



Vírus específicos de insetos do táxon negevírus: análise das características do vírus Brejeira

Insect-specific viruses of the negevirus taxon: analysis of brejeira virus characteristics

Virus específicos de insectos del taxón negevirus: análisis de las características del virus brejeira

Ana Cláudia da Silva Ribeiro¹, Fábio Silva da Silva¹, Filipe Pantoja Gomes¹, Landeson Junior Leopoldino Barros¹, Livia Medeiros Neves Casseb¹, Lívia Caricio Martins¹, Valéria Lima Carvalho¹.

RESUMO

Objetivo: Dissertar sobre o negevirus e brejeira, pertencente ao táxon *Negevirus*, suas características biológicas, taxonômicas e filogenéticas, bem como sobre sua circulação e possíveis futuras aplicações no controle e prevenção de arbovírus. **Métodos:** Foi realizada uma revisão integrativa retrospectiva de estudos sobre o vírus Brejeira, em que foram analisadas publicações nacionais e internacionais publicadas nas bases e plataformas de busca. **Resultados:** Foram encontrados 95 artigos publicados. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 40 artigos foram incluídos para análise completa do texto, dentre quais todos foram escritos na língua inglesa e a maior parte dos artigos foram encontrados na base de dados do PubMed, sendo possível relatar do vírus Brejeira (BREV) as características biológicas, genômicas, a distribuição dos isolados no Brasil, bem como os diversos estudos que estão sendo feitos em relação a aplicabilidade dos vírus específico de inseto (ISVs) no que tange a controle biológico de arbovírus, a produção de plataforma de vacinas e entre outros. **Considerações finais:** O BREV assim como outros negevírus, estão sendo isolados no Brasil e merecem a atenção da comunidade científica, pois embora não causem doenças em seres humanos e animais, possuem potencial de uso biotecnológico com utilidade dentro da saúde pública.

Palavras-chave: Negevirus, Vírus Brejeira, arbovírus.

ABSTRACT

Objective: Dissertation on the Brejeira insect-specific virus, belonging to the Negevirus taxon, their biological, taxonomic and phylogenetic characteristics, as well as their circulation and possible future applications in the control and prevention of arboviruses. **Methods:** A retrospective integrative review of studies on the Brejeira virus was carried out, in which national and international publications published in databases and search platforms. **Results:** 95 articles published were found. After applying the inclusion and exclusion criteria, 40 articles were included for full text analysis, among which all were written in English and most of the articles were found in the Pubmed database, where it was possible to report the Brejeira virus (BREV) the biological and genomic characteristics, the distribution of isolates in Brazil, as well as the various studies that are being carried out in relation to the applicability of insect specific viruses (ISVs) in terms of biological control of arboviruses, the production of a vaccine platform, among others. **final considerations:** BREV, as well as other negeviruses, are being isolated in Brazil and deserve the attention of the scientific community, because

¹ Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua – PA.

although they do not cause disease in humans and animals, they have potential for biotechnological use with utility within public health.

Keywords: Negevirus, Brejeira virus, arbovirus.

RESUMEN

Objetivo: Disertar sobre el virus específico del insecto Brejeira, perteneciente al taxón Negevirus, sus características biológicas, taxonómicas y filogenéticas, así como su circulación y posibles aplicaciones futuras en el control y prevención de arbovirus. **Métodos:** Se realizó una revisión integradora retrospectiva de estudios sobre el virus Brejeira, en la que se analizaron las publicaciones nacionales e internacionales publicadas en las bases y plataformas de búsqueda. **Resultados:** Se encontraron un total de 95 artículos publicados. Después de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron 40 artículos para el análisis de texto completo, todos escritos en inglés y la mayoría de los artículos se encontraron en la base de datos Pubmed. Fue posible informar sobre las características biológicas y genómicas del virus de Brejeira (BREV), la distribución de los aislamientos en Brasil, así como los diversos estudios que se están llevando a cabo en relación con la aplicabilidad de los virus específicos de insectos (ISVs) en términos de control biológico de arbovirus, la producción de plataformas de vacunas y otros. **Consideraciones finales:** El BREV, así como otros negevirus, están siendo aislados en Brasil y merecen la atención de la comunidad científica, pues aunque no causen enfermedades en humanos y animales, tienen potencial para uso biotecnológico con utilidad en salud pública.

Palabras clave: Nevevirus, virus Brejeira, arbovirus.

INTRODUÇÃO

Os vírus específicos de insetos (ISVs) infectam naturalmente mosquitos e se replicam em células de mosquito *in vitro*, contudo, em células de vertebrados, não ocorre replicação. Em função do desenvolvimento e melhoria das técnicas de biologia molecular ao longo dos anos, houve um aumento das pesquisas sobre os ISVs, sendo que estes estão cada vez mais despertando o interesse da comunidade científica (BOLLING BG, et al., 2015).

A maioria dos ISVs encontram-se principalmente distribuídas ao longo das seguintes famílias virais: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Mesoniviridae*, *Phenuiviridae*, *Tymoviridae*, *Birnaviridae*, *Nodaviridae*, *Parvoviridae*, *Iridoviridae*, *Permutotetraviridae*, *Iflaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Totiviridae*; e táxon *Negevirus* (VASILAKIS N et al., 2013; VASILAKIS, N e TESH RB, 2015).

O taxon *Negevirus* é constituído por vírus de RNA fita simples de sentido positivo e já foram isolados em várias partes do mundo, incluindo as Américas, Europa, África e Ásia (VASILAKIS N, et al., 2013; AUGUSTE AJ, et al., 2014; CARAPETA S, et al., 2015). Esse táxon é classificado em dois principais clados, designados por *Nelorpivirus* e *Sandewavirus* (KALLIES R, et al., 2014).

O vírus *Brejeira* (BREV) pertence ao táxon *Negevirus* e agrupa-se juntamente a outros representantes do clado *Nelorpivirus*, como o vírus *Piura* (PIUV), o vírus *Negev* (NEGV), o vírus *Ngewotan* (NWTV) e o vírus *Loreto* (LORV). O BREV está subdividido em três subgrupos: subgrupo I (formado por oito isolados de Canaã de Carajás, estado do Pará, Brasil, em 2013), subgrupo II (isolados de Trairão, estado do Pará, Brasil, em 2005) e subgrupo III (isolados na Colômbia, em 2013) (NUNES MRT, et al., 2015; NUNES MRT, et al., 2017; RIBEIRO ACS, et al., 2022). Este vírus foi isolado pela primeira vez no estado do Pará, Brasil, proveniente de áreas ao longo da rodovia BR-163, no ano de 2005 (NUNES MRT, et al., 2015).

A principal diferença entre os ISVs e outro grupo bem conhecido de vírus que também infectam mosquitos e flebotomíneos, os arbovírus, é que estes possuem a capacidade de infectar vertebrados e suas células. Por infectar vertebrados, os arbovírus vêm ocasionando epidemias de doença febril, neurológica ou hemorrágica em seres humanos e animais, sendo considerados como um problema de saúde pública. Como exemplos de

arbovírus com importância médica, pode-se citar o vírus Zika, o vírus Dengue, o vírus Chikungunya, o vírus Febre Amarela, entre outros (CARVALHO VL e LONG MT, 2021).

A aplicação biológica dos ISVs dentro da saúde pública está relacionada principalmente a possibilidade de controle biológico dos arbovírus, podendo os ISVs serem utilizados para reduzir a competência vetorial de mosquitos na transmissão de arbovírus de importância médico-epidemiológica, através de mecanismos tais como a inibição da replicação do arbovírus em questão (BOLLING BG, et al., 2015; BISHOP CPR e ASGARI S, 2019).

Podem também ser utilizados como plataforma de vacinas a partir do uso de várias estratégias, inclusive na engenharia genética para o desenvolvimento de insumos utilizando vírus recombinantes (quimeras ISV + arbovírus), assim como podem ser utilizados no diagnóstico sorológico em testes como o Elisa, por exemplo.

Estudo demonstrou que os ensaios sorológicos que utilizaram as quimeras apresentaram alta sensibilidade, especificidade e também segurança na produção de antígenos (NASAR F, et al., 2012; NASAR F, et al., 2015; ERASMUS JH, et al., 2017; CARVALHO VL e LONG MT, 2021).

Neste âmbito, dada a possível aplicabilidade e a importância desta espécie viral, o presente estudo tem como objetivo dissertar sobre o negevírus brejeira, suas características biológicas, taxonômicas e filogenéticas, bem como sobre sua circulação e possíveis futuras aplicações no controle e prevenção de arbovírus, a partir de artigos científicos publicados entre os anos de 2012 a 2022.

MÉTODOS

Trata-se de uma revisão integrativa retrospectiva de estudos sobre os vírus específicos de insetos, negevírus e o vírus Brejeira, onde foram analisadas publicações nacionais e internacionais indexadas nas seguintes bases e plataformas de busca: Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (Pubmed), Biblioteca virtual de saúde (BVS), Scientific Electronic Library Online (Scielo) e base de dados Latino-Americana de informação bibliográfica em ciências da saúde (LILACS).

Foram selecionados artigos publicados no período de 2012 a 2022, utilizando as palavras chaves: “Brejeira virus”, “Negevirus”, “Negevirus and Insect specific viruses”, “Brejeira virus e Arbovirus”, “Negevirus and Arbovirus”. Posteriormente, os artigos encontrados utilizando as palavras chaves escolhidas foram tabulados em planilhas eletrônicas no software Microsoft Excel, contendo as seguintes informações: palavras chaves, ano da publicação, título da publicação, idioma do texto, meio de publicação e resumo.

Para análise dos artigos pesquisados foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: tratar do assunto pesquisado; estarem disponíveis no idioma português e/ou inglês; estarem disponíveis no formato de trabalhos científicos (artigo científico, dissertação, tese e/ou trabalho de conclusão de curso); e a disponibilidade online do exemplar.

Foram excluídos artigos que não estão relacionados com o tema. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foi realizada a leitura do texto completo dos artigos selecionados.

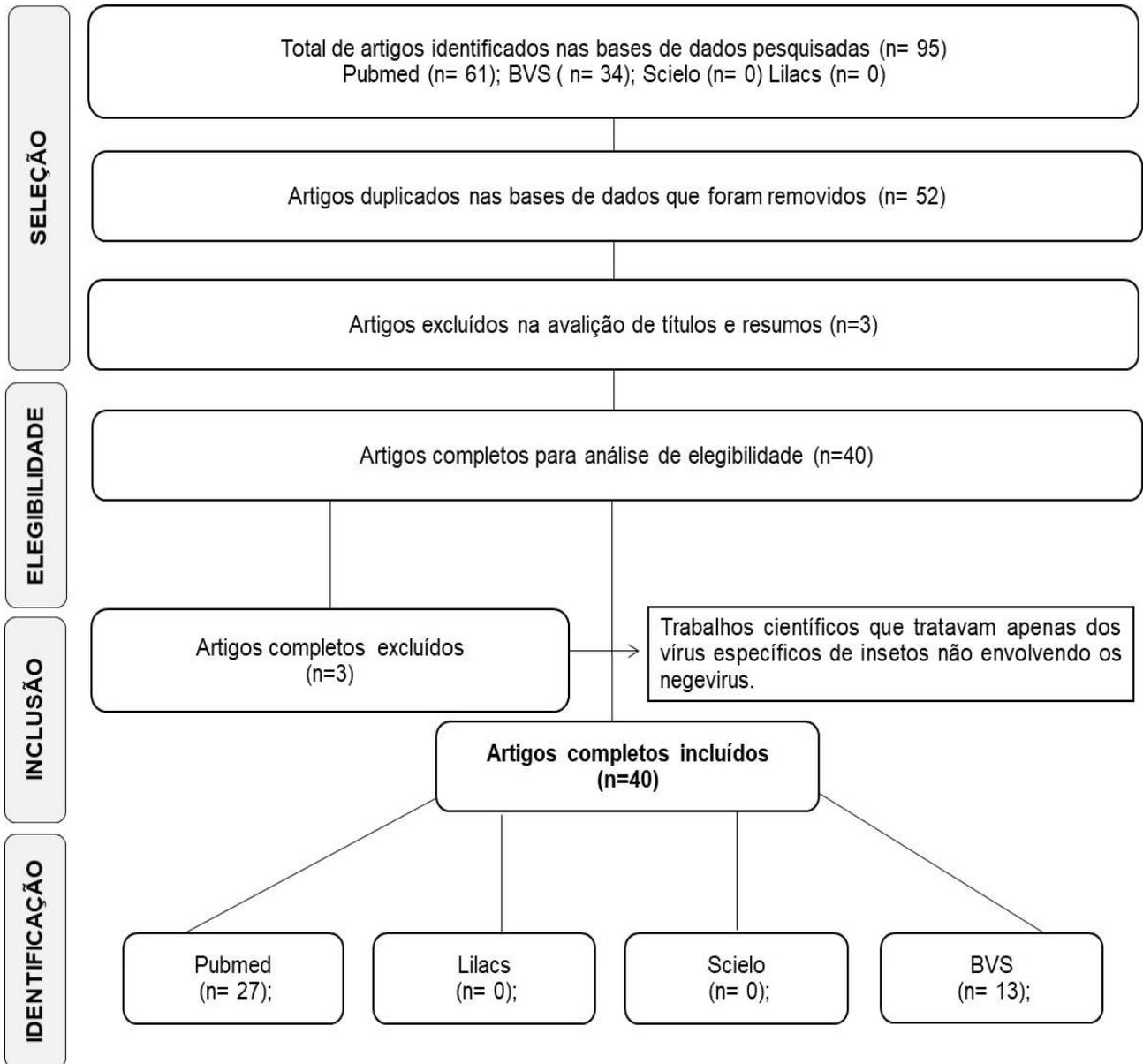
Por se tratar de um trabalho que não envolve experimentação e nem o uso de amostras de humanos não foi necessária a submissão a comitês de ética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base no levantamento bibliográfico realizado, foram encontrados 95 artigos publicados no período de 2012 a 2022.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 40 artigos foram incluídos para análise completa do texto (**Quadro 1**), dentre quais todos foram escritos na língua inglesa e a maior parte dos artigos foram encontrados nas bases de dados PubMed e BVS. O panorama da análise completa dos artigos pode ser visualizado na **figura 1**.

Figura 1 - Fluxograma detalhado sobre os critérios utilizados para a seleção, elegibilidade, inclusão e identificação dos artigos encontrados referente ao período compreendido entre os anos de 2012 e 2022.



Nota: A variável “n” é relacionada ao número de artigos encontrados ao longo das fases de análises após o levantamento bibliográfico.

Fonte: Ribeiro ACS, et al., 2023.

Quadro 1 - Artigos selecionados após o levantamento bibliográfico.

Nº	Ano	Autores	Tipo de estudo	Síntese dos resultados e conclusões
1	2013	Vasilakis N, et al.,	Estudo Experimental	Através das características biológicas de seis novos vírus específicos de insetos (Negev, Ngewotan, Piura, Loreto, Dezidougou e Santana), no qual foi possível identificar a formação de um novo taxon designado Negevirus, onde apresentou uma relação filogenética próxima com os vírus de plantas.
2	2014	Auguste AJ, et al.,	Estudo Experimental	Foi realizado o sequenciamento nucleotídeo de <i>pools</i> de artrópodes hematófagos utilizando a plataforma illumina, onde foi possível obter sequências completas dos vírus Cumuto (CUMV) e do vírus Wallerfield (WALV) e por meio de análises filogenéticas foi demonstrando que os dois vírus fazem parte do taxon Negevirus recém descrito.
3	2014	Gorchakov RV, et al.,	Estudo Experimental	Por meio da metodologia da genética reversa foi possível a criação de um clone de cDNA infeccioso completo da cepa M30957 do vírus Negev (NEGV), no qual permite a elucidação dos aspectos biológicos do novo táxon Negevirus e também a melhoria do entendimento a respeito das suas aplicações biológicas dentro da sociedade.
4	2014	Kallies R, et al.,	Estudo Experimental	Através de <i>pools</i> de artrópodes hematófagos coletados no México e na Costa do Marfim que apresentaram efeito citopático nas células C6/36, foi possível identificar vírus específicos de insetos (ISVs) por meio do sequenciamento nucleotídeo, no qual permitiu também a descrição de um novo vírus para a ciência denominado vírus Goutanap, que apresentou semelhanças filogenéticas com o taxon Negevirus que poderia ser subdividido em dois clados denominados <i>Nelorpivirus</i> e <i>Sandewavirus</i> .
5	2014	Nabeshima T, et al.,	Estudo Experimental	O vírus Tanay (TANAV), isolado de <i>pools</i> de artrópodes hematófagos se relaciona filogeneticamente com vírus pertencentes ao taxon Negevirus.
6	2015	Nasar F, et al.,	Estudo Experimental	O negevirus chamado o vírus Eilat (EILV) induziu a redução da replicação dos arbovirus, através da coinfeção e superinfecção em experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
7	2015	Nunes MR, et al.,	Estudo Experimental	Foi possível identificar o genoma completo de doze vírus isolados no estado do Pará, proveniente de <i>pools</i> de artrópodes hematófagos (<i>Psorophora ferox</i> e <i>Culex sp.</i>), dentre os quais oito isolados, foram identificados com o vírus Brejeira (BREV) e os demais eram semelhantes ao vírus Wallerfield, todos do taxon Negevirus.
8	2015	Vasilakis N e Tesh RB.	Revisão de literatura	Estudos referente aos ISVs tomou uma proporção exponencial com o advento das técnicas de sequenciamento, onde apresenta uma diversidade de famílias virais (<i>Bunyaviridae</i> , <i>Flaviviridae</i> , <i>Mesoniviridae</i> , <i>Reoviridae</i> , <i>Rhabdoviridae</i> , <i>Togaviridae</i> , e o recém-reconhecido táxon Negevirus) no qual o autor explana de uma forma geral cada uma delas e também relata a respeito da evolução genética dos ISVs, como ocorre sua transmissão e as suas aplicações biológicas promissoras.
9	2015	Carapeta S, et.,	Estudo Experimental	Por meio da técnica de biologia molecular foi possível a detecção de Negevirus oriundos de quatro espécies de artrópodes hematófagos (<i>Culex pipiens</i> , <i>Cx. Theileri</i> , <i>Cx. Univittatus</i> e <i>Ochlerotatus caspius</i>), sendo que foi possível identificar dois genomas completos dos vírus <i>Culex univittatus negevirus</i> (CUNV) e <i>Ochlerotatus caspius negevirus</i> (OCNV) no qual produziram efeito citopático em cultura de célula (C6/36).
10	2015	Roy A, et al.,	Estudo Experimental	A abordagem do estudo envolve a análise filogenética dos vírus de plantas como Citrus leprosis virus C (CiLV-C), Citrus leprosis virus N (CiLV-N), Citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) e a sua relação com o taxon Negevirus que ainda precisa ser mais bem esclarecida.
11	2016	Kawakami K, et al.,	Estudo Experimental	O novo negevirus denominado vírus Okushiri (OKV) oriundo de amostras de artrópodes hematófagos coletados no Japão, possui uma partícula viral esféricas com 50-70 nm de diâmetro, seu genoma viral possui 9.704 nucleotídeos e três ORFs e se replica em células C6/36 oriundas de <i>Aedes albopictus</i> .
12	2016	Pauvolid CA, et al.,	Estudo Experimental	Por meio de diversas técnicas laboratoriais de biologia molecular como: metagenômica, RT-PCR e isolamento viral, foi possível o estudo da diversidade virológica que contempla as amostras coletadas na região do pantanal brasileiro, onde resultou em 1.657 mosquitos classificados em 28 espécies, no qual foi possível identificar 12 vírus, dentre os quais 4 cepas eram do vírus Brejeira (BREV).

Nº	Ano	Autores	Tipo de estudo	Síntese dos resultados e conclusões
13	2017	Erasmus JH, et al.,	Experimental	Através das ferramentas da genética reversa foi possível o desenvolvimento de um vírus recombinante contendo estruturas de um alfavirus específico de inseto chamado EILV e proteínas estruturais do vírus Chikungunya (CHIKV), no qual observou-se a produção de anticorpos neutralizantes em células de mosquito e em camundongos o que demonstra o potencial de aplicação biológica dos ISVs na produção de plataforma de vacinas.
14	2017	Erasmus JH e Weaver SC.	Revisão	Com a crescente descoberta dos ISVs por meio dos avanços das técnicas de biologia molecular e da engenharia genética houve a necessidade de conhecer a biologia desses agentes, mesmo porque alguns ISVs possuem uma relação filogenética com vírus que são patogênicos, por isso foi descrito as principais características EILV, iniciando com a sua descoberta, passando pela caracterização da quimera produzida, a antigenicidade, a imunogenicidade, a aplicação no diagnóstico e no desenvolvimento de vacinas.
15	2017	Fujita R, et al.,	Estudo Experimental	Caracterização genética de dois vírus isolados da região de Bustos, onde foi possível identificar que estes agentes faziam parte do novo taxon Negevirus, que apresentavam efeito citopático nas células C6/36 e não apresentavam efeito na célula BHK-21, um dos isolados é uma nova cepa do vírus Negev e o outro, é um novo negevirus designado vírus Bustos, no qual possui três ORFs em sua composição genética.
16	2017	O'Brien CA, et al.,	Estudo Experimental	Por meio da coleta entomológica e da aplicação do sequenciamento de nova geração foi possível identificar uma nova espécie de negevirus, chamado de vírus Castlereia, que se agrupou no clado <i>Nelorpivirus</i> .
17	2017	Nunes MRT, et al.,	Estudo Experimental	Através das sequências de noventa e um novos isolados proveniente de diversos países do mundo como: o Brasil, Peru, Panamá, Nepal, Colômbia e EUA, foi possível realizar a caracterização genética, análises epidemiológicas e evolutivas de todas essas sequências, no qual se agruparam no taxon Negevirus, nos dois grupos que a compõem chamados <i>Nelorpivirus</i> e <i>Sandewavirus</i> , onde possuem uma grande diversidade genética e de hospedeiros, assim como uma relação com os vírus de plantas destacando os gêneros (<i>Cilevirus</i> , <i>Higrevirus</i> e <i>Blunavirus</i>).
18	2018	Wang J, et al.,	Estudo Experimental	Relato do primeiro isolamento do vírus Tanay na China, proveniente de amostras de <i>Culex</i> , no qual causaram efeito citopático (ECP) apenas em células de invertebrados (C6/36) e não causaram ECP em células de mamíferos (BHK-21 e VERO), através da análise das sequências de aminoácidos mais conservado da proteína polimerase, este vírus faz parte do grupo <i>Sandewavirus</i> do taxon Negevirus.
19	2018	Charles J, et al.,	Estudo Experimental	Com uma abordagem utilizando uma metodologia de biologia molecular chamada metagenômica, foi possível realizar o isolamento viral de 37 <i>pools</i> de artrópodes hematófagos, onde apenas um vírus isolado, chamado vírus Uxmal apresentou similaridade genômica com os vírus que compõem o taxon Negevirus.
20	2019	Kondo H, et al.,	Estudo Experimental	Com o avanço das técnicas de biologia molecular principalmente as metodologias de sequenciamento e análise de transcriptomas foi possível elucidar curiosidades acerca da evolução dos ISVs até mesmo no que tange a suas semelhanças com vírus de plantas.
21	2019	Zhao L, et al.,	Estudo Experimental	Relato do primeiro isolamento do ISV, vírus Tanay (TANAV), em amostra oriunda de artrópode hematófago (<i>Anopheles sinensis</i>), proveniente da província de Yunnan na China, no qual é filogeneticamente semelhante as cepas isoladas anteriormente, onde se agrupou no taxon Negevirus, dentro do gênero <i>Sandewavirus</i> , foi observado também que elas se replicam nas culturas de células de <i>Aedes albopictus</i> com deficiência de RNAi (C6/36) e de <i>Aedes aegypti</i> (Aag2), e também foi feito os registros através da microscopia eletrônica da maturação viral com a identificação de proteínas que é um avanço no entendimento a respeito da biologia dos ISVs.
22	2019	Wang, Y, et al.,	Estudo Experimental	Por meio do sequenciamento genético realizado no sequenciador Illumina MiSeq foi possível realizar o isolamento de um novo vírus proveniente de amostras de artrópodes hematófagos da espécie <i>Culex tritaeniorhynchus</i> , chamado de vírus Manglie (MaV) que pertencente ao taxon negevirus, onde após uma análise no programa BLASTn mostrou uma semelhança genética com o vírus Ngewotan.

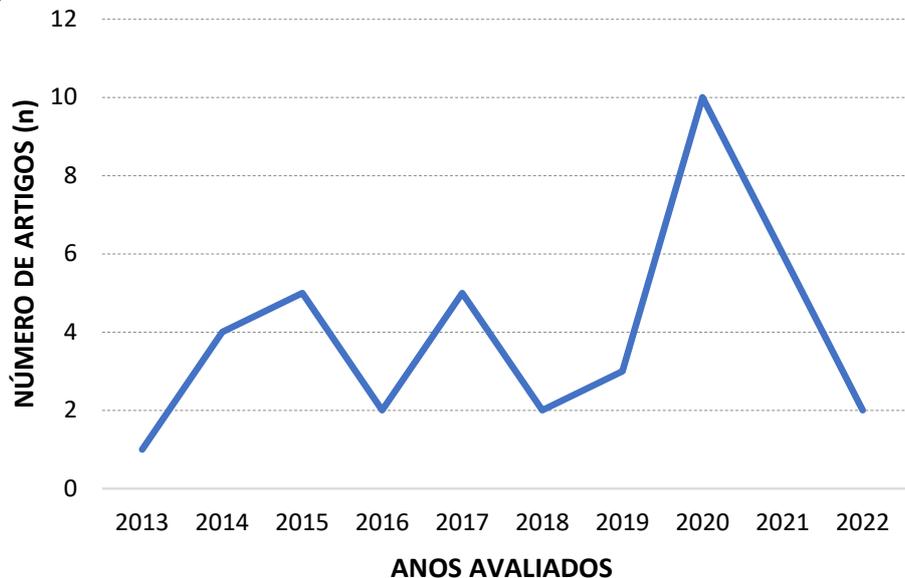
Nº	Ano	Autores	Tipo de estudo	Síntese dos resultados e conclusões
23	2020	Bojko J, et al.	Estudo Experimental	O novo vírus possui um genoma de RNA de cadeia simples, sentido positivo, com uma sequência viral de 13.098 pares de base e foi identificado através da técnica de transcriptoma, possuindo uma similaridade genética com o táxon Negevirus. Relata também a importância de realizar o sequenciamento que abrange outros hospedeiros além dos artrópodes hematófagos e das plantas para compreender melhor a evolução dos negevirus.
24	2020	Suvanto MT, et al.,	Estudo Experimental	O novo negevirus foi oriundo de amostras de mosquitos <i>Aedes vexans</i> , coletados na Finlândia, chamado Mekrijärvi negevirus (MEJNV), onde este possui uma organização típica do genoma dos vírus que fazem parte dos negevirus com 9.740 nucleotídeos, e é composto também por três ORFs, onde apresentou maior similaridade genética com o vírus Ying Kou da China (67,71%).
25	2020	Wu H, et al.,	Estudo Experimental	Foi obtido 600 espécies em 32 ordens de insetos, no qual gerou mais de 1.213 vírus de RNA que foram recapitulados em 40 famílias, dentre essas famílias destacou-se os negevirus. Como pouco se descobriu a respeito da biologia dos negevirus e que a maioria dos artigos publicados se preocupam em divulgar os novos isolamentos virais, este trabalho abrange de uma forma geral os vírus de RNA, no qual propõe como sugestão futura um projeto de viroma envolvendo vários organismos, afim de detalhar melhor como ocorre as infecções por vírus em hospedeiros invertebrados.
26	2020	Lu G, et al.,	Estudo Experimental	Os dois novos negevirus chamados Nelorpivirus dungfly1 (NVD1) e Sandewavirus dungfly1 (SVD1), são provenientes de amostras coletadas de artrópode não hematófago na região do Ártico, no qual estão associados a vírus de plantas da família <i>Kitaviridae</i> , esses resultados contribuem para uma melhor compreensão da distribuição geográfica e da diversidade de hospedeiros que abrange os negevirus.
27	2020	Bishop C, et al.,	Estudo Experimental	A bactéria Wolbachia é um mecanismo de controle vetorial utilizado para controlar a transmissão dos arbovírus, nesse sentido pouco se sabe ainda a respeito da relação dessa bactéria com os ISVs.
28	2020	Lenz O, et al.,	Estudo Experimental	O novo vírus foi detectado por meio do sequenciamento de nova geração, com relação filogenética com os Negevirus e também associado com vírus de pulgões, chamado provisoriamente como <i>Fragaria vesca</i> -associado ao vírus 1 (FVaV-1).
29	2020	Silva FR, et al.,	Estudo Experimental	Deteção da diversidade viral de amostras coletadas de artrópodes hematófagos oriundos do Estado de Mato Grosso e do Centro-Oeste do Brasil, no qual foi detectado arbovírus como: Ilhéus, Dengue, Mayaro, Vírus da Encefalite Equina, Febre Amarela, Oropouche, Zika e Chikungunya e dentre os quais, foi detectado também, os ISVs e Negevirus. Ressaltando assim, a ampla diversidade dos ISVs e dos arbovírus que infectam também <i>culicídeos</i> machos.
30	2020	Colmant AMG, et al.,	Estudo Experimental	Isolamento de um novo vírus proveniente de amostras de artrópodes hematófagos do gênero <i>Culex sp</i> chamado provisoriamente de vírus Badu (BADUV), onde apresentou replicação em células de invertebrados (<i>Culex</i> e <i>Aedes</i>) em contrapartida, não apresentou replicação em células de vertebrados, reafirmando que se trata de um ISVs.
31	2020	Ramos GPL, et al.,	Estudo Experimental	O estudo compreende uma abrangência geral sobre doenças que afetam plantas em especial o maracujá, que através de metodologias de biologia molecular detectou que além dos pertencentes ao gênero <i>Cilevirus</i> , outros vírus pertencentes a família <i>Kitaviridae</i> e ao novo táxon Negevirus podem causar doenças em plantas e que precisam ser bem mais esclarecidos.
32	2020	Kondo H, et al.,	Estudo Experimental	Descoberta de vírus novos para a ciência utilizando uma abordagem metatranscriptômica, no qual foi possível obter sequências proveniente de pulgões que principalmente a cepa nege/kitavírus está relacionada a vírus que infectam plantas e artrópodes, demonstrando assim a diversidade biológica dos ISVs e que certamente necessitam ser mais bem estudados e compreendidos.
33	2021	Meki IK, et al.,	Estudo Experimental	Os vírus GmmlV e GmmNegeV, possuem um genoma contendo 9685 nucleotídeos e 9685 nucleotídeos, respectivamente, no qual nota-se que o segundo codifica duas ORFs e pertence ao novo táxon Negevirus. Em relação a aplicação biológica desses vírus, para o controle da proliferação de moscas que causam problemas econômicos e doenças em humanos ainda precisa ser bem mais esclarecido.

Nº	Ano	Autores	Tipo de estudo	Síntese dos resultados e conclusões
34	2021	Carvalho VL e Long MT.	Revisão	Revisão dos estudos a respeito das atualizações das famílias virais que comportam os ISVs como: <i>Flaviviridae</i> , <i>Togaviridae</i> , <i>Peribunyaviridae</i> , <i>Phenuiviridae</i> , <i>Tymoviridae</i> e <i>Taxon negevirus</i> . Além de relatar como ocorre a transmissão dos ISVs (via transovariana), a evolução desses vírus, a interação dos ISVs com os arbovírus e a aplicação biotecnológica dos ISVs, que compreende a parte mais importante e inovadora para a ciência que é a utilização desses vírus como uma ferramenta alternativa para controle biológico, o desenvolvimento de vacinas e plataformas de diagnóstico para arbovírus.
35	2021	White AV, et al.,	Estudo Experimental	Estudo que compreende a coinfeção viral com a utilização do ISV, vírus Espírito Santo (ESV) e o arbovírus, o vírus Dengue (DENV) que é um grande problema em saúde pública, no qual foi observado que houve uma redução da replicação do DENV em células de mosquito quando coinfectada com ESV e além disso quando ocorreu uma superinfecção do ESV em relação ao DENV resultou na inibição da replicação do DENV e na disseminação dos artrópodes hematófagos (<i>A. Aegypti</i>), reduzindo assim a competência do vetor.
36	2021	Patterson EI, et al.,	Estudo Experimental	Relata a capacidade dos Negevírus, tais como o vírus Negev (NEGV) de inibir a replicação dos arbovírus como o vírus Chikungunya (CHIKV) e vírus Encefalite Equina Oriental (EEEV) em células de mosquitos coinfectadas, mostrando, assim, a relevância de estudos que visam elucidar a relação dos ISVs com os arbovírus, principalmente, no que tange as espécies do novo táxon ainda pouco estudadas.
37	2021	Carvalho VL e Long MT.	Revisão	Levantamento bibliográfico acerca da aplicação biológica dos ISVs na produção de vacina para os arbovírus, no qual oferecem plataformas únicas para expressão de proteínas por meio de criação de quimeras utilizando ISVs e arbovírus mesmo porque estão já possuem resultados promissores na literatura o que desperta o interesse da comunidade científica.
38	2021	Langat SK, et al.,	Estudo Experimental	Por meio de análise de metagenômica houve a descoberta de um viroma de RNA diverso entre mosquitos quenianos que inclui vírus previamente desconhecidos para ciência e vírus que fazem parte do novo táxon negevirus.
39	2022	Truong N, et al.,	Estudo Experimental	Com o sequenciamento de nova geração foi possível obter os viromas de artrópodes hematófagos (<i>Ochlerotatus</i>) coletados na Finlândia, no qual foi possível recuperar 514 sequências virais de RNA polimerase (RdRp), de 159 espécies de vírus, pertencentes a 25 famílias virais dentre elas o taxon Negevirus, nos quais 147 são novos para ciência, assim estudos como este são de extrema importância porque apresenta a diversidade dos vírus associados a mosquitos na região da Finlândia.
40	2022	Ribeiro ACS, et al.,	Estudo Experimental	Este trabalho demonstra que através da vigilância entomológica realizada pelo Instituto Evandro Chagas foi possível realizar o isolamento viral de sete amostras que apresentaram resultados negativos para <i>flavivirus</i> , <i>alfavirus</i> e <i>bunyavirus</i> na RT-qPCR, mas apresentaram efeito citopático em células de invertebrados (C6/36), assim se identificou uma variedade de ISVs, sendo a maioria delas pertencente ao táxon Negevirus: os vírus Brejeira, Negev, Córdoba e Wallerfield, incluindo um novo vírus para a ciência, provisoriamente denominado vírus Feitosa, demonstrando assim, a importância da realização de trabalhos como este, afim de entender a diversidade dos negevirus na região amazônica.

Fonte: Ribeiro ACS, et al., 2023.

De acordo com os resultados de pesquisa obtidos na faixa temporal analisada, foi possível observar que o número maior de artigos publicados referente às palavras chaves pesquisadas foi no ano de 2020, com dez artigos publicados, seguido dos anos de 2015 e 2017, com cinco artigos e 2014 com quatro artigos publicados (**Figura 2**).

Figura 2 - Distribuição do número de artigos encontrados por meio do levantamento bibliográfico, abrangendo as palavras chaves “Brejeira vírus”, “Negevirus”, “Negevirus and Insect specific viruses”, “Brejeira vírus e Arbovirus”, “Negevirus and Arbovirus”.



Fonte: Ribeiro ACS, et al., 2023.

Dentre os artigos pesquisados apenas quatro deles trazem informações mais detalhadas sobre o vírus Brejeira listados no **quadro 2**, que demonstra a escassez de trabalhos científicos sobre o BREV e o pouco conhecimento sobre as características biológica assim como sua aplicabilidade dentro da ciência e da saúde pública, no qual merece ser bem mais estudado.

Quadro 2 – Artigos encontrados após o levantamento bibliográfico acerca do BREV.

Ano	Autores	Síntese do conteúdo dos artigos
2015	Nunes MRT, et al.,	Anuncio do sequenciamento de oito espécies semelhante ao vírus Piura que receberam o nome de vírus Brejeira.
2016	Corrêa AP, et al.,	Quatro isolados do BREV proveniente da região de Corumbá no Pantanal (MS) oriunda do <i>pools</i> de artropodes <i>Culex sp.</i>
2017	Nunes MRT, et al.,	Caracterização genética dos Negevirus, incluindo 11 cepas do BREV isoladas no Pará e na Colômbia.
2022	Ribeiro ACS, et al.,	Isolamento viral de 6 cepas do vírus Brejeira e caracterização da sua relação filogenética com outros negevirus.

Fonte: Ribeiro ACS, et al., 2023.

Características biológicas, filogenéticas e taxonômicas dos negevirus, incluindo o BREV

O táxon *Negevirus* é constituído de uma diversidade de espécies virais que apresentam um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo com caudas poli (A) (VASILAKIS N, et al., 2013; ROY A, et al., 2015; CARAPETA S, et al., 2015; NUNES MRT, et al., 2017). Por meio de análises filogenéticas, foi possível observar que os seis primeiros vírus identificados, vírus Negev (NEGV), vírus Ngewotan (NWTV), vírus Piura (PIUV), vírus Loreto (LORV), vírus Dezidougou (DEZV) e vírus Santana (SANV), formaram um novo táxon, denominado Negevirus, que se relaciona com vírus de plantas dos gêneros *Higrevirus*, *Blunevirus* e *Cilevirus*. Muito pouco se conhece sobre o relacionamento genético entre os ISVs do táxon Negevirus e os vírus de plantas, sendo possível que um grupo tenha originado evolutivamente o outro. Foi proposto por Kallies e colaboradores (2014) uma subdivisão dos negevirus em dois gêneros: *Nelorpivirus* e *Sandewavirus* (O'BRIEN

CA, et al., 2017; CHARLES J, et al., 2018; KONDO H, et al., 2020; GONZÁLEZ PLR, et al., 2020; FERREIRA RS, et al., 2020). Os negevírus não demonstram causar efeito citopático em células de vertebrados, mas causam em células provenientes de invertebrados, como o clone C6/36; análises feitas por microscopia eletrônica demonstraram as características do efeito citopático (ECP) causados pelos negevírus, que se caracterizam pela expansão dos espaços perinucleares, cheios de vesículas ou microtúbulos, sendo que estes ainda formam arranjos paracristalinos, empurrando o citoplasma para a periferia celular (VASILAKIS N et al., 2013; AUGUSTE AJ, et al., 2014).

O BREV possui um genoma viral de RNA fita simples de sentido positivo e consiste em uma partícula esférica de tamanho de 45-55 nm de diâmetro (VASILAKIS N et al., 2013; NUNES MRT, et al., 2017). O genoma viral do BREV é composto por três cadeias de leitura abertas (ORFs) (NUNES MRT, et al., 2015; NUNES MRT, et al., 2017) flanqueadas por regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3', com cada ORF sendo separada por regiões intergênicas curtas. A ORF1 (grande) foi encontrada possuindo de 233 a 7339 nt e codificando a proteína de polimerase viral. A ORF2 (média) e ORF3 (pequena) codificam glicoproteínas e proteínas de membrana, respectivamente (VASILAKIS N et al., 2013; NUNES MRT, et al., 2017). A ORF1 contém domínios de proteína putativos que correspondem a proteínas não estruturais. Além disso, foram identificados, também, quatro domínios funcionais: domínio de metiltransferase; um domínio de metiltransferase de RNA ribossomal; um domínio de helicase e um domínio RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) (RIBEIRO ACS, et al., 2022).

Estudo realizado por Ribeiro ACS, et al. (2022) demonstra a relação filogenética dos Negevirus referente ao domínio da polimerase da ORF 1, incluindo isolados na região de Canaã dos Carajás ou de Curionópolis no estado do Pará, Brasil. Na árvore filogenética publicada, os negevírus isolados foram agrupados dentro dos principais grupos descritos anteriormente para estes vírus: *Nelorpivirus* (BREV, NEGV, CDBV) e *Sandewavirus* (WALV) e vírus Feitosa (FEITV). Em relação ao gênero *Nelorpivirus*, destaque-se que as cepas do BREV, onde formaram um grupo relacionados com as cepas brasileiras do BREV isoladas no Pará e na região de Corumbá no Mato Grosso do Sul, sendo que o PIUV está mais relacionado filogeneticamente com o BREV. As cepas referentes ao NEGV relacionaram-se mais ao NWTV, no qual, este gênero possui uma ancestralidade comum com alguns vírus de plantas, como o vírus Citrus leprosis group C (CiLV-C), vírus Hibiscus green spot (HGSV) e vírus Blueberry necrotic ring blotch (BNRB). Em relação aos negevírus pertencentes ao gênero *Sandewavirus*, as cepas WALV formaram um clado com as demais cepas americanas (Brasil, Panamá, Trinidad e Tobago, EUA e Colômbia), sendo o clado WALV mais intimamente relacionado com o do GANV. Por sua vez, o FEITV, um novo vírus para ciência descrito no estudo, relacionou-se mais com o vírus Biratnagar (BIRV) e vírus Bustos (BUSV) (RIBEIRO ACS, et al., 2022).

Neste mesmo estudo, foi demonstrado que as cepas do BREV disponíveis no genbank se subdividiram em três subagrupamentos: subgrupo I (formado por oito isolados de Canaã de Carajás, Brasil, 2013), subgrupo II (isolados de Trairão, Brasil, 2005) e subgrupo III (isolados na Colômbia, 2013) (NUNES MRT, et al., 2017; RIBEIRO ACS, et al., 2022). A filogenia do BREV evidenciou a formação de três cladogramas, sendo o grupo I correspondente aos isolados do Brasil dos anos de 2013, 2014 e 2015; o grupo II, composto por isolados do Brasil dos anos de 2005 e 2010, incluindo o primeiro isolado no Brasil; e o grupo III, formado pelos isolados da Colômbia do ano de 2013. Todas as seis cepas do BREV isoladas (Canaã dos Carajás e Curionópolis), em relação às três ORFs concatenadas, mostraram ser mais relacionadas geneticamente com as cepas de 2013 também do município de Canaã dos Carajás, enquanto as demais amostras brasileiras dos anos de 2005 e 2010 (grupo II) mostraram-se mais distantes geneticamente do grupo I, com distâncias genéticas variando entre 10,5% e 11,4%.

Circulação dos negevírus e BREV

O novo táxon chamado Negevirus surgiu a partir da descoberta de seis novos ISVs, oriundos de artrópodes hematófagos e flebotomíneos coletados em várias regiões do mundo como: Brasil, Peru, Estados Unidos, Florida, Loreto, Texas, Costa do Marfim, Colômbia, Cordoba, Israel, Indonésia e China e estão cada vez mais sendo descobertos devido ao avanço no sequenciamento e da metagenômica (**Quadro 3**) (NUNES MRT, et al., 2017; LANGAT KS, et al., 2021).

Quadro 3 - Vírus específicos de inseto do táxon Negevirus, de acordo com o gênero e a referência.

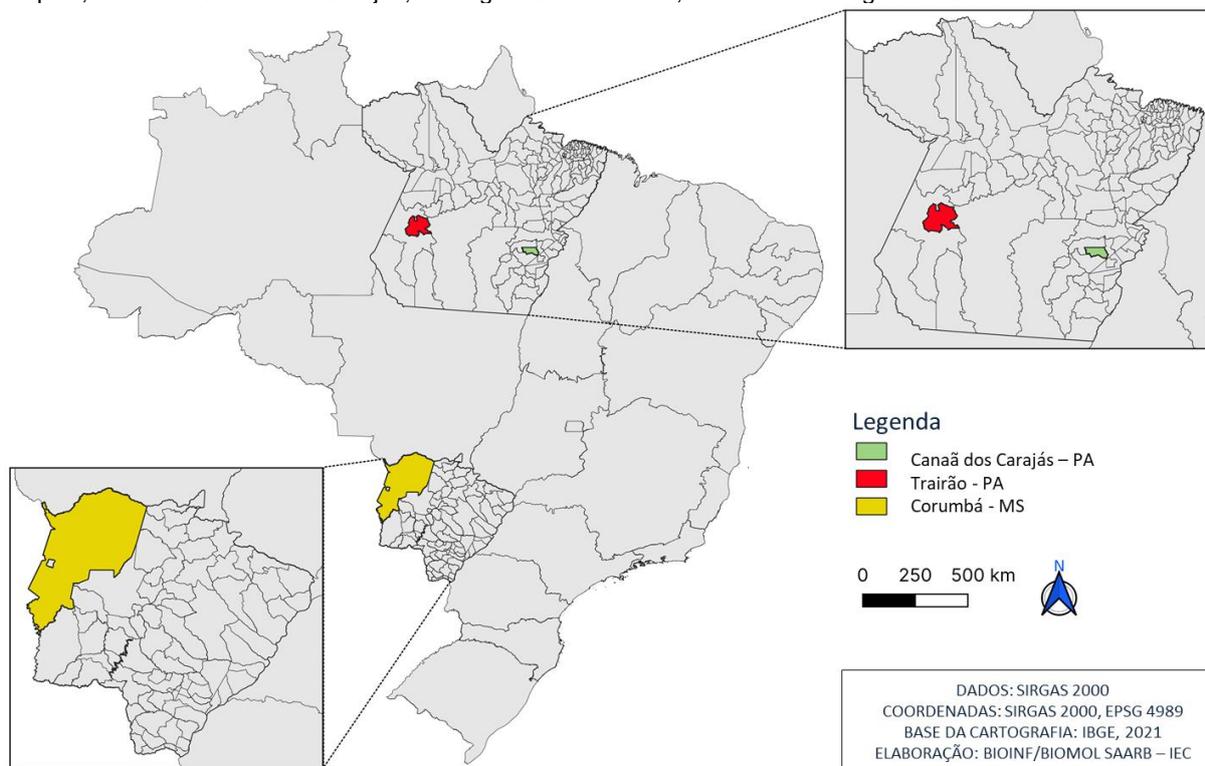
Vírus	Gênero	Referências
Negev virus (NEGV)	<i>Nelorpivirus</i>	Vasilakis N, et al. (2013)
Ngewotan virus (NWTV)	<i>Nelorpivirus</i>	Vasilakis N, et al. (2013)
Piura virus (PIUV)	<i>Nelorpivirus</i>	Vasilakis N, et al. (2013)
Loreto virus (LORV)	<i>Nelorpivirus</i>	Vasilakis N, et al. (2013)
Brejeira virus (BREV)	<i>Nelorpivirus</i>	Nunes MRT, et al. (2015)
Cordoba virus (CDBV)	<i>Nelorpivirus</i>	Nunes MRT, et al. (2017)
San Bernardo virus (SBDV)	<i>Nelorpivirus</i>	Nunes MRT, et al. (2017)
Big Cypress virus (BCPV)	<i>Nelorpivirus</i>	Nunes MRT, et al. (2017)
Castlerea virus (CsV)	<i>Nelorpivirus</i>	O'Brien CA, et al. (2017)
Okushiri virus (OKV)	<i>Nelorpivirus</i>	Kawakami K, et al. (2016)
Manglie virus (MaV)	<i>Nelorpivirus</i>	Wang Y, et al. (2019)
Ochlerotatus caspius negevirus (OCNV)	<i>Nelorpivirus</i>	Carapeta S, et al. (2015)
Culex univittatus negevirus (CUNV)	<i>Nelorpivirus</i>	Carapeta S, et al. (2015)
Mekrijärvi negevirus (MEJNV)	<i>Nelorpivirus</i>	Suvanto MT, et al. (2020)
Nelorpivirus dungfly1 (NVD1)	<i>Nelorpivirus</i>	Lu G, et al. (2020)
Santana virus (SANV)	<i>Sandewavirus</i>	Vasilakis N, et al. (2013)
Dezidougou virus (DEZV)	<i>Sandewavirus</i>	Vasilakis N, et al. (2013)
Goutanap virus (GANV)	<i>Sandewavirus</i>	Kallies R, et al. (2014)
Wallerfield virus (WALV)	<i>Sandewavirus</i>	Auguste AJ, et al. (2014)
Tanay virus (TANAV)	<i>Sandewavirus</i>	Nabeshima T, et al. (2014)
Uxmal virus (UVMV)	<i>Sandewavirus</i>	Charles J, et al. (2018)
Biratnagar virus (BIRV)	<i>Sandewavirus</i>	Nunes MRT, et al. (2017)
Bustos virus (BUSV)	<i>Sandewavirus</i>	Fujita R, et al. (2017)
Sandewavirus dungfly1 (SVD1)	<i>Sandewavirus</i>	Lu G, et al. (2020)
Feitosa virus (FEITV)	<i>Sandewavirus</i>	Ribeiro ACS, et al. (2022)

Fonte: Ribeiro ACS, et al., 2023.

O BREV foi isolado pela primeira vez, no Brasil, no estado do Pará (ao longo da rodovia BR-163), no ano de 2005 (NUNES MRT, et al., 2015). Posteriormente, nos anos 2010, 2013, 2014 e 2015, foi isolado novamente no Brasil, no município de Canaã dos Carajás, no estado do Pará e na Colômbia (2013). Em 2016, foi isolado na região do Pantanal, mais especificamente na região de Corumbá-MS (CORRÊA AP, et al., 2016; NUNES MRT, et al., 2017; RIBEIRO ACS, et al., 2022).

Esses achados demonstram que o BREV está distribuído em algumas regiões brasileiras, destacando a região Norte e Centro Oeste, sendo a maioria dos isolados proveniente de artrópodes hematófagos do gênero *Culex* sp. e *Psorophora ferox*, como pode ser observado na **figura 3**.

Figura 3 - Mapa do Brasil representando as regiões que já tiveram o registro de isolamento do BREV através das sequências depositadas no NCBI, onde se destaca a região Norte, mais especificadamente o estado do Pará, e dois municípios, Trairão e Canaã dos Carajás; e a região Centro Oeste, destacando a região de Corumbá.



Fonte: Ribeiro ACS, et al., 2023.

O BREV está sendo cada vez mais detectado por meio de técnicas de isolamento viral e biologia molecular através dos estudos realizados pelo Instituto Evandro Chagas, nas áreas que sofrem ação antrópica na Amazônia, mais especificadamente no sudeste do estado do Pará, demonstrando assim, a importância de realizar investigações não apenas sobre arbovírus, mas também para os ISVs, principalmente nas regiões da Amazônia Brasileira (NUNES MRT, et al., 2015; NUNES MRT, et al., 2017; RIBEIRO ACS, et al., 2022).

Possíveis usos biotecnológicos dos ISVs, incluindo os negevírus

Diversos estudos estão realizando experimentos de coinfeções entre arbovírus de importância em saúde pública e ISVs e tem demonstrado o potencial dos ISVs como possível futura ferramenta de controle dos arbovírus. Como exemplo, para o arbovírus DENV e o vírus Zika (ZIKV), ambos apresentaram redução do título de disseminação em mosquitos da espécie *Ae. aegypti* com infecção prévia por vírus Agente de Fusão Celular (CFAV) (BAIDALIUK A, et al., 2019). Por outro lado, pesquisas realizadas com o vírus Palm Creek (PCV), um flavivírus específico de inseto, infectando mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* desafiados com os arbovírus ZIKV e vírus Chikungunya (CHIKV), mostraram que para ambos os arbovírus, a infecção por PCV não teve efeito nas taxas de infecção e transmissão, concluindo assim, que seu potencial de controle biológico é limitado (KOH C, et al., 2021), divergente do que foi encontrado por (SCHULTZ MJ, et al., 2018).

O ISV Nhumirim (NHUV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, ao ser submetido a condição de coinfeção com o vírus West Nile (WNV) reduziu em 10.000 vezes os títulos virais do WNV, sendo observada também a redução de 40% da transmissibilidade do WNV em colônias de mosquito *Ae. albopictus* infectados com NHUV, portanto, este ISV pode servir como possível ferramenta de controle biológico da transmissibilidade eficiente do WNV (GOENAGA S, et al., 2015; GÖERTZ GP, et al., 2019). Outra potencial utilização dos ISVs é o seu uso como plataformas de vacinas para arbovírus. Através das técnicas da genética reversa, os ISVs podem ser utilizados como backbones para inserção de proteína de arbovírus, e consequente formação de vírus quimérico, que mantém sua incapacidade de se replicar em vertebrados, mas que induzem anticorpos

neutralizantes e respostas celulares, resultando assim, em uma estratégia promissora para prevenir a emergência ou reduzir a morbimortalidade causada pelos arbovírus (GORCHAKOV RV, et al., 2014; ERASMUS JH, et al., 2017; ERASMUS JH e WEAVER SC, 2017). Por essas e outras vantagens, é tão importante a realização de pesquisas envolvendo ISVs para melhor compreensão da sua biologia e consequentemente a sua aplicação (PETERS HJ, et al., 2019; MEKI IK, et al., 2021).

Em 2021, foi publicado o primeiro estudo de interferência realizado com agentes virais do táxon Negevírus, no qual o NEGV e PIUV mostraram-se capazes de inibir a replicação de arbovírus pertencentes aos gênero *Alphavirus* (CHIKV e EEEV) em células de mosquitos coinfectadas. Neste mesmo estudo foram utilizadas metodologias provenientes da engenharia genética como a estratégia de expressão de proteínas, o que permitiu a modificação genética do vírus NEGV para expressar a proteína (GFP) e fragmentos do anticorpo do CHIKV (scFv), no qual foi possível observar que o negevírus geneticamente modificado reduziu ainda mais a replicação do arbovírus *in vitro*, quando comparado com o NEGV selvagem, porém requer mais estudos *in vivo* utilizando artrópodes hematófagos para a avaliação da sobrevivência do negevírus geneticamente modificado e sua aplicação no controle da competência vetorial de mosquitos frente a transmissão dos arbovírus de importância em saúde pública (PATTERSON EI, et al., 2021).

Outro uso potencial dos ISVs é no diagnóstico laboratorial dos arbovírus. Estudos realizados por Erasmus JH e Weaver SC (2017) mostraram que quimeras produzidas utilizando a maquinaria de replicação do EILV (backbone) e as proteínas estruturais do CHIKV, possuem a capacidade de gerar respostas imunológicas e se ligar a anticorpos. O mais interessante dessa proposta é que se tem na mesma partícula viral as propriedades restritas ao hospedeiro do ISV e as características antigênicas do arbovírus. Assim, para avaliar a capacidade da quimera (EILV/CHIKV) de detectar anticorpos CHIKV IgM, foi padronizada a metodologia sorológica de ELISA, utilizando um painel de soros de pacientes infectados com CHIKV, sendo a nova metodologia comparada com ensaio disponível comercialmente recomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC); os resultados mostraram uma grande sensibilidade e especificidade da nova metodologia usando quimeras, superando até mesmo os kits comerciais (ERASMUS JH e WEAVER SC, 2017; ERASMUS JH, 2017).

A grande vantagem da utilização de quimeras para a produção e padronizações de métodos diagnóstico é a segurança na manipulação, o baixo custo e um curto período de produção, no qual não precisa necessariamente de etapas que encarecem o processo como: a concentração, a purificação e a inativação dos antígenos, por outro lado, os antígenos produzidos pelo método tradicional requerem uma estrutura de biocontenção para as culturas utilizadas e a realização de técnicas que fazem com que a produção se torne mais custosa e demorada (ERASMUS JH e WEAVER, SC, 2017; ERASMUS JH, 2017). Portanto, essa ferramenta aparenta ser bem promissora no futuro próximo, que permite a utilização do ISV como uma alternativa na geração de produtos comerciais para imediata utilização pelos laboratórios clínicos durante epidemias e até mesmo elucidar melhor o diagnóstico sorológico dos arbovírus que é um grande desafio para a saúde pública.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão demonstrou que o BREV, assim como outros negevírus estão sendo isolados no Brasil e merecem a atenção da comunidade científica, pois embora não causem doenças em seres humanos e animais, possuem potencial de uso biotecnológico com utilidade dentro da saúde pública, contudo para tal se faz necessária a realização de outros estudos, a fim de, elucidar melhor a biologia desses agentes e sua relação com os arbovírus.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Agradecemos ao Programa de Pós-graduação em Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) que possibilitou a realização da pesquisa, bem como a Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

1. AUGUSTE AJ, et al. Characterization of a novel Negevirus and a novel Bunyavirus isolated from *Culex* (Culex) declarator mosquitoes in Trinidad. *The Journal of general virology*, 2014; 95(2): 481–485.
2. BAIDALIUK A, et al. Cell-fusing agent virus reduces arbovirus dissemination in *Aedes aegypti* mosquitoes in vivo. *Journal of Virology*, 2019; 93(18): e00705-19.
3. BISHOP CPR e ASGARI S. Effect of *Wolbachia* wAlbB on a positive-sense RNA negev-like virus: a novel virus persistently infecting *Aedes albopictus* mosquitoes and cells. *Journal of General Virology*, 2020; 101(2): 216-225.
4. BOJKO J, et al. A novel positive single-stranded RNA virus from the crustacean parasite, *Probopyrinella latreuticola* (Peracarida: Isopoda: Bopyridae). *Journal of invertebrate pathology*, 2020; 177: 107494.
5. BOLLING BG, et al. Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses*, 2015; 7(9): 4911-4928.
6. CARAPETA S, et al. Negevirus found in multiple species of mosquitoes from southern Portugal: isolation, genetic diversity, and replication in insect cell culture. *Virology*, 2015; 483(1): 318-328.
7. CARVALHO VL e LONG MT. Insect-specific viruses: an overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. *Virology*, 2021; 557(1): 34-43.
8. CARVALHO VL e LONG MT. Perspectives on New Vaccines against Arboviruses Using Insect-Specific Viruses as Platforms, *vacines*, 2021; 9(1): 263.
9. CHARLES J et al. Detection of novel and recognized RNA viruses in mosquitoes from the Yucatan Peninsula of Mexico using metagenomics and characterization of their in vitro host ranges. *The Journal of General Virology*, 2018, 99(12): 1729.
10. COLMANT AMG, et al. Novel monoclonal antibodies against Australian strains of negevirus and insights into virus structure, replication and host-restriction. *Journal of General Virology*, 2020; 101(4): 440-452.
11. CORRÊA AP et al. Novel viruses isolated from mosquitoes in Pantanal, Brazil. *Genome announcements*, 2016; 4(6): e01195-16.
12. ERASMUS JH e WEAVER, SC. Biotechnological applications of an insect-specific alphavirus. *DNA and Cell Biology*, 2017; 36(12): 1045-1049.
13. ERASMUS JH, et al. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nature medicine*, 2017; 23(2): 192-199.
14. FERREIRA RDS, et al. Insect-specific viruses and arboviruses in adult male culicids from Midwestern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020; (85): 104561.
15. FUJITA R, et al. Bustos virus, a new member of the negevirus group isolated from a *Mansonia* mosquito in the Philippines. *Archives of virology*, 2017; 162(1): 79-88.
16. GOENAGA S, et al. Potential for co-infection of a mosquito-specific flavivirus, Nhumirim virus, to block West Nile virus transmission in mosquitoes. *Viruses*, 2015; 7(11): 5801-5812.
17. GÖERTZ GP, et al. Mosquito small RNA responses to West Nile and insect-specific virus infections in *Aedes* and *Culex* mosquito cells. *Viruses*, 2019; 11(3): 271.
18. GONZÁLEZ PLR, et al. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 5'-end of the RNA2 segment across Cileviruses. *Frontiers in microbiology*, 2020; (11): 206.
19. GORCHAKOV RV et al. Generation of an infectious Negev virus cDNA clone. *The Journal of general virology*, 2014; 95(9): 2071.
20. KALLIES R, et al. Genetic characterization of goutanap virus, a novel virus related to negevirus, cileviruses and higrviruses. *Viruses*, 2014; 6(11): 4346-4357.
21. KAWAKAMI K, et al. Characterization of a novel negevirus isolated from *Aedes* larvae collected in a subarctic region of Japan. *Archives of virology*, 2016; (161): 801-809.
22. KOH C, et al. Interactions of the Insect-Specific Palm Creek Virus with Zika and Chikungunya Viruses in *Aedes* Mosquitoes. *Microorganisms*, 2021; 9(8): 1652.
23. KONDO H, et al. A novel insect-infecting virga/nege-like virus group and its pervasive endogenization into insect genomes. *Virus research*, 2019; (262): 37-47.
24. KONDO H, et al. Virome analysis of aphid populations that infest the barley field: the discovery of two novel groups of Nege/Kita-like viruses and other novel RNA viruses. *Frontiers in Microbiology*, 2020; 11: 509.
25. LANGAT SK, et al. Profiling of RNA viruses in biting midges (Ceratopogonidae) and related diptera from Kenya using metagenomics and metabarcoding analysis. *Mosphere*, 2021; 6 (5): e00551-21.
26. LENZ O, et al. *Fragaria vesca*-associated virus 1: a new virus related to negevirus. *Archives of Virology*, 2020; (165): 1249-1252.
27. LU G, et al. Discovery of two novel negevirus in a dungfly collected from the Arctic. *Viruses*, 2020; 12(7): 169.
28. MEKI IK, et al. Characterization and tissue tropism of newly identified iflavirus and negevirus in *Glossina morsitans morsitans* tsetse flies. *Viruses*, 2021; 13(12): 2472.
29. NABESHIMA T, et al. Tanay virus, a new species of virus isolated from mosquitoes in the Philippines. *Journal of General Virology*, 2014; 95(6): 1390-1395.
30. NASAR F, et al. Eilat virus induces both homologous and heterologous interference. *Virology*. 2015; (484): 51-58.
31. NASAR F, et al. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; (109): 14622–14627.
32. NUNES MRT, et al. Emergence of new insect-restrictive viruses in the Amazon region. *Genome Announcements*, 2015; 3(2): e00131-15.

33. NUNES MRT, et al. Genetic characterization, molecular epidemiology, and phylogenetic relationships of insect-specific viruses in the taxon Negevirus. *Virology*, 2017; 504(1): 152-167.
34. O'BRIEN CA, et al. Discovery and characterization of Castlerea virus, a new species of Negevirus isolated in Australia. *Evolutionary Bioinformatics*, 2017; 13(1): 1-14.
35. PATTERSON EI, et al. Negeviruses reduce replication of alphaviruses during coinfection. *Journal of Virology*, 2021; 95(14): e00433-21.
36. PAUVOLID-CORRÊA A, et al. Novel viruses isolated from mosquitoes in Pantanal, Brazil. *Genome announcements*, 2016; 4(6): e01195-16.
37. PETERS HJ, et al. Discovery and characterisation of a new insect-specific bunyavirus from *Culex* mosquitoes captured in northern Australia. *Virology*, 2016; 489(1): 269-281.
38. RAMOS-GONZÁLEZ PL, et al. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 5'-end of the RNA2 segment across Cileviruses. *Frontiers in microbiology*, 2020; 11: 206.
39. RIBEIRO ACS, et al. Negeviruses isolated from mosquitoes in the Brazilian Amazon. *Virology J*, 2022; 19(1): 1-11.
40. ROY A, et al. Role bending: Complex relationships between viruses, hosts, and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. *Phytopathology*, 2015; 105(7): 1013-1025.
41. SCHULTZ MJ, et al. Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in *Aedes* mosquito cells. *Virology*, 2018; 518(1): 406-413.
42. SILVA FR, et al. Insect-specific viruses and arboviruses in adult male culicids from Midwestern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020; 85: 104561.
43. STOLLAR V e THOMAS VL. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, 1975; (64): 367-377.
44. SUVANTO MT, et al. A novel negevirus isolated from *Aedes vexans* mosquitoes in Finland. *Archives of virology*, 2020; 165(1): 2989-2992.
45. TRUONG N, et al. Characterisation of the RNA Virome of Nine Ochlerotatus Species in Finland. *Viruses*, 2022; 14(7): 1489.
46. VASILAKIS N et al. Mesoniviruses are mosquito-specific viruses with extensive geographic distribution and host range. *Virology journal*, 2014; 11(1): 1-12.
47. VASILAKIS N, et al. Negevirus: a proposed new taxon of insect-specific viruses with wide geographic distribution. *Journal of virology*, 2013; 87(5): 2475-2488.
48. VASILAKIS N e TESH RB. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Curr Opin Virol.*, 2015; (15): 69-74.
49. WAN S, et al. Generation and preliminary characterization of vertebrate-specific replication-defective Zika virus. *Virology*, 2021; 552(1): 73-82.
50. WANG J et al. A new Tanay virus isolated from mosquitoes in Guangxi, China. *Archives of virology*, 2018; 163(11): 3177-3180.
51. WANG Y, et al. Complete genome sequence of a novel negevirus isolated from *Culex tritaeniorhynchus* in China. *Archives of virology*, 2019; 164: 907-911.
52. WHITE AV, et al. Mosquito-infecting virus Espirito Santo virus inhibits replication and spread of dengue virus. *Journal of Medical Virology*, 2021; 93(6): 3362-3373.
53. WU H, et al. Abundant and diverse RNA viruses in insects revealed by RNA-Seq analysis: ecological and evolutionary implications. *Msystems*, 2020; 5(4): e00039-20.
54. ZHAO L, et al. Characterization of a novel Tanay virus isolated from *Anopheles sinensis* mosquitoes in Yunnan, China. *Frontiers in Microbiology*, 2019; (10): 1963.