_[Mosquito_densovirus_BR/07]	96.9	130	6.31e-79		
		AXQ04852.1_nonstructural_protein_1_[Culex_densovirus]	87.9	91	1.03e-50		
		YP_004222723.1_non-structural_protein_1_[Mosquito_densovirus_BR/07]	100	113	229		
4	Culex Densovirus	AXQ04852.1_nonstructural_protein_1_[Culex_densovirus]	92.9	28	60.5	Parvoviridae	ssDNA
		YP_002854229.1_nonstructural_protein_1_[Aedes_aegypti_densovirus_2]	94.8	828	0.0		

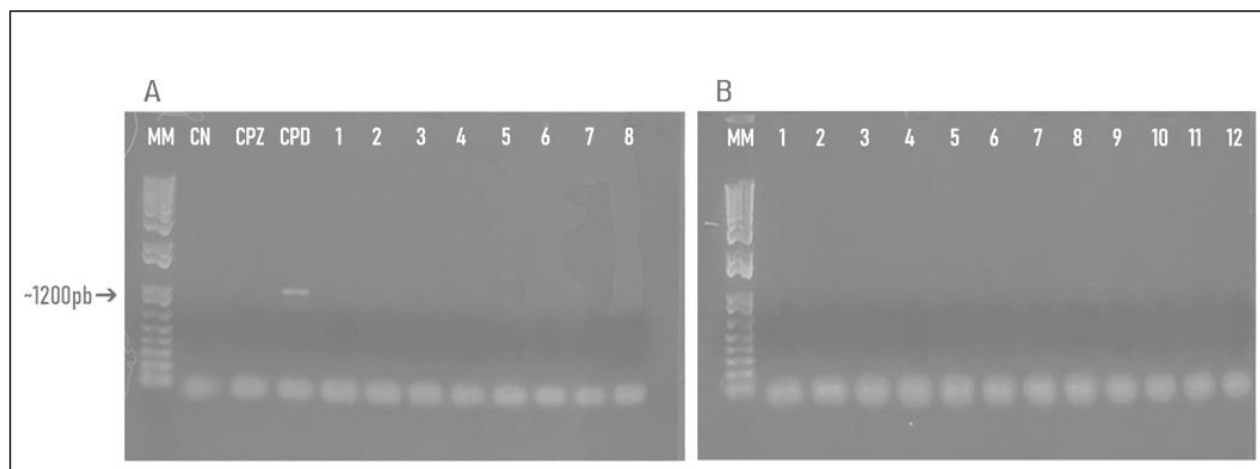


Figura 1. Perfil eletroforético do gene Ns5 (Flavivírus). **(A)** Os controles positivos (CPZ e CPD) são referentes aos vírus zika e dengue (sorotipo 2), 1-8 são produtos de PCR advindos das amostras de RNA de *Cx. quinquefasciatus* (P3 e P5) diluídas em 10, 100, 1.000 e 10.000x. **(B)** As amostras de 1-12 são referentes as amostras de *Ae. aegypti* (P1, P2 e P4). Todos foram negativos para os *primers* utilizados, exceto DENV (CPD).

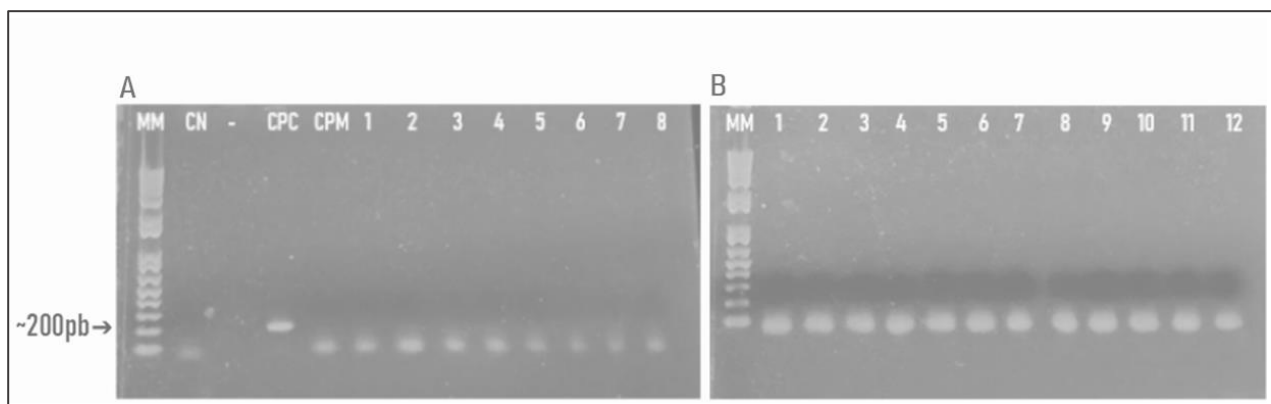


Figura 2. Perfil eletroforético do gene NsP4 (Alphavirus), **(A)** os controles positivos (CPC e CPM) são referentes aos vírus chikungunya e mayaro. 1-8 são produtos de PCR advindos das amostras de RNA de *Cx. quinquefasciatus* (P3 e P5) diluídas em 10, 100, 1.000 e 10.000x. **(B)** As amostras de 1-12 são referentes *Ae. aegypti* (P1, P2 e P4). Todos foram negativos para os *primers* utilizados, exceto CHIKV (CPC).

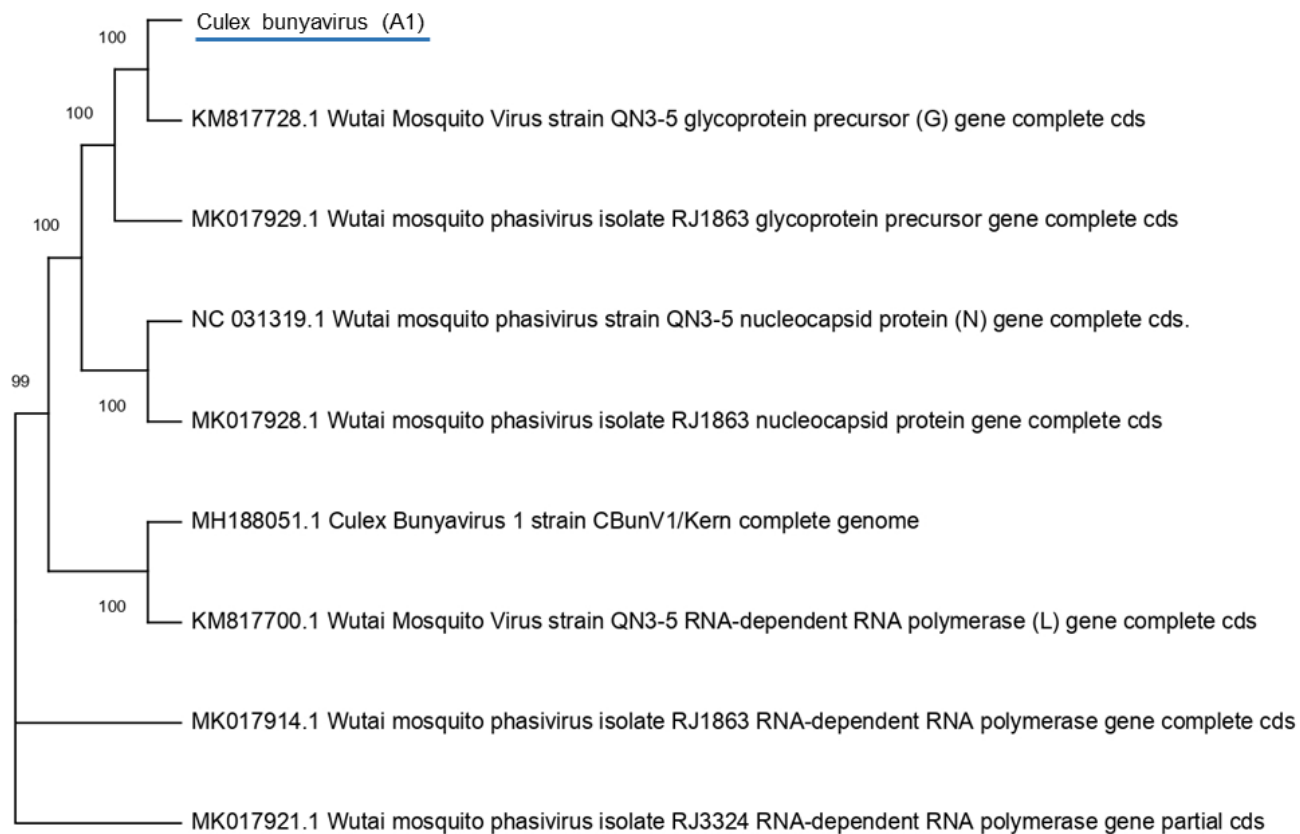


Figura 3. Análise filogenética referente a sequência de Culex bunyavirus recuperada na amostra 1 (*Culex quinquefasciatus*), a sequência alinhada está destacada em azul. São indicadas as referências de acesso do GenBank seguido das espécies de mosquitos dos quais foram isolados e designações das sequências gênicas. A filogenia foi gerada usando PhyML ATGC.

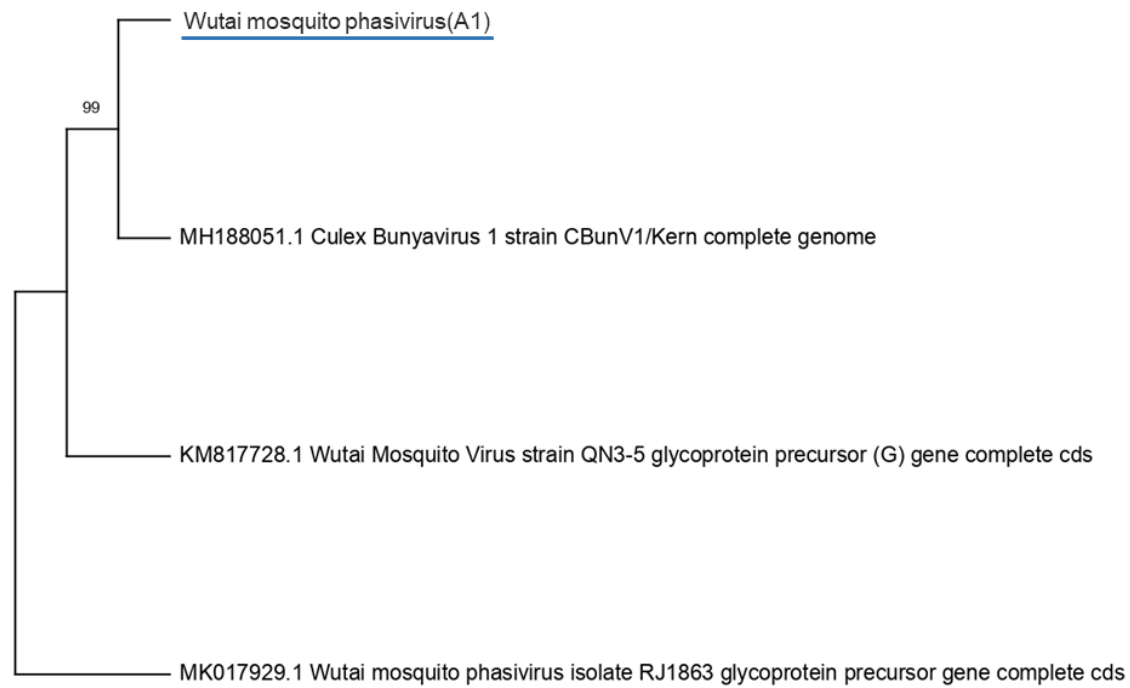


Figura 3. Análise filogenética referente a sequência do vírus Wutai mosquito phasivirus recuperada na amostra 1 (*Culex quinquefasciatus*).

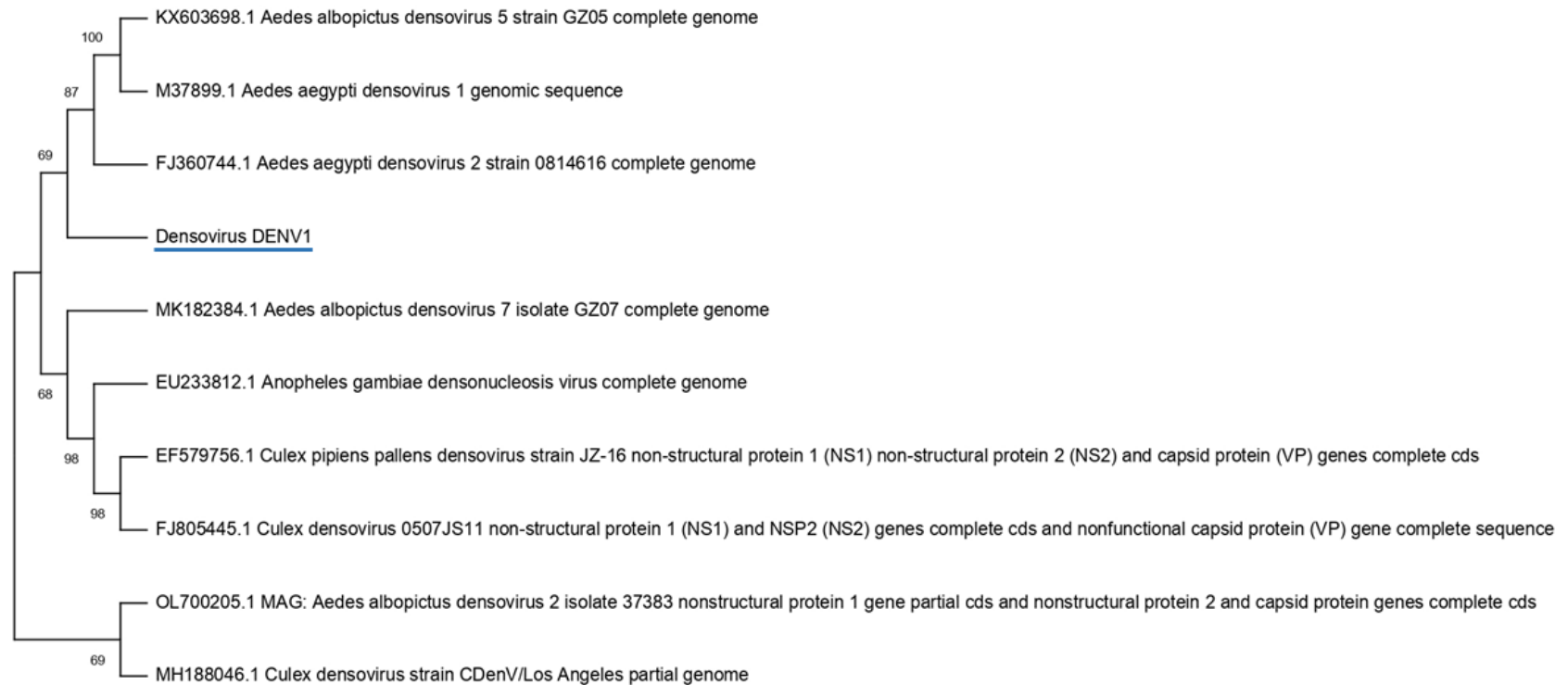


Figura 3. Análise filogenética referente as sequências Culex densovirus recuperadas na amostra 2 (DENV1), a sequência obtida para este genoma está destacada em azul. São indicadas as referências de acesso do GenBank seguido das espécies de mosquitos dos quais foram isolados e designações das sequências gênicas. A filogenia foi gerada usando PhyML.

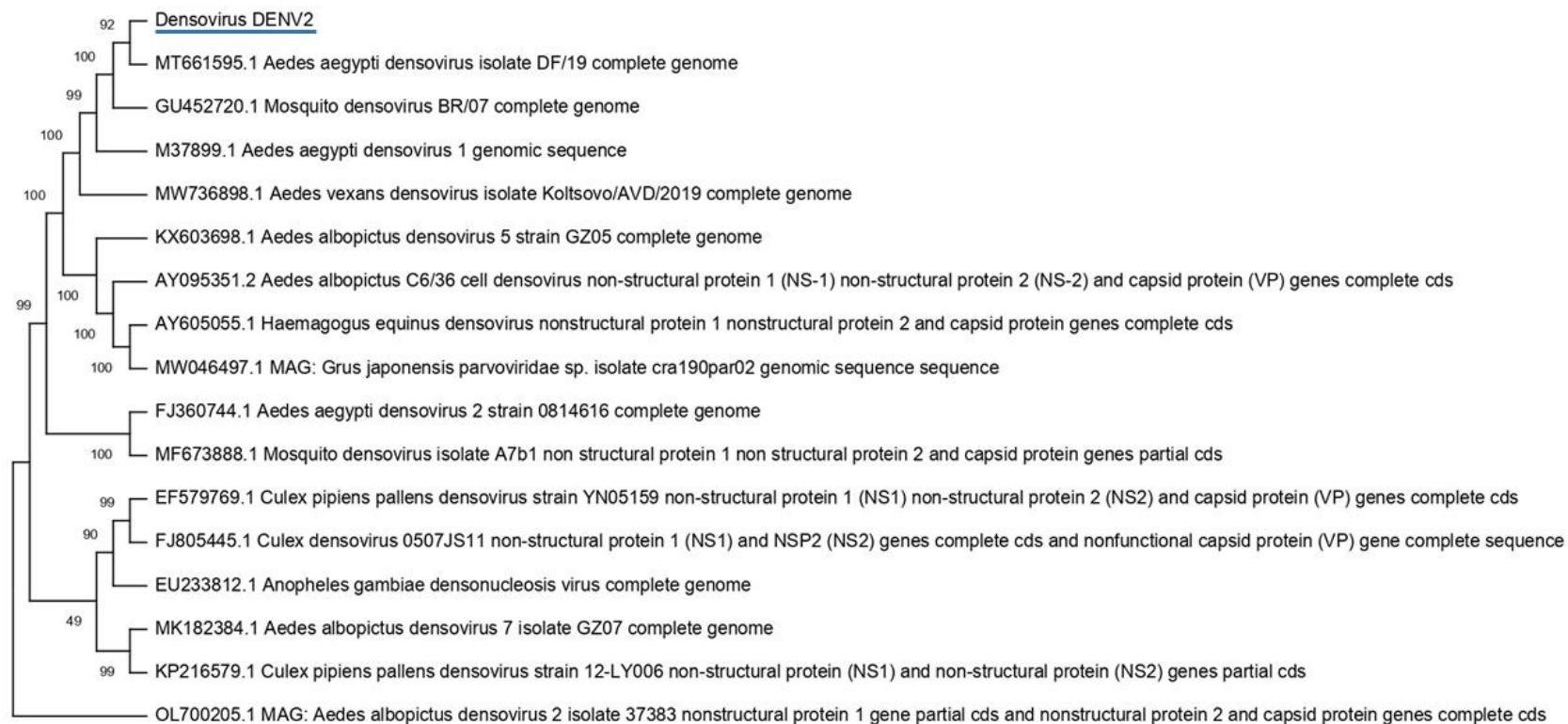


Figura 4. Análise filogenética referente a sequência de Culex densovirus recuperada na amostra 3 (DENV2).

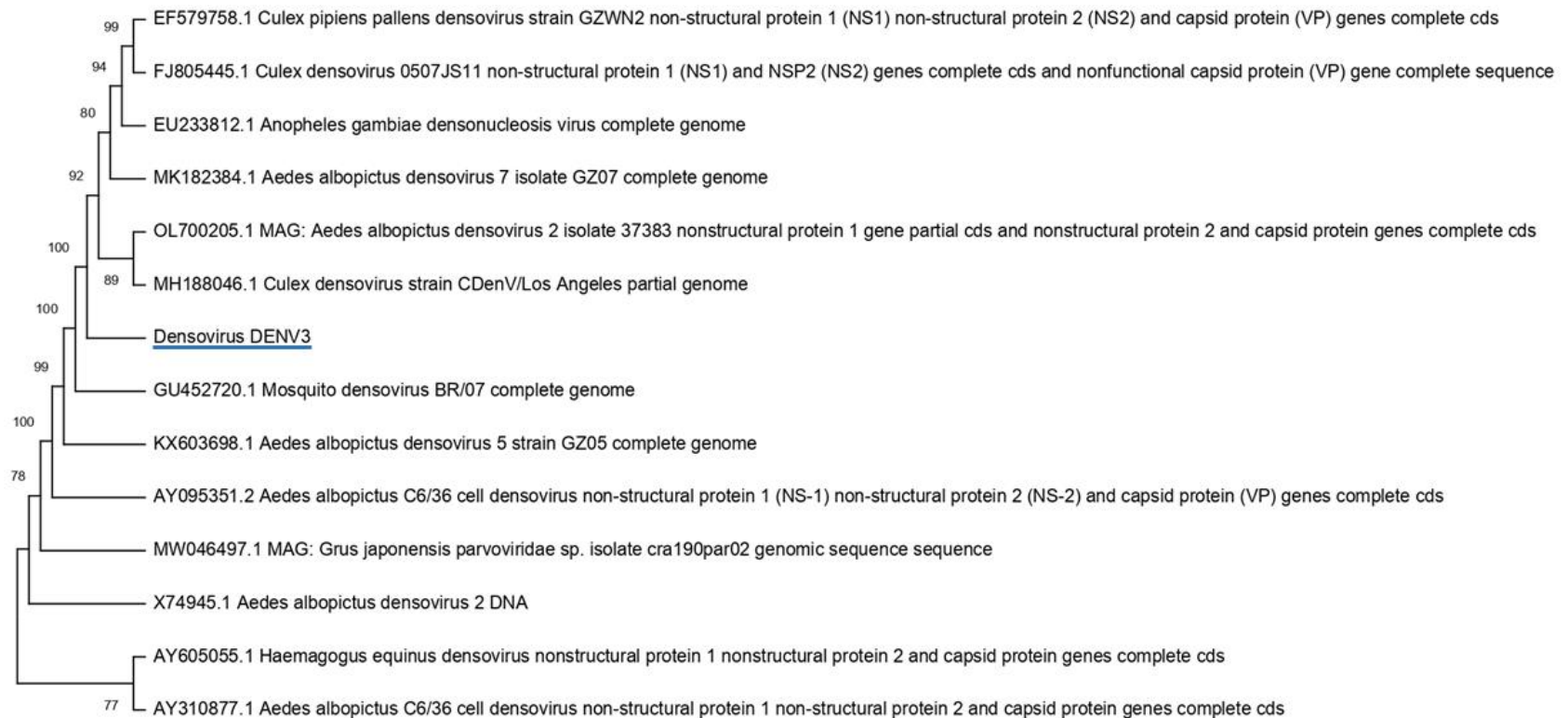


Figura 5. Análise filogenética referente a sequência de Culex densovirus recuperada na amostra 4 (DENV3).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Scripts utilizados para montagem das sequências obtidas no sequenciamento

Script 1. Remoção das sequencias de baixa qualidade utilizando o FastQC

```
fastp -i 1_S1_L001_R1_001.fastq.gz -I 1_S1_L001_R2_001.fastq.gz -w 1 -o 1.R1.fq.gz -O 1.R2.fq.gz -h 1.fastp.html -j 1.fastp.json --cut_front --qualified_quality_phred 30
```

Script 2. Montagem de *novo* dos contigs utilizando o spades e o blast utilizando o Diamond

- Foi utilizando um script em bash descrito por Filipe Zimmer e Alexandre Freitas, adaptado.

```
|-----|
ativando o conda:
eval "$(conda shell.bash hook)"
#
files=$1 #a list file with <file_1P.fastq>:<file_2P.fastq>:<file_1U.fastq>:<file_2U.fastq>

while read linha;do #para cada linha do arquivo
    # criar as variaveis de cada arquivo
    fastq_1P=$(echo $linha | awk -F":" '{print $1}')
    fastq_2P=$(echo $linha | awk -F":" '{print $2}')
    PREFIXOUT=$(echo $fastq_1P | awk -F "_" '{print $1}')
    fastp_1=$PREFIXOUT'_R1_trimmed.fq.gz'
    fastp_2=$PREFIXOUT'_R2_trimmed.fq.gz'
    #echo $fastq_1P $fastq_2P $fastq_1U $fastq_2U $PREFIXOUT teste de variaveis
    # executar as ferramentas
    conda run -n Virome fastp -i $fastq_1P -I $fastq_2P -w 1 -o $fastp_1 -O $fastp_2 -h
$PREFIXOUT.html -j $PREFIXOUT.json --cut_front --qual$
    spades.py -1 $fastp_1 -2 $fastp_2 --only-assembler --meta -m 50 -t 8 -o
${PREFIXOUT}_spades
```

```
conda activate /home/alexandre/.conda/envs/diamond/
diamond blastx -d /home/alexandre/virome/database/ncbi/new_21-12-20/nr.fasta.dmnd -q
${PREFIXOUT}_spades/contigs.fasta -p 16 -o ${PREFIXO$
```

```
done < $files
```

```
|-----|
```

Foram selecionados os 5 melhores hits de cada query

```
for i in $(ls *blastx*); do awk '{if (++count[$1] <= 5) print $0}' $i > $i.5hits; done
```

Foi selecionado o melhor hit de cada query

```
for i in $(ls *5hits*); do sort -k1,1 -k12,12gr -k11,11g -k3,3gr $i | sort -u -k1,1 --merge >
$i.besthits; done
```

Foi feito uma filtragem para reter apenas vírus

```
for i in $(ls *besthits*); do grep "virus" $i > $i.virus; done
```

Foi gerado um tabular de resultados (tabela 6)

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo traz a identificação e caracterização de vírus específicos de insetos infectantes de linhagens de culicídeos estabelecidas em laboratório, bem como vírus infectantes de linhagens de células de *Aedes albopictus* (C6/36), comumente usadas em estudos de arbovirologia em todo o globo. Estes resultados reforçam a necessidade de inspeção do viroma de insetos e células utilizados para estudos *in vitro* e *in vivo*, trazendo uma melhor apuração dos resultados pré-dispostos.

Estudos acerca da influência dos vírus Culex Bunyavírus e Wutai mosquito phasivirus sob arbovírus de importância médica devem ser conduzidos para melhor elucidação de possíveis interferências na competência vetorial e vias de ativação do sistema imune inato, principalmente considerando a competência vetorial de *Culex quinquefasciatus* para ZIKV, que se mostrou eficiente em pesquisas realizadas pelo grupo de pesquisa em Entomologia do IAM.

O protocolo de metagenômica aqui testado também pode ser eficiente em análises de metaviroma de outros insetos como pragas de importância urbana e agrícola, considerando a notável influência dos vírus sob diversos estudos além do potencial uso como controle biológico em novas descobertas. Os processos iniciais de maceração e extração de ácidos nucleicos podem ser adaptáveis de acordo com o tamanho do inseto ou seleção de órgãos de importância de acordo com as necessidades do estudo.