



UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

TESE DE DOUTORADO

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES DE MOSQUITOS
(DIPTERA: CULICIDAE) E DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS CIRCULANTES
EM REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA, ESTADO DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL**

SÉRGIO LISBOA MACHADO

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES DE MOSQUITOS
(DIPTERA: CULICIDAE) E DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS CIRCULANTES
EM REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA, ESTADO DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL**

SÉRGIO LISBOA MACHADO

*Sob a Orientação do Professor
Jerônimo Augusto Fonseca Alencar*

Dissertação submetida como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Ciências no
Curso de Pós-Graduação em Biologia
Animal, Área de Concentração em
Biodiversidade.

Seropédica, RJ
Outubro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L149d Lisboa Machado, Sergio, 1965-
 Diversidade e estrutura de comunidades de
 mosquitos (Diptera: Culicidae) e detecção de arbovírus
 circulantes em remanescentes de Mata Atlântica, estado
 do Rio de Janeiro, Brasil / Sergio Lisboa Machado. -
 Rio de Janeiro, 2024.
 153 f.

 Orientador: Jerônimo Augusto Fonseca Alencar.
 Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
 de Janeiro, Doutorado/Biologia Animal, 2024.

 1. Culicidae . 2. Mata Atlântica. 3. Área de
 Preservação . 4. Vetores . 5. Arbovírus . I. Augusto
 Fonseca Alencar, Jerônimo , 1967-, orient. II
 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
 Doutorado/Biologia Animal III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TERMO Nº 940 / 2024 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.059256/2024-31

Seropédica-RJ, 30 de outubro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

SERGIO LISBOA MACHADO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor(a) em Ciências, no Curso de pós-graduação em **BIOLOGIA ANIMAL**,
área de concentração em **BIODIVERSIDADE ANIMAL**

TESE APROVADA EM 22/10/2024

(Assinado digitalmente em 31/10/2024 14:15)

ILDEMAR FERREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 387289

(Assinado digitalmente em 31/10/2024 09:47)

JERONIMO AUGUSTO FONSECA ALENCAR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 005.893.247-05

(Assinado digitalmente em 31/10/2024 09:46)

CECILIA FERREIRA DE MELLO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 108.944.867-80

(Assinado digitalmente em 25/11/2024 14:24)

RONALDO FIGUEIRÓ PORTELLA PEREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 052.493.707-99

(Assinado digitalmente em 30/10/2024 16:51)

NATALY ARAUJO DE SOUZA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 607.160.377-34

(Assinado digitalmente em 31/10/2024 07:43)

SHAYENNE OLSSON FREITAS SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 058.427.717-21

(Assinado digitalmente em 31/10/2024 20:59)

VALÉRIA CID MAIA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 871.764.087-34

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **940**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **30/10/2024** e o
código de verificação: **4214fc636e**

Dedico a

Meus pais Raimundo Diogo Machado e Licia Lisboa Machado (*in memoriam*), sem eles não teria as bases para chegar onde estou;
A minha esposa Helena Keiko Toma, pelo apoio, incentivo e investimento em minha carreira;
A minha irmã Thais Lisboa Machado, que sabe dos desafios que tive e contribuiu com suas críticas construtivas.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Jeronimo Alencar, que tem sido mais que um orientador e sim um grande amigo e incentivador, mesmo ciente de minhas deficiências, sempre me incentivando, ajudando no desenvolvimento da tese e em minha carreira, posso dizer que muito deste material tem a participação e os ensinamentos dele.

À Dra. Shayenne Olsson Freitas Silva, muito me ensinou no início a fazer a identificação dos culicídeos e ajudou na parte estatística e elaboração das tabelas, com ótimas sugestões para as publicações do grupo.

À Dra. Cecília Ferreira de Mello, pela elaboração dos mapas e organização das tabelas com os dados dos trabalhos de campo, que são parte fundamental deste estudo.

Ao Dr. Paulo José Leite, pela companhia e ajuda no trabalho de campo, mostrando desenvoltura, conhecimento e paciência de Chinês.

À Dra. Amanda Queiros Bastos, por passar informações sobre o programa de Doutorado em Biologia Animal na UFRRJ e pela colaboração no desenvolvimento de artigos.

Aos demais colegas do Laboratório de Diptera, Rayane, Nathalia, Paulo, Roger, e demais que não consigo lembrar o nome, afinal são tantos que de forma direta ou indireta ajudaram sempre em alguma coisa, que minha memória não me permite lembrar o nome de todos.

À minha irmã Thais Lisboa Machado que me apoiou em minhas aventuras e me emprestava o carro que usamos para ir ao trabalho de campo.

À Farmacêutica Ana Lucia Carvalho da Silva, que me ajudou imensamente segurando as pontas dos cursos de Pós-graduação *Lato sensu* que coordeno na Faculdade de Farmácia. Sem ela, minha dedicação à tese seria bem menor.

Ao meu amigo Raphael Cursino que me deu um carro para usar no trabalho de campo, mas que nunca chegou a rodar por problemas alheios a nossa vontade.

Ao meu amigo Eduardo Calderazzo, que conserta o carro que nunca foi ao trabalho de campo.

À Dálete Cássia Vieira Alves, que carinhosamente apelidei de “meu robozinho” por ter adquirido expertise nas extrações dos ácidos nucléicos de insetos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, por ter me aceitar no programa e servir como elo de novos contatos profissionais.

Aos Professores das disciplinas que cursei, que dedicaram seu tempo para ampliar meus conhecimentos, com destaque as Profas. Ana Claudia dos Santos Brasil e Aparecida Alves do Nascimento, pelo prazer que demonstram ao ensinar.

À Profa. Roseli Vigio Ribeiro que segurou as pontas no curso de graduação quando tinha que me ausentar para os trabalhos de pesquisa.

Aos proprietários e equipe das áreas investigadas, sem a permissão deles e a ajuda oferecendo informações sobre geografia do terreno, fauna e flora local, esse trabalho não teria sido possível.

Ao IOC/Fiocruz e órgãos de fomento a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. “This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

RESUMO

MACHADO, Sergio Lisboa. **Diversidade e estrutura de comunidades de mosquitos (Diptera:Culicidae) e detecção de arbovírus circulantes em remanescentes de Mata Atlântica, estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2024. 151p Dissertação (Doutorado em Biologia Animal, Biodiversidade Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A Mata Atlântica é um bioma altamente biodiverso que vem sendo afetado por ações antrópicas, como o desmatamento, as quais contribuem para o desequilíbrio ecológico, afetando as comunidades de culicídeos. Nesse estudo, realizado entre 2018 e 2023, analisamos as variáveis abióticas bem como a abundância, diversidade, dominância e equabilidade dos Culicidae e, simultaneamente detectamos a circulação de arbovírus em diferentes áreas da Mata Atlântica nos municípios de Casimiro de Abreu (Fazenda Três Montes), Silva Jardim (Sítio Terra Boa), Município de Nova Iguaçu (Sítio Boa Esperança) e Cachoeiras de Macacu (Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu), estado do Rio de Janeiro. Foram usadas diversas armadilhas, ovitrampas para a coleta dos ovos de mosquitos, concha entomológica, sugadores plásticos e pipeta de polietileno para a coleta das larvas e pupas, e armadilhas luminosas do tipo Shannon, CDC, e Técnica de Atração por Humano Protegido (TAHP) e capturadores de Castro para a coleta dos espécimes adultos. A pesquisa de arbovírus foi realizada através da extração de RNA viral. Destacamos que na Fazenda Três Montes, em Casimiro de Abreu, *Haemagogus leucocelaenus* foi o taxon dominante. A estação do verão foi a mais favorável à abundância das espécies *Hg. leucocelaenus*, *Aedes albopictus* e *Aedes terrens*. Na Fazenda Três Irmãos, no Município de Silva Jardim, identificamos que as espécies *Hg. leucocelaenus* e *Ae. terrens* demonstraram uma correlação positiva significativa com as variáveis abióticas de temperatura e umidade relativa do ar. *Haemagogus leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* apresentaram predominância de fêmeas, enquanto o gênero *Aedes* teve número de machos superior ou comparável ao de fêmeas. No Sítio Terra Boa, no município de Silva Jardim identificamos que a fitotelma bromélia apresentou a maior diversidade de insetos enquanto na folha caída foi a menor. O habitat larval em internodo de bambu apresentou a maior diversidade enquanto que as folhas caídas apresentaram a maior equabilidade. As espécies *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* demonstraram uma correlação positiva e estatisticamente significativa com os níveis pluviométricos. A espécie mais abundante foi *Hg. leucocelaenus*, nas alturas de 2 m e 6 m em relação ao solo. Em Cachoeira de Macacu, na Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu (REGUA) identificamos que as armadilhas com os resultados de coleta mais similares foram a TAHP e a Shannon enquanto que a CDC foi a mais divergente. Constatamos que a espécie com maior dominância foi a *Coquillettidia fasciolata* que está associada a áreas degradadas e presença antrópica. Na trilha verde da REGUA, encontramos a presença das espécies *Hg. leucocelaenus*, *Ae. argyrothorax* e *Sa. chloropterus* que são de importância médica. No estudo de detecção dos arbovírus, foram encontrados 6 pools positivos para os vírus da febre amarela e zika. Concluímos que *Hg. leucocelaenus* foi a espécie com maior dominância na maioria das áreas estudadas. Evidenciamos que os fatores abióticos como maior temperatura, umidade relativa do ar e índice de precipitação são fatores de contribuem para a multiplicação dos culicídeos e, sendo um fator a ser observado quando se trata do controle e prevenção à dispersão de patógenos.

Palavras-Chave: Culicidae, Mata Atlântica, CDC, TAHP, Shannon, vetores, arbovírus, PCR, sequenciamento.

ABSTRACT

MACHADO, Sergio Lisboa. **Diversity and structure of mosquito communities (Diptera: Culicidae) and detection of circulating arboviruses in remnants of Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, Brazil.** 2024. 151p Dissertation (Doctorate in Animal Biology, Animal Biodiversity). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

The Atlantic Forest is a highly biodiverse biome that has been affected by anthropogenic actions, such as deforestation, which contribute to ecological imbalance, affecting the communities of Culicidae. In this study, carried out between 2018 and 2023, we analyzed the abiotic variables as well as the abundance, diversity, dominance and evenness of Culicidae and, simultaneously, we detected the circulation of arboviruses in different areas of the Atlantic Forest in the municipalities of Casimiro de Abreu (Fazenda Três Montes), Silva Jardim (Sítio Terra Boa), Nova Iguaçu (Sítio Boa Esperança) and Cachoeiras de Macacu (Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu), state of Rio de Janeiro. Several traps were used, including ovitramps for collecting mosquito eggs, entomological shells, plastic suckers and polyethylene pipettes for collecting larvae and pupae, and Shannon, CDC, and Protected Human Attraction Technique (TAHP) light traps, as well as Castro traps for collecting adult specimens. Arbovirus research was performed by extracting viral RNA. It is worth noting that on the Três Montes farm in Casimiro de Abreu, *Haemagogus leucocelaenus* was the dominant taxon. The summer season was the most favorable for the abundance of the species *Hg. leucocelaenus*, *Aedes albopictus* and *Aedes terrens*. On the Três Irmãos farm in the municipality of Silva Jardim, we identified that the species *Hg. leucocelaenus* and *Ae. terrens* demonstrated a significant positive correlation with the abiotic variables of temperature and relative humidity. *Haemagogus leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* showed a predominance of females, while the *Aedes* genus had a higher or comparable number of males than females. At Sítio Terra Boa, in the municipality of Silva Jardim, we identified that the bromeliad phytotelma presented the greatest diversity of insects, while the fallen leaves had the lowest. The bamboo larval habitat presented the greatest diversity, while the fallen leaves showed the greatest equitability. The species *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* demonstrated a positive and statistically significant correlation with rainfall levels. The most abundant species was *Hg. leucocelaenus*, at heights of 2 m and 6 m above the ground. In Cachoeira de Macacu, at Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu (REGUA), we identified that the traps with the most similar collection results were the TAHP and Shannon, while the CDC was the most divergent. We found that the species with the greatest dominance was *Coquillettidia fasciolata*, which is associated with degraded areas and anthropic presence. On the green trail, at REGUA, we found the presence of the species *Hg. leucocelaenus*, *Ae. argyrothorax* and *Sabates chloropterus*, which are of medical importance. In the arbovirus detection study, 6 positive pools were found for yellow fever and zika viruses. In conclusion *Hg. leucocelaenus* was the species with the greatest dominance in most of the areas studied. We showed that abiotic factors such as higher temperature, relative humidity and precipitation index are factors that contribute to the multiplication of culicids and are a factor to be observed when it comes to controlling and preventing the spread of pathogens.

Keywords: Culicidae, Atlantic Forest, CDC, TAHP, Shannon, vectors, arboviruses, PCR, sequencing.

LISTA DE ABREVIASÕES E SÍMBOLOS

APPs	Áreas de preservação permanente
°C	Graus Celsius
CDC	Armadilha Center for Disease Control para insetos adultos
CO ₂	Dióxido de Carbono
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D	Dominância
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue
EEEV	Vírus Encefalite Equina Oriental
FA	Febre amarela
FAPERJ	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FAS	Febre amarela silvestre
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GLT	Golden Lion Tamarins, Mico Leão Dourado
GPS	Global Positioning System
MAYV	Vírus Mayaro
MM	Mosquito Magnet®
MMLV	Vírus da Leucoencefalite de Mitose de Montana
NCBI Blast	National Center of Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool
NHP	Non Human Primate
NKV	No Known Vector
H	Diversidade
ICMBio	Instituto Chico Mendes da Biodiversidade e Conservação
ICTV	International Committee on Taxonomy of Virus
IDL	Índice de Densidade de Larvas
IDO	Índice de Densidade de Ovos
ILHV	Vírus Ilhéus
IML	Índice de Massa de Larvas
IMO	Índice de Massa de Ovos
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPL	Índice de Positividade de Larvas
IPO	Índice de Positividade de Ovitrampa
J	Equabilidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONNV	Vírus O'nyong-nyong
OROV	Vírus Oropouche
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PNH	Primata Não Humano
ppm	Partes Por Milhão
REGUA	Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu
RNA	Ácido Ribonucléico
ROCV	Vírus Rócio
SESV	Southern Elephant Seal Virus
SIG	Sistema de Informações Geográficas
SINV	Vírus Sindbis
SISBIO	Sistema de Informação e Autorização de Biodiversidade

SLEV	Encefalite de Saint Louis
SARS	Síndrome Respiratória Aguda
TAHP	Técnica de Atração por Humano Protegido
UCs	Unidades de Conservação
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEEV	Vírus da encefalite equina venezuelana
VFA	Vírus da febre amarela
WEEV	Encefalite equina ocidental
WNV	Vírus da febre do oeste do Nilo ou febre ocidental do Nilo
ZKV	Vírus zika

Países/Estados /Municípios

BR – Brasil
 RJ – Rio de Janeiro
 MG – Minas Gerais
 ES – Espírito Santo

Softwares utilizados

ArcGIS PRO
 Geneious R10 (Biomatters, v.10.2.6)

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida dos culicídeos. Adaptado de 5 https://eu.biogents.com/o-ciclo-de-vida-dos-mosquitos/?lang=pt-br .	5
Figura 2	A - Larva de um anofelino, sem o sifão respiratório. Crédito da imagem a Steffen Dietzel, B - Larva do culicídeo <i>Toxorhynchites speciosus</i> com o sifão respiratório. Crédito da imagem a Acrocynus.	7
Figura 3	Vista panorâmica da Fazenda Três Montes, município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro. Em 23/02/2023	32
Figura 4	Vista panorâmica da Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. Em 14/06/2023	32
Figura 5	Mapa apresentando a região que engloba a Reserva Biológica do Tinguá. O ponto amarelo indica a localização aproximada do Sítio Boa Esperança.	33
Figura 6	Vista panorâmica da área de amostragem do Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. Em 13/06/2023.	34
Figura 7	Vista panorâmica da área de amostragem e localização das armadilhas CDC e Shannon instaladas na Trilha Amarela da REGUA, Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro. Em 30/06/2024.	34
Figura 8	Vista panorâmica da área de amostragem e localização das armadilhas CDC, Shannon e Ovitrampas instaladas na Trilha Verde da REGUA, Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro. Em 13/06/2023.	35
Figura 9	A - Armadilha de oviposição ovitrampa B - Palhetas de Eucatex.	36
Figura 10	Método de coleta de ovos com o uso de armadilha ovitrampa e dinâmica de eclosão dos ovos em estufa tipo B.O.D em laboratório.	36
Figura 11	A - Ponto amostral (Trilha verde) coleta de imaturos em raízes tabulares na Reserva Ecológica do Guapiaçu (REGUA), Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro. 11 B – Coleta em bambu (Trilha verde) 11 C –Ponto amostral (Trilha amarela) coleta em lagoa utilizando concha entomológica em lago na Reserva Ecológica do Guapiaçu (REGUA), Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro.	37
Figura 12	A – Instalação de armadilha luminosa de CDC B - Armadilha Shannon para captura de mosquitos. C – Armadilha de Castro e Gaiola para transporte dos mosquitos.	38
Figura 13	Índice de Similaridade de Bray-Curtis. Estações climáticas do ano da área de coleta de Fazenda Três Montes, Município de Casimiro	44

de Abreu, estado do Rio de Janeiro, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.	
Figura 14	Índices Entomológicos da área amostral da Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021. 46
Figura 15	Correspondência Canônica. Variáveis climáticas e espécies de mosquitos vetores de arbovírus na área de coleta da Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021. 47
Figura 16	Localização das armadilhas de ovitrampas de 1 a 8 na Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. 49
Figura 17	Matrix Plot. Espécies de mosquitos vetores por ovitrampa (numeradas de 1 a 15), na área de coleta de Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021. 50
Figura 18	Porcentagens de fêmeas e machos de espécies de mosquitos com importância médica. Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021. 51
Figura 19	Variação das proporções de fêmeas e machos de espécies de mosquitos com importância médica. Fazenda Três Montes, Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, no período de agosto de 2018 a janeiro de 2021. 52
Figura 20	Porcentagem cumulativa total de eclosões de cada espécie de mosquitos por imersão (A). Porcentagem de eclosões de fêmeas (B) e machos (C). Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, agosto de 2018 a janeiro de 2021. 53
Figura 21	Média e desvio padrão do número de ovos eclodidos e não eclodidos coletados na Fazenda Três Irmãos, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, no período de março 2020 a outubro de 2022. 54
Figura 22	Número de ovos coletados no período seco e chuvoso (A). Número de ovos eclodidos e não eclodidos no período chuvoso (B) Número de ovos eclodidos e não no período seco (C). Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, março de 2020 a outubro de 2022. 55
Figura 23	Tendência do número de ovos coletados por mês, no período de março 2020 a outubro de 2022 na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. 57
Figura 24	Regressão linear entre o número de ovos e coletados e as variáveis ambientais temperatura (A) e pluviosidade (B). Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022. 58

Figura 25	Correlação entre as espécies de mosquitos com importância médica (<i>Hg. leucocelaenus</i> , <i>Hg. janthinomys</i> e <i>Ae. terrens</i>) e as variáveis ambientais temperatura (°C), pluviosidade (mm) e umidade (%). Quanto mais intenso o azul, maior correlação positiva, destaque cinza para dado significativo. Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.	59
Figura 26	Índice de similaridade de Bray-Curtis entre os meses de coleta, no Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio Janeiro, período de setembro de 2022 a março de 2023.	62
Figura 27	Abundâncias de mosquitos e índices ecológicos, Diversidade (H), Dominância (D) e Equabilidade (J) por criadouro, na área de coleta Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, período de setembro de 2022 a março de 2023.	63
Figura 28	Índice de similaridade Morisita entre as armadilhas TAHP, CDC e Shannon usadas na Trilha Amarela, Reserva Ecológica do Guapiaçu Município de Cachoeiras de Macacu, período de março de 2023 a fevereiro de 2024	67
Figura 29	Índice de similaridade Morisita entre as armadilhas TAHP, CDC e Shannon usadas na Trilha Verde; Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.	69
Figura 30	Variação da abundância de mosquitos por mês de coleta, Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.	70
Figura 31	Localização dos <i>pools</i> de mosquitos encontrados positivos para febre amarela (FA) e zika vírus (VZIK) e a identificação numérica das armadilhas, coletados nos municípios de Nova Iguaçu e de Casimiro de Abreu no período de setembro de 2018 a março de 2019.	75
Figura 32	Dados da temperatura no Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, nos meses de outubro e novembro de 2022.	79
Figura 33	Dados pluviométricos do Município de Silva Jardim , estado do Rio de Janeiro, nos meses de outubro e novembro de 2022.	80
Figura 34	Dados pluviométricos e de temperatura do Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, no mês de março de 2023.	80
Figura 35	Dados de temperatura média em 2023 no Rio de Janeiro.	82
Figura 36	Dados de incidência solar em 2023 no Rio de Janeiro.	83
Figura 37	Dados de umidade relativa do ar em 2023 no Rio de Janeiro.	83
Figura 38	Dados de nebulosidade em 2023 no Rio de Janeiro.	84

Figura 39	A - Armadilha Mosquito Magnet®, B – Detalhe do recipiente de captura.	86
Figura 40	Armadilha CDC + CO ₂ + Lurex®.	86

INDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Arbovírus causadores de doenças em humanos circulantes pelo continente americano.	16
Quadro 2	Áreas de amostragem nos diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro com sua geolocalização.	29
Quadro 3	Índices ecológicos dos mosquitos capturados na Trilha Amarela por tipo de armadilha.	65
Quadro 4	Abundância, riqueza, dominância, diversidade e equabilidade de adultos de mosquitos capturados por armadilhas do tipo TAHP, CDC e Shannon no ponto amostral Trilha Verde, Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu – Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.	68
Quadro 5	Abundância, riqueza, dominância, diversidade e equabilidade de espécies de mosquitos, em dois pontos de amostragem, período de março de 2023 a fevereiro de 2024, Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil.	73
Tabela 1	Índices Entomológicos (IPO, IDO, IMO, IPL, IDL e IML) da área amostral Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021, Rio de Janeiro, Brasil.	45
Tabela 2	Ovos de mosquitos que eclodiram por estação climática na primeira imersão e em imersões subsequentes, na área amostral da Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.	48
Tabela 3	Porcentagem de ovos de mosquitos que eclodiram por estação climática na primeira e nas imersões subsequentes na Fazenda Três Montes entre agosto de 2018 a janeiro de 2021.	48
Tabela 4	Relação da distribuição das espécies de mosquitos por altura, na Fazenda Três Irmãos, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, período de março 2020 a outubro de 2022.	56
Tabela 5	Abundância e índices de dominância (H), diversidade de Shannon e equabilidade (J) de mosquitos coletados por mês no Sítio Terra	61

Boa, Município de Silva Jardim, estado Rio de Janeiro, período de setembro de 2022 a março de 2023.

Tabela 6	Espécies de mosquitos coletados e por categoria de abundância no Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, no período de setembro de 2022 a março de 2023.	64
Tabela 7	Abundância relativa de adultos de mosquitos capturados por armadilhas do tipo TAHP, CDC e Shannon na Trilha Amarela, área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu – Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.	66
Tabela 8	Abundância relativa de adultos de mosquitos capturados por armadilhas do tipo TAHP, CDC e Shannon na área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu – Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.	68
Tabela 9	Abundância relativa de adultos de mosquitos capturados por mês na área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu – Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.	71
Tabela 10	Detecção de vírus da febre amarela e zika em <i>Ae. albopictus</i> e <i>Hg. leucocelaenus</i> em florestas primárias, com base nos <i>pools</i> de coleta no estado do Rio de Janeiro, Brasil.	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Família Culicidae	4
1.2	Ciclo de vida dos culicídeos	5
1.3	Ecobiologia dos culicídeos	8
1.4	Interação dos culicídeos com fragmentos de Mata Atlântica	10
1.5	Arbovírus	13
1.5.1	Principais vírus de interesse circulantes nas Américas	17
1.5.1.1	Família <i>Togaviridae</i> , Gênero <i>Alphavirus</i>	17
1.5.1.2	Vírus Chikungunya (CHIKV)	17
1.5.1.3	Vírus Mayaro (MAYV)	18
1.5.1.4	Vírus Encefalite Equina Oriental - Eastern equine encephalitis vírus (EEEV)	18
1.5.1.5	Encefalite Equina Ocidental - Western equine encephalitis virus (WEEV)	18
1.5.1.6	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana - Venezuelan equine encephalitis vírus (VEEV)	19
1.5.1.7	Vírus Sindbis (SINV)	19
1.5.2	Família <i>Flaviviridae</i>	20
1.5.2.1	Vírus da Dengue (DENV)	21
1.5.2.2	Vírus zika (ZKV)	21
1.5.2.3	Vírus da febre amarela – Yellow Fever (YF)	22
1.5.2.4	Encefalite de Saint Louis (SLEV)	22
1.5.2.5	Vírus da Febre do Oeste do Nilo ou Febre Ocidental do Nilo (WNV)	23
1.5.2.6	Vírus Rócio (ROCV)	24
1.5.2.7	Vírus Ilhéus (ILHV)	24
1.5.3	Família <i>Bunyaviridae</i>	24
1.5.3.1	Vírus Oropouche (OROV)	25
1.5.3.2	Vírus da Encefalite da Califórnia, Vírus Jamestown Canyon e Vírus da Lebre Snowshoe	25
2.0	Objetivo Principal	26

2.1	Objetivos Específicos	26
3.0	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Declaração de ética	28
3.2	Etapas executadas no período de estudo visando o alcance dos objetivos	28
3.3	Áreas de estudo	28
3.4	Amostragem de mosquitos	35
3.4.1	Coleta de ovos	35
3.4.2	Coleta de larvas e pupas	37
3.4.3	Captura dos espécimes adultos	37
3.4.4	Identificação dos espécimes de mosquitos	38
3.4.5	Cálculo dos índices entomológicos e ecológicos e análises estatísticas	39
3.5	Detecção de Arbovírus em mosquitos	40
4	RESULTADOS	43
4.1	Distribuição, abundância e o efeito de múltiplas imersões de ovos de mosquitos em remanescente de Mata Atlântica, Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro (objetivos 1 e 2).	43
4.1.1	Sazonalidade das espécies de mosquitos com importância médica entre agosto de 2018 a janeiro de 2021 na Fazenda Três Montes	43
4.1.2	Correlação das variáveis climáticas temperatura, umidade e precipitação com as espécies de mosquitos <i>Hg. leucocelaenus</i> , <i>Hg. janthinomys</i> , <i>Aedes albopictus</i> e <i>Aedes terrens</i> na Fazenda Três Montes.	46
4.1.3	Eclosão de larvas de mosquitos na primeira imersão de ovos em comparação com imersões posteriores ao longo das estações climáticas do ano.	47
4.1.4	Espécies de mosquitos com importância médica por armadilha de ovitrampa na Fazenda Três Montes, município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro entre agosto de 2018 a janeiro de 2021.	48
4.1.5	Proporção de fêmeas e machos por espécie de mosquitos <i>Hg. leucocelaenus</i> , <i>Hg. janthinomys</i> , <i>Aedes albopictus</i> e <i>Aedes terrens</i> na Fazenda Três Montes, município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro entre agosto de 2018 a janeiro de 2021.	50

4.2	Resultados (objetivo 3) - Distribuição das espécies de mosquitos em diferentes alturas, tendência do número de ovos ao longo dos meses, influência das variáveis ambientais na abundância de ovos na área da Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro.	54
4.2.1	Eclosão de ovos de mosquitos nas ovitrampas da Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.	54
4.2.2	Distribuição das espécies de mosquitos presentes nas ovitrampas instaladas em diferentes alturas na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.	56
4.2.3	Tendência do número de ovos de mosquitos ao longo dos meses de coleta na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.	56
4.2.4	Influência das variáveis ambientais na abundância de ovos de mosquitos na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.	57
4.2.5	Correlação das variáveis ambientais com espécies de mosquitos importância médica na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.	59
4.3	Resultados (objetivo 4) - Avaliação da composição faunística de imaturos de mosquitos quanto à diversidade, abundância, dominância e similaridade na área do sítio Terra Boa, município de Silva Jardim de setembro de 2022 a março de 2023.	59
4.4	Resultados (objetivo 5) - Avaliação da fauna de mosquitos quanto à abundância, riqueza, dominância, diversidade e equabilidade na área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro de março de 2023 a fevereiro de 2024.	65
4.4.1	Índices ecológicos de mosquitos adultos dos gêneros <i>Aedes</i> , <i>Aedeomyia</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Coquilltidia</i> , <i>Culex</i> , <i>Mansonia</i> , <i>Psorophora</i> e <i>Uranotaenia</i> encontrados na Trilha Amarela entre março de 2023 a fevereiro de 2024.	65
4.4.2	Índices ecológicos de mosquitos adultos <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> , <i>Culex</i> , <i>Haemagogus</i> , <i>Limatus</i> , <i>Psorophora</i> , <i>Rhynchotaenia</i> , <i>Sabettus</i> , <i>Trichoprosopon</i> e <i>Wyeomyia</i> encontrados na Trilha Verde entre março de 2023 a fevereiro de 2024.	67
4.5	Resultados (objetivo 6) - Infecção natural por transmissão vertical do vírus zika em mosquitos silvestres <i>Aedes albopictus</i> e <i>Haemagogus leucocelaenus</i> , estado do Rio de Janeiro, Brasil entre setembro de 2018 a março de 2019.	74

5	DISCUSSÃO	76
5.1	Discussão (objetivos 1 e 2) - Resultados obtidos na Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro.	76
5.2	Discussão (objetivo 3) - Resultados da Fazenda Três Irmãos, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro.	77
5.3	Discussão (objetivo 4) Aspectos ecológicos de imaturos (Diptera: Culicidae) em remanescente de Mata Atlântica, Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro.	79
5.4	Discussão (objetivo 5) - Índices ecológicos de adultos (Diptera: Culicidae) coletados em remanescente de Mata Atlântica, Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu (REGUA), Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro.	81
5.5	Discussão (objetivo 6) Infecção natural por transmissão vertical do vírus zika em mosquitos silvestres <i>Aedes albopictus</i> e <i>Haemagogus leucocelaenus</i> do Rio de Janeiro, Brasil.	86
6	CONCLUSÕES	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO I	Ecobiology of <i>Haemagogus leucocelaenus</i> arbovirus vector in the golden lion tamarin translocation area of Rio de Janeiro, Brazil.	104
ANEXO II	Natural Infection and Vertical Transmission of zika Virus in Sylvatic Mosquitoes <i>Aedes albopictus</i> and <i>Haemagogus leucocelaenus</i> from Rio de Janeiro, Brazil.	116

1. INTRODUÇÃO

As florestas tropicais representam riquezas imensuráveis, oferecendo serviços ecossistêmicos importantes, fornecendo benefícios inestimáveis à geração presente quanto futuras. A preservação desses ecossistemas é fundamental para evitar a extinção de espécies e mitigar riscos biológicos significativos para a biodiversidade global, como é o caso da Mata Atlântica, que se estende desde o norte do Brasil até o Paraguai e a Argentina, especificamente na província de Missiones (CARNAVAL *et al.*, 2009) e a Caatinga, biomas de grande relevância e singularidade. Apesar de sua fragmentação, a Mata Atlântica, que é um bioma exclusivo do Brasil, ainda oferece um vasto potencial para o desenvolvimento sustentável. No entanto, esses ecossistemas estão enfrentando impactos severos e requerem urgentemente a implementação de análises aprofundadas e a formulação de políticas públicas inovadoras e contínuas, visando à sua conservação e ao bem-estar das populações que neles habitam e dependem diretamente de seus recursos (XIMENES *et al.*, 2022).

Paralelamente locais que são definidos como *hotspot*, ou seja, locais que apresentam grande biodiversidade que foram perturbados por ações antrópicas, contêm tanto a maior parte da diversidade quanto os maiores hiatos no conhecimento da sua fauna (JORNAL DA USP NO AR, 2022, LAMARRE *et al.*, 2012). O Brasil, apresenta uma mega biodiversidade, no entanto, enfrenta uma alarmante destruição de habitats, com espécies sendo extintas antes que possam ser descobertas ou descritas pela ciência, tornando urgente a necessidade de ampliação dos inventários faunísticos, incluindo levantamentos da entomofauna.

Os seres vivos, sejam animais ou vegetais, desempenham um papel crucial como aliados do ser humano na função de indicadores ambientais, sinalizando alterações ou contaminações que ocorrem no ambiente. Essa capacidade permite identificar quando o ecossistema está em risco devido à presença de substâncias tóxicas no solo, na água ou na atmosfera (PARRON *et al.*, 2015). Tais bioindicadores incluem uma ampla gama de organismos, como animais, insetos, vegetais, líquens, fungos, bactérias e vírus (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Essa estratégia representa uma abordagem valiosa para o monitoramento ambiental, merecendo maior atenção e exploração.

O processo de urbanização está intimamente associado ao crescimento da população e de aglomerações urbanas, fazendo parte da transformação da sociedade brasileira. Entretanto, este processo acarreta problemas habitacionais, ambientais e de saúde, principalmente para populações de baixa renda. Estas alterações ambientais além das climáticas podem ter como consequência a modificação do comportamento de insetos vetores e subsequentemente o mecanismo de transmissão de agentes infecciosos, tendendo à formação de novos ciclos de

transmissão de patógenos no peri e intradomicílio (MEDEIROS-SOUZA *et al.* 2015, MONTAGNER *et al.*, 2018, MOREIRA-SOTO *et al.*, 2018). O entendimento da relação entre o homem e o ambiente torna-se cada vez mais importante, levando-se em conta que alterações climáticas acarretam mudanças na distribuição epidemiológica de doenças, como a dengue, por exemplo, principalmente em áreas indenes, assim como o aumento desta enfermidade em áreas onde é endêmica (ROMANELLI *et al.*, 2015). O estudo da bioecologia da fauna culicidiana pode ser utilizado para avaliar o grau de alterações ocorridas em determinada região. Algumas espécies podem atuar como bioindicadores dessas modificações, seja pelo aumento em sua densidade ou até sua ausência (FORATTINI & MASSAD 1998).

A família Culicidae é uma das mais importantes sob ponto de vista epidemiológico na transmissão de agentes etiológicos, contendo 3.727 espécies agregadas em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae (HARBACH, 2024). A região neotropical é a maior detentora de endemicidade, apresentando 27% das espécies conhecidas (WARD, 1982).

Na primeira subfamília encontramos os anofelinos, mosquitos responsáveis pela transmissão de patógenos causadores da malária (HARBACH & KITCHING, 1998). A subfamília Anophelinae reúne três gêneros: *Anopheles* (Meigen, 1818), cosmopolita; *Chagasia* (Cruz, 1906), restrito à região neotropical e *Bironella* (Theobald, 1905), existente apenas na região australiana (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Já na subfamília Culicinae são incriminados vetores de patógenos causadores de doenças como a filariose bancroftiana, dengue, febre amarela, assim como mais de 150 arboviroses, abrangendo cerca de 3.000 espécies (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994), distribuídas em 11 tribos, constituídas por 38 gêneros, dentro dos quais 34, já foram relacionados como vetores de patógenos HARBACH & KITCHING (1998).

O conhecimento da distribuição e abundância de culicídeos em áreas florestais, remanescentes da típica Mata Atlântica primária brasileira, é de grande importância para implementação de análises eco-epidemiológicas sobre a entomofauna de vetores. Assim sendo, o estudo de comportamento de mosquitos em áreas de ambiente natural pode esclarecer hábitos ainda desconhecidos desses vetores e devem ser acompanhados de avaliações periódicas rigorosas de investigações através do uso da sistemática e bioecologia. O bioma de Mata Atlântica apresenta elevada diversidade tanto da flora, quanto da fauna de vertebrados e invertebrados, o que possibilita a multiplicidade de opções de nichos para o desenvolvimento dos culicídeos. Em suma, os culicídeos dentro da temática da entomologia médica, certamente são os que têm atraído atenção da saúde pública, pelo fato de estarem envolvidos na transmissão de múltiplas infecções ao homem e aos animais (FORATTINI, 2002).

As espécies de mosquitos se criam em uma grande diversidade de habitats larvais os quais podem apresentar significativa variedade de dimensões e volumes de água (LOZOVEI, 2001). Alguns táxons podem apresentar ampla valência ecológica e grande amplitude de nichos aos locais utilizados na sua procriação e são capazes de ocorrer em diferentes tipos de habitats larvais. Por exemplo, alguns táxons que utilizam buracos de árvores como habitats larvais como as espécies da tribo Sabethini (Blanchard, 1905), com exceção de *Limatus durhamii* (Theobald, 1901), que tem sido encontrado em criadouros artificiais, indicam que o ambiente silvestre não sofreu alteração antrópica acentuada. Em contrapartida, a presença de espécimes da tribo Mansonini (Belkin, 1962) e principalmente Aedini (Neveu-Lemaire, 1902) podem indicar ambientes com alto grau de antropização (DORVILLÉ, 1996, FORATTINI, 2002).

O estudo da ecobiologia de mosquitos em remanescentes da Mata Atlântica é essencial para identificar espécies que se relacionam com as modificações ambientais, além disso, é factível identificar os riscos e eventuais impactos econômicos destas espécies em cada etapa de degradação ou recuperação do meio ambiente. O risco de transmissão de patógenos para humanos por vetores pode ser significativamente afetado pela diversidade de comunidades (KEESING *et al.*, 2006). Uma maior variedade de hospedeiros ou vetores pode ser benéfica por meio do efeito de diluição, que diminui a taxa de encontros entre vetores e hospedeiros suscetíveis, além de regular as populações de vetores.

Considerando a relevância do estudo da diversidade de mosquitos em fragmentos de Mata Atlântica, tanto em ambientes influenciados por processos antrópicos quanto em segmentos de crescimento secundário, é importante avaliar possíveis alterações no comportamento, padrões de distribuição e atividades de populações de mosquitos, incluindo espécies antes consideradas exclusivamente silvestres. As mudanças ambientais estão atingindo desfavoravelmente os ambientes naturais com perda acelerada de biodiversidade (OLIVEIRA *et al.*, 2014, MAIERO *et al.* 2015, PECL *et al.*, 2017). Como exemplo, apesar do estudo ter sido realizado na Alemanha, há poucos anos Walther *et al.* (2016), relatam que o *Aedes albopictus* já vem sendo encontrado na Europa desde 1979, demonstrando sua adaptação em regiões do noroeste da Alemanha em um levantamento feito em 2014 e 2015 nas mesmas áreas estudadas anteriormente (WALTHER, SCHEUCH, KAMPEN, 2016), apontando a possibilidade do espalhamento de patógenos transmitidas por estes vetores. Quando estudamos a América do Sul, Figueiredo (2019) cita que animais silvestres podem ser infectados e o espalhamento de patógenos ser facilitado por *Haemagogous*, pois já existem evidências do ciclo silvestre da dengue.

Nesse contexto, os mosquitos vetores de patógenos têm demonstrado plasticidade comportamental em novos cenários epidemiológicos. Diante de impactos ambientais intensificados pelo homem, algumas espécies passam a frequentar áreas habitadas pela população humana, tornando-se aptas a transmitir patógenos para humanos e outros mamíferos domésticos.

1.1 Família Culicidae

Os mosquitos estão inseridos no Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, subordem Nematocera, Família Culicidae. Na sua forma adulta, os dípteros se caracterizam pela presença de apenas um par de asas para voo e um segundo par de tamanho reduzido e em forma de halteres que confere estabilidade ao voo, são também caracterizados pelas escamas nas veias alares (FORATTINI, 2002). Os representantes popularmente mais conhecidos são os denominados pernilongos e as muriçocas.

Os culicídeos apresentam o comprimento entre 3 e 6 mm, são delgados, possuem 3 pares de pernas alongadas e finas e a presença de escamas mais ou menos abundantes pelo corpo. O abdômen é longo e delgado com 8 segmentos, em sua extremidade estão localizados os orifícios anal e genital, onde a genitália masculina é saliente. A cabeça é pequena, de formato esférico apresentando olhos reniformes e dicóticos, compostos por 350 a 500 omatídeos, sem ocelos.

As fêmeas apresentam a probóscide alongada, o que permite que possam picar e sugar o sangue de animais vertebrados, e palpos constituídos por cinco segmentos, antenas com flagelo longo de 13 artículos e apresentando dimorfismo sexual, onde nos machos são plumosas e nas fêmeas pilosas.

Em relação a oviposição, os culicídeos fazem a postura isoladamente ou em grupo, sendo que os ovos apresentam formato oval ou elíptico e apresentam cor escurecida algum tempo depois de ovipostos (FORATTINI, 2002, GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

As larvas são tipicamente livres e aquáticas, o que significa que vivem em habitats larvais, como poças, lagos, riachos, áreas alagadas, fitotelmos, recipientes artificiais e outros ambientes aquáticos.

As peças bucais das larvas são adaptadas para diferentes tipos de alimentação, incluindo a filtragem, raspagem ou perfuração de matéria orgânica presente na água. As larvas de mosquito é composta por cabeça, tórax e abdômen formado por oito segmentos. Na cabeça, apresentam antenas sensoriais que são responsáveis por detectar estímulos químicos e físicos no ambiente aquático, ajudando na orientação e alimentação. É importante ressaltar que as características das larvas de mosquitos podem variar entre as diferentes espécies e gêneros, mas em geral, elas

compartilham a adaptação ao ambiente aquático durante o estágio larval de seu ciclo de vida. Essas adaptações são fundamentais para a sobrevivência e o desenvolvimento das larvas de mosquitos até a fase adulta (FORATTINI, 2002, GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

As larvas de *Toxorhynchites* (Theobald, 1901) são predadoras na fase larval e possuem cerdas orais especializadas e fortes, que lhes permitem capturar e perfurar as larvas de outras espécies de mosquitos para se alimentarem de seu conteúdo. Essas cerdas são adaptadas para facilitar a captura de presas, tornando as larvas altamente eficazes como predadores. Assim sendo, esses mosquitos desempenham um papel importante no ecossistema, contribuindo na regulação de populações de outros mosquitos e auxiliando para o equilíbrio dos habitats larvais onde desenvolvem os imaturos. (FORATTINI, 2002, GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

As pupas são livres, também aquáticas, apresentam a forma de vírgula, céfalo-tórax grande com abdômen longo e encurvado, terminado em paletas natatórias, passam por uma fase de pupação enquanto estão submersas na água, antes de emergirem os mosquitos adultos (GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

1.2 Ciclo de vida dos culicídeos

Os culicídeos são holometabólicos com metamorfose completa, apresentando as fases de ovo, quatro estágios larvares, pupa e o inseto adulto (Figura 1).

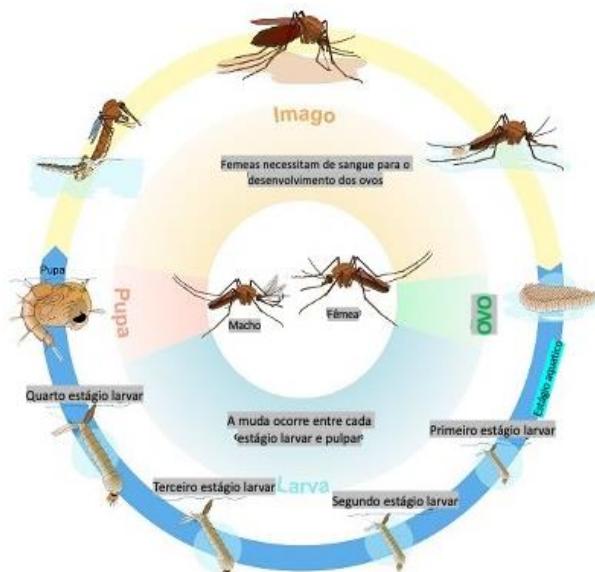


Figura 1. Ciclo de vida dos culicídeos. Adaptado de <https://eu.biogents.com/o-ciclo-de-vida-dos-mosquitos/?lang=pt-br>

As formas imaturas, do estágio de ovo até a pupa, ocorrem em coleções de água; apenas a forma adulta se passa no meio aéreo. A duração de cada estágio é variável e depende de vários fatores, entre eles as condições atmosféricas e oferta de nutrientes; considera-se que o ciclo de vida, contado a partir da fase de ovo até a forma adulta pode variar entre 7 e 20 dias, sendo que o ciclo completo com menor número de dias está ligado a maior temperatura (FORATTINI, 2002, CLAIROUIN, 2009, GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

Os ovos dos Culicidae são ovipostos na água ou em substratos sólidos que podem ser inundados; as fêmeas da maioria dos culicídeos da tribo Sabethini (Blanchard, 1905) realizam oviposição na superfície da água, ao passo que a tribo Aedini realiza a postura dos ovos de forma individual em um substrato que posteriormente venha a ser coberto pela água. Cabe ressaltar que, esses ovos colocados em substratos acima da linha de água são resistentes a dissecção, podendo resistir por meses ou anos, e continuar viáveis até o momento que o contato com a água permita sua eclosão. Em geral, os ovos têm forma elíptica e simetria bilateral. Em algumas espécies da subfamília Culicinae, os ovos são colocados em forma de aglomerados, conhecidos como jangadas e que têm a capacidade de flutuar no meio líquido, já no caso de *Mansonia* spp. (Blanchard, 1901), são colocados em agrupamentos radiais presos a vegetação embaixo da água (FORATTINI, 2002, CLAIROUIN, 2009).

A quantidade de ovos pode variar entre 50 e 500 por oviposição, logo no início eles têm a coloração branca, mas em algumas horas se tornam escuros. Nas regiões tropicais, os ovos completam seu ciclo embrionário em 2 a 3 dias, já nos períodos frios pode levar uma semana ou mais para o desenvolvimento (CLAIROUIN, 2009, GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

As larvas dos culicídeos cujos ovos foram depositados direto na água, rapidamente eclodem após a embrionação. Logo elas passam por quatro estágios, cujo desenvolvimento varia entre oito a dez dias, isso varia de acordo com as condições ambientais e a espécie (FORATTINI, 2002). Estima-se que nas condições de temperatura ideais, entre 26 e 28°C, os três primeiros estágios durem um dia e o último pode durar até três dias, e, nos machos, esse período total de desenvolvimento do estágio larvar, costuma ser de um dia a menos. Cabe ressaltar que, nos gêneros como *Toxorhynchites* e *Wyeomyia* (Theobald, 1901), mesmo em condições ideais, o desenvolvimento completo pode levar entre 2 e 3 semanas (FOSTER & WALKER, 2018). A posição e comportamento das larvas variam conforme a espécie e os fatores abióticos da água. Algumas larvas podem permanecer na superfície, enquanto outras preferem habitar o fundo, emergindo apenas para respirar, movendo-se por meio de contorções irregulares. Esses padrões comportamentais não apenas atendem às necessidades respiratórias, mas também facilitam a busca por alimento durante esta fase do desenvolvimento.

As larvas ficam posicionadas de forma oblíqua à superfície da água para que possam respirar através de um sifão respiratório. Essa forma em que as larvas se posicionam é um dos critérios de diferenciação das larvas de culicídeos e anofelinos, pois os anofelinos se dispõem de forma horizontal à superfície da água por não apresentar o sifão respiratório (Figura 2). As formas imaturas ativas da tribo Mansoniini (BELKIN, HOGUE, 1962), larvas e pupas possuem o aparato espiracular adaptado para perfurar a vegetação submersa e obter oxigênio a partir destes tecidos, fixando-se em plantas aquáticas, de cujos parêntquimas aeríferos retiram o oxigênio.

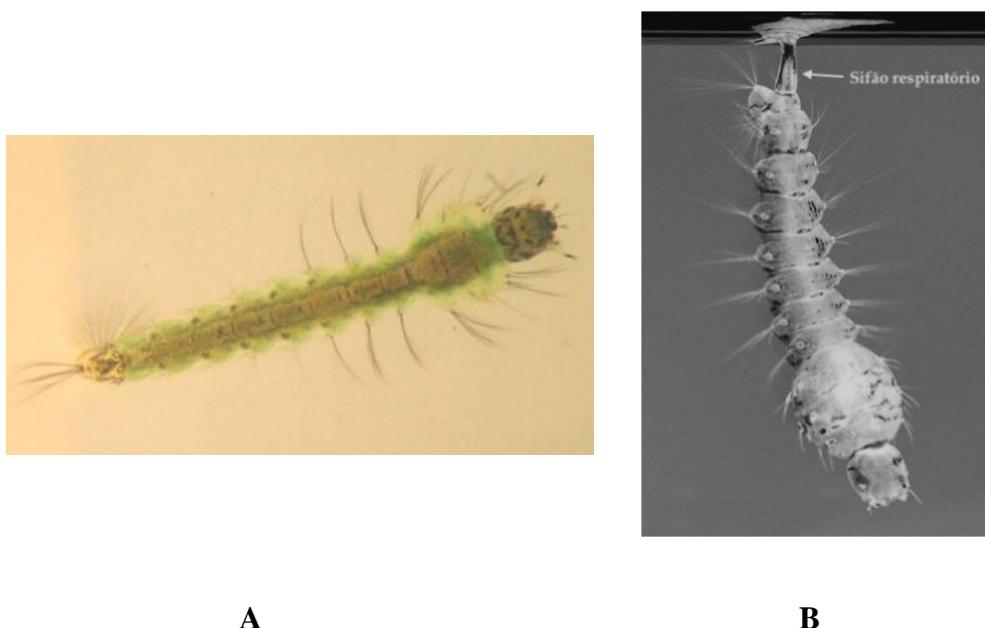


Figura 2 A. Larva de um anofelino, sem o sifão respiratório. Crédito da imagem a Steffen Dietzel, **B.** Larva do culicídeo *Toxorhynchites speciosus* (Theobald, 1801) com o sifão respiratório. Crédito da imagem a Acrocynus.

No que se refere a sobrevivência das larvas, em geral, estas se mantêm bem na água doce, entretanto, algumas podem sobreviver em água poluída e podem estar adaptadas a ambientes aquáticos com concentração salina um pouco mais elevada. A maioria dessas larvas vivem em ambientes aquáticos como poços, lagos, água acumulada em bromélias, buracos de árvore, recipientes artificiais abandonados etc., não sendo comum em rios e lagos, tendo sua abundância comprometida principalmente onde existam predadores como répteis, peixes, anfíbios, crustáceos e algumas ordens de insetos como Hemiptera, Odonata, Coleoptera e Diptera. Como exemplo desses últimos, temos os mosquitos do gênero *Toxorhynchites*, que têm preferência por predar culicídeos do gênero *Aedes* (Meigen, 1818) (ANDRADE & DOS

SANTOS, 2004, CLAIROUIN, 2009). As larvas podem ser necrófagas ou predadoras, podendo obter sua alimentação no fundo da coleção de água a partir de fitoplâncton ou zooplâncton (GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

Até chegar o estágio de pupa, as larvas precisam sofrer o processo de ecdise em cada um dos seus instares. A pupa apresenta corpo em forma de vírgula, tem um cefalotórax grande e abdômen encurvado que termina em paletas natatórias. As pupas respiram pelas trompetas respiratórias sendo que algumas apresentam trompetas respiratórias modificadas a fim de extrair o oxigênio da vegetação aquática. As pupas não se alimentam durante essa fase, pois usam sua reserva energética adquirida durante o estágio larval, e se mantêm durante a maior parte de seu ciclo flutuando na superfície da água, porém podem se deslocar, apresentando movimentos rápidos, se perturbadas (CLAIROUIN, 2009, GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011, DE CASTRO *et al.*, 2013).

A flutuação das pupas é possível porque elas mantêm uma bolha de ar entre os apêndices cefalotorácicos, deste modo o dorso torácico se mantém na superfície da água e o abdômen fica submerso, além disso essa bolha de ar permite a troca gasosa. A fase de pupa costuma durar aproximadamente dois dias, porém, em alguns mosquitos como *Toxorhynchites* e *Wyeomyia* independente do sexo, esta fase pode durar pelo menos seis dias. Cabe ressaltar que em temperaturas baixas, este período pupal pode ser prolongado (FOSTER & WALKER, 2018). Durante esta fase ocorre a perda de alguns órgãos larvais e a formação de alguns órgãos para a fase adulta (FORATTINI, 2002).

Quando a pupa começa a absorver maior quantidade de ar, significa que ela se encontra no estágio final de maturação, esse maior volume de ar ajuda no aparecimento de uma fenda longitudinal torácica, que permite a emergência do mosquito adulto (FORATTINI, 2002).

Ao atingir o estágio adulto, o mosquito abandona a cutícula pupal e permanece em um estágio de latência por aproximadamente 15 minutos até poder alçar seu primeiro voo. Um dos fatores que influenciam no tamanho do mosquito adulto é temperatura e altitude em relação ao nível do mar onde as larvas e pupa crescem; quanto maior a altitude, menor o tamanho do mosquitos. Ressaltamos que, as fêmeas costumam ser maiores em tamanho que os machos (MITCHELL *et al.*, 1986, FORATTINI, 2002, MERCIER *et al.*, 2022).

1.3 Ecobiologia dos culicídeos

Os culicídeos, em sua maioria, estão presentes na região neotropical e têm parte do seu ciclo biológico em coleções de água. Eles ocupam nichos ecológicos próprios e tomam parte das comunidades existentes, fazendo parte inclusive da cadeia alimentar. Esses táxons

desempenham funções importantes nos ecossistemas como polinizadores, fontes de alimento para outras espécies e, em alguns casos, como predadores de outros insetos. Entretanto, algumas espécies de mosquitos também podem ser vetores de patógenos. A forma adulta, tem como principal papel fazer a reprodução e dispersão da espécie, nisso também temos a dispersão de alguns patógenos causadores de doenças, devido ao hábito hematofágico das fêmeas. A hematofagia das fêmeas se faz necessária para a conclusão do ciclo de amadurecimento e postura dos ovos. Elas podem completar o desenvolvimento de seus ovos após um único repasto sanguíneo (concordância gonotrófica), ou realizar múltiplos repastos sanguíneos (discordância gonotrófica) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994, KENNEY *et al.*, 2013).

Na maioria das espécies de mosquitos, o sangue permite o desenvolvimento dos ovos por estimular uma cascata de hormônios no cérebro e ovários. A quantidade de proteínas presente no sangue fornece os aminoácidos necessários para o precursor proteico da gema do ovo denominado vitelogenina. O sangue também contribui para a formação do substrato proteico do ovo e fonte energética para sobrevivência do mosquito adulto. Alguns fatores interferem na longevidade dos mosquitos adultos, fatores esses como a presença de predadores, umidade e temperatura. A duração média de uma fêmea em condições adequadas pode ser de quatro a cinco semanas, entretanto os machos têm seu ciclo de vida mais curto que o das fêmeas (GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011).

Os mosquitos machos possuem a dieta baseada em néctares vegetais e substâncias açucaradas, enquanto a fêmea tem preferência por sangue de vertebrados, mas também pode se alimentar de substâncias açucaradas como forma de obter energia. Como citado anteriormente, a fêmea necessita do sangue para que ocorra o desenvolvimento dos ovos, embora algumas espécies possam desenvolver o primeiro lote de ovos sem necessidade de ter realizado o repasto sanguíneo. Uma vez tendo feito o repasto sanguíneo, as fêmeas procuram se abrigar a fim de realizar a digestão do sangue. Essa digestão está dependente da temperatura, para só então depois procurarem um local apropriado para a oviposição. O ciclo de alimentação de sangue, maturação dos ovos e oviposição pode ocorrer várias vezes durante o ciclo de vida da fêmea, sendo que, fatores como o clima contribuem para acelerar ou retardar a abundância dos estágios imaturos (CLAIROUIN, 2009, GOUVEIA DE ALMEIDA, 2011). A qualidade dos habitats de reprodução tem efeito na abundância dos mosquitos adultos e isso afeta também sua distribuição espacial e temporal (GRECH *et al.*, 2019).

1.4 Interação dos culicídeos com fragmentos de Mata Atlântica

Este estudo envolve o conceito de organização comunitária, que pode ser abordado a partir de diferentes perspectivas teóricas, sendo duas das principais a teoria holística e a teoria individualista. Estas teorias preveem padrões distintos de distribuição de espécies ao longo de gradientes ecológicos e geográficos. De acordo com a abordagem holística, as espécies que compõem uma comunidade estão intimamente ligadas umas às outras e existem limites bem definidos na distribuição da comunidade, caracterizando uma organização comunitária fechada. Por outro lado, a teoria individualista sugere que cada espécie está distribuída de forma independente de outras com as quais coexiste em uma associação particular, resultando em uma comunidade aberta, cujos limites são arbitrários em relação às distribuições geográficas e ecológicas de suas espécies-membro, que podem estender suas abrangências de modo independente, para dentro de outras associações. Além dessas, foi desenvolvida uma terceira teoria, a Teoria Neutra, que busca unificar as duas teorias anteriores. Referência?

A interação dos mosquitos envolve uma série de processos ecológicos complexos, que são influenciados pela estrutura e dinâmica desses fragmentos de Mata Atlântica, bem como pelas características biológicas e comportamentais dos mosquitos, como exemplo, habitat e disponibilidade de recursos. Os fragmentos de Mata Atlântica fornecem habitats larvais variados para os mosquitos, incluindo áreas de reprodução, alimentação e repouso. A fragmentação florestal pode alterar a estrutura e conectividade dos habitats naturais, afetando a distribuição e movimento dos mosquitos entre os fragmentos. Fragmentos menores e mais isolados podem ter populações de mosquitos diferentes daquelas encontradas em fragmentos maiores e mais conectados (CATENACCI & NUNES-NETO, 2018).

É de conhecimento que a borda dos fragmentos de mata, onde a floresta encontra áreas abertas ou perturbadas, pode criar condições ambientais únicas que influenciam a ecologia dos mosquitos. As mudanças das variáveis abióticas como temperatura, umidade e disponibilidade de recursos na borda podem afetar a abundância e comportamento dos culicídeos (DIALLO *et al.*, 2012, CHAVES & RODRIGUES DE SÁ, 2016, RENAULT *et al.*, 2024).

Os mosquitos interagem com uma variedade de organismos nos fragmentos de mata, incluindo outras espécies de insetos, aves, mamíferos e plantas. Dessa forma, essas interações podem ser competitivas, predatórias ou mutualísticas e influenciam a dinâmica das populações de mosquitos e sua distribuição no ambiente. Em síntese, a interação dos culicídeos com fragmentos de Mata Atlântica é um aspecto importante da ecologia desses insetos e desempenha um papel fundamental na manutenção da biodiversidade e funcionamento dos ecossistemas. Compreender essas interações é essencial para o manejo e conservação desses habitats e para o

desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de vetores e prevenção de doenças transmitidas por mosquitos. Referência?

Estudos de mosquitos em ambientes florestais são de suma importância, uma vez que fornecem percepções valiosas sobre a ecologia das espécies que estão nesses habitats e seus padrões de distribuição. Os mosquitos desempenham papéis cruciais nos ecossistemas florestais, atuando como polinizadores, fontes de alimento para outras espécies e componentes essenciais da cadeia alimentar. A investigação de sua ecologia auxilia na compreensão mais profunda do funcionamento desses ecossistemas, incluindo preferências de habitat, padrões de atividade, interações com outras espécies e respostas às alterações ambientais. É importante destacar que muitos patógenos são transmitidos por mosquitos que se desenvolvem nesses ambientes florestais, como malária, dengue e febre amarela, entre outros. Portanto, compreender a ecologia desses mosquitos é crucial para avaliar os riscos de transmissão de patógenos e desenvolver estratégias de prevenção e controle. Monitorar esses espécimes é essencial para detectar possíveis mudanças nas populações ao longo do tempo e identificar potenciais surtos de doenças.

É de conhecimento que as ações antrópicas vêm provocando mudanças na biodiversidade que envolvem a aniquilação de ambientes e extinção de espécies vegetais e animais da Mata Atlântica, alguns inclusive sequer chegam a ser descobertos pela ciência. Diante disso, é importante o estudo com objetivo de se conseguir um inventário da fauna e flora como forma de entender o equilíbrio e interação das diversas espécies (FORATTINI, 2002, DIALLO *et al.* 2012, BASTOS *et al.*, 2021).

O estudo de culicídeos envolve não só as espécies, mas também os aspectos ecológicos e biológicos de suas populações, proporcionando dados como a diversidade e abundância de espécies diante das mudanças de clima, interação com plantas preferenciais para reprodução e com vertebrados, ao realizar o repasto em algumas espécies. No último caso, envolve não só a reprodução do culicídeo mas também envolve dispersão de patógenos (RODRIGUES DE SÁ *et al.*, 2016, CHAVES *et al.*, 2019, BASTOS *et al.*, 2021).

Um dos fatores apontados para o estudo também se refere à área médica devido à dispersão de patógenos de interesse, entretanto essa representa uma parte da interação dos insetos no ambiente que habita. A relação inseto-planta é um dos pontos de contribuição para a reprodução dos insetos em plantas aquáticas, internódios de bambus, buracos em toco de árvores por exemplo, servindo como criadouros e habitat para as larvas dos mosquitos. Compondo o habitat das larvas dos insetos, contamos ainda com a presença de microorganismos e matéria orgânica que se presta como fonte alimentar das larvas e ressaltamos que alguns microorganismos

também podem parasitar os insetos retardando ou até mesmo impedindo o desenvolvimento dos mesmos (FORATTINI, 2002, FOSTER & WALKER, 2018, BASTOS *et al.*, 2021).

Os táxons também possuem predadores como outras espécies, hidras, tubelários e vertebrados, podendo ocorrer interferência em qualquer etapa do seu desenvolvimento. Dependendo da abundância e diversidade das espécies predadoras presentes, algumas espécies de insetos podem sofrer redução em sua população da mesma forma que a falta de predadores leva ao aumento da densidade populacional dos insetos (FORATTINI, 2002, FITZPATRICK *et al.*, 2019).

Considerando a Mata Atlântica como um *hotspot* de biodiversidade, caracterizado por sua singularidade e pela riqueza de espécies, incluindo os mosquitos vetores, torna-se imperativo compreender a ecologia desses insetos, dada sua relevância como potenciais transmissores de patógenos tanto para a saúde humana quanto para a saúde animal. Os impactos dessas doenças não apenas comprometem a saúde pública, mas também afetam negativamente a economia local em múltiplos aspectos.

A investigação dos culicídeos presentes na Mata Atlântica desempenha um papel crucial na compreensão de sua diversidade, padrões de distribuição geográfica e ecologia comportamental, o que, por sua vez, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de vetores. Por meio da análise detalhada da anatomia e fisiologia desses insetos, é possível obter percepções valiosas sobre suas preferências alimentares, habitats preferenciais e padrões sazonais de atividade, elementos essenciais para a implementação de medidas preventivas e de controle direcionadas.

Aliado a isso, a aplicação de técnicas de biologia molecular para a detecção de flavivírus na população de mosquitos na Mata Atlântica oferece uma abordagem complementar e altamente sensível para avaliar a prevalência e a distribuição desses patógenos virais na região. Essa abordagem molecular não apenas permite a identificação precisa dos vírus presentes, mas também oferece a compreensão sobre sua dinâmica de transmissão, potenciais hospedeiros amplificadores e fatores ambientais que influenciam na sua disseminação.

Assim, esta pesquisa não se restringe apenas às ações antrópicas e implicações para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica como também a vigilância epidemiológica e detecção de surtos de arboviroses. Ao compreender e gerenciar de forma abrangente as populações de mosquitos vetores e os riscos associados à transmissão de patógenos, contribuímos para a preservação desse ecossistema único e para a manutenção do equilíbrio ecológico regional.

1.5 Arbovírus

Arbovírus é o nome usado para vírus que são transmitidos por artrópodes hematófagos (“arthropod borne virus”) levando à disseminação de zoonoses. Ressalta-se que este nome não constitui uma categoria taxonômica, representando apenas o fato de que necessitam de vetores hematófagos para sua transmissão (GUBLER, 2001). Os principais vetores são os mosquitos, mas a transmissão também pode ser realizada por carrapatos. Os arbovírus têm pelo menos dois hospedeiros principais: um vertebrado, em geral primatas não humanos e um artrópode vetor. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais pelo fato de nem sempre terem a viremia acentuada, e nem sempre contribuírem para o ciclo de transmissão (ALATOON & PAYNE, 2009). As únicas exceções são os vírus da dengue (DENV) e do O’nyong-nyong (ONNV), cujos hospedeiros primários são os humanos, embora haja ainda a possibilidade de haver algum hospedeiro vertebrado que ainda não foi identificado para o caso do ONNV e sejam relatados casos de que macacos sejam hospedeiros alternativos aos humanos (GOULD *et al.*, 2017, BRAACK *et al.*, 2018). Nesse aspecto, Figueiredo (2019) relata que existe a possibilidade das arboviroses humanas serem mantidas no ciclo silvestre ao infectarem animais na América do Sul. Existem mais de 500 tipos de arboviroses distribuídas pelo mundo, e algumas delas causam doenças em humanos. Os arbovírus são classificados em seis diferentes famílias: Bunyaviridae (gêneros *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*), Flaviviridae (gênero *Flavivirus*), Orthomixoviridae (gênero *Thogotovirus*), Rhabdoviridae (gênero *Vesiculovirus*), Reoviridae (gêneros *Orbivirus* e *Coltivirus*) e Togaviridae (gênero *Alphavirus*) (GUBLER, 2001, ALATOON & PAYNE 2009, BRAACK *et al.*, 2018).

Os primeiros arbovírus foram isolados no continente Africano e América do Sul, posteriormente no continente Asiático e finalmente no resto do mundo. A maior prevalência das arboviroses ainda está nos continentes Africano e Sulamericano, provavelmente devido a fatores como clima, flora e fauna (GUBLER, 1998, SCHWEITZER *et al.*, 2009, GO *et al.*, 2014). Pelo que já foi descrito na literatura, existem cerca de 17 arboviroses conhecidas que circulam pelo continente Americano (Quadro 1) (VASCONCELOS *et al.*, 2011, BRABB & GIACOMO, 2012, PASTULA *et al.*, 2015, MACLACHLAN, 2017, MLERA *et al.*, 2017).

Desde o início do século XXI tem se observado maior número de notificações de doenças causadas por arbovírus. Parte desse evento se deve a expansão populacional, modificação de ecossistemas, mudanças climáticas, maior facilidade de deslocamento das pessoas, falta de controle dos vetores, permitindo assim maior distribuição dos mesmos (GUBLER, 2001, LIMA-CAMARA, 2016). Os movimentos populacionais têm sido apontados como o principal fator responsável pela introdução ou reintrodução de patógenos (PABBARAJU *et al.*, 2009,

PFEFFER & DOUBLER, 2010, ROEHRIG, 2013, MOUREAU *et al.*, 2015, GOULD *et al.*, 2017, DONALISIO *et al.*, 2017).

Para que a transmissão dos arbovírus ocorra, é necessário que o vírus consiga se reproduzir no vetor, e o mesmo possa adquirir o vírus ao fazer o repasto, por via transovariana ou por via venérea. Os arbovírus, para terem seu ciclo completo, necessitam passar por um hospedeiro vertebrado para que seja mantido na natureza, isso ao mesmo tempo contribui para que o vírus tenha maior número de hospedeiros. Assim que o vetor ingere o sangue de um hospedeiro infectado, os vírus se multiplicam nos tecidos, atingindo altas concentrações para posteriormente serem dirigidos à glândula salivar dos artrópodes. Nos mosquitos, o período para que o vírus ingerido durante o repasto esteja disponível para ser infectante varia de acordo com a temperatura e umidade ambiente; em períodos quentes o tempo costuma ser curto e essa é uma das razões para maior disseminação das arboviroses, principalmente nas regiões tropicais. Existem mais fatores envolvidos nesta disponibilidade do mosquito dispersar os vírus como: quantidade de sangue ingerido, taxa de replicação viral (fitness viral) e carga viral presente no sangue do hospedeiro vertebrado. Sabe-se também que os mosquitos permanecem infectados pelos vírus durante toda sua vida, sem que demonstrem diminuição do seu ciclo de vida. Outro fator que influencia a dispersão dos arbovírus pelos insetos é a frequência com que os mesmos fazem o repasto, e se os mesmos podem transmitir mais de um tipo de vírus. Outra forma dos insetos manterem o ciclo das arboviroses é que existe a transmissão transovariana como ocorre com os mosquitos das espécies de *Aedes* (KUNO & CHANG, 2005).

É no momento do repasto, que o vírus é passado para o hospedeiro vertebrado, completando o ciclo. Os ciclos envolvendo a transmissão dos arbovírus podem ser de dois tipos: o ciclo silvestre ou selvagem, onde o vírus é mantido em animais selvagens e transmitido pelo artrópode (os humanos entram neste ciclo quando penetram neste nicho); e o ciclo urbano, onde um animal doméstico ou humano infectados, ao entrarem no ciclo selvagem, trazem consigo o vírus e passam ser a fonte de distribuição do vírus quando o mosquito faz o repasto.

As espécies de vetores que tomam parte do ciclo urbano podem ser as mesmas do ciclo silvestre ou outras espécies diferentes, onde temos como exemplo clássico o vírus da febre amarela, em que os vetores selvagens são algumas espécies do gênero *Sabettus* (Robineau-Desvoidy, 1827) e *Haemagogus* (Williston, 1896) e no ciclo urbano, são os *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (GUBLER, 2001, ALATOOM, ADNAN, PAYNE, 2009, GOULD *et al.*, 2017, BRAACK *et al.*, 2018).

As arboviroses consideradas de maior importância médica são a febre amarela, dengue, zika, chikungunya e Febre do Oeste do Nilo, por estarem distribuídas tanto no hemisfério sul e

norte do planeta. Cabe salientar que existem outras arboviroses importantes, mas restritas, pelo menos por enquanto, a determinados países e regiões como por exemplo a encefalite de St. Louis, encefalite japonesa, encefalite venezuelana e febre de Rift Valley (LIMA-CAMARA, 2016, GOULD *et al.*, 2017).

Os hospedeiros vertebrados podem ser mamíferos e aves. As aves migratórias podem contribuir para a dispersão dos arbovírus como ocorreu com a Febre do Oeste do Nilo nos Estados Unidos das Américas (EUA) em 1999, onde em menos de quatro anos a doença já era encontrada por quase todo país e em cerca de cinco anos já se encontrava espalhada por toda América do Norte, parte da região do Caribe e América do Sul (ROEHRIG, 2013, GOULD *et al.*, 2017). Os reservatórios ideais são aqueles que conseguem produzir altos títulos de vírus por longo tempo, e isto em parte, depende da resposta imune do hospedeiro (KUNO & CHANG, 2005, KUNO *et al.*, 2017).

Alguns hospedeiros dos arbovírus são infectados, mas não conseguem manter a replicação viral com título elevado o suficiente, podendo ou não levar o hospedeiro a desenvolver alguma doença, por isso, estes hospedeiros são denominados hospedeiros finais no ciclo de transmissão, um dos exemplos ocorre com a Febre do Oeste do Nilo, onde os equinos e humanos são considerados hospedeiros finais enquanto que as aves são reservatório (ROEHRIG, 2013, KUNO *et al.*, 2017).

Quadro 1. Arbovírus causadores de doenças em humanos circulantes pelo continente Americano (GUBLER, 2001, ROEHRIG, 2013, LIMA-CAMARA, 2016, GOULD *et al.*, 2017, FIGUEIREDO, 2019).

Família/Vírus	Vetor Principal	Hospedeiro vertebrado
Togaviridae		
Chikungunya	<i>Aedes aegypti, A. albopictus</i>	Primatas não humanos, humanos
Mayaro	<i>Haemagogus spp, Aedes aegypti</i>	Primatas não humanos, humanos, aves
Sindbis	<i>Aedes spp., Culex pipiens, Culiseta spp.</i>	Aves
Encefalite equina oriental	<i>Culex spp., Aedes albopictus.</i>	Aves, equinos
Encefalite equina do ocidental	<i>Culex spp., Aedes spp.</i>	Aves, coelhos, equinos, roedores
Encefalite equina venezuelana	<i>Ochlerotatus taeniorhynchus, Culex spp., Haemagogus spp.</i>	Aves, coelhos, equinos, roedores
Flaviviridae		
Dengue sorotipos 1 a 4	<i>Aedes aegypti, Ae. albopictus</i>	Humanos
Zika	<i>Aedes aegypti, Ae. albopictus, Anopheles spp., Culex spp. Coquillettidia, Haemagogus spp.</i>	Primatas não humanos, humanos
Febre amarela	<i>Aedes aegypti, Ae. albopictus, Culex spp., Ochlerotatus spp., Haemagogus spp., Sabethes spp.</i>	Primatas não humanos, humanos
Encefalite de Saint Louis	<i>Sabethes belisarioi, Sabethes spp., Culex spp., Aedes spp.</i>	Aves, morcegos, humanos
Febre do oeste do Nilo	<i>Culex spp., Aedes spp., Mansonia spp., Coquillettidia spp.</i>	Aves, répteis, roedores, equinos, humanos
Rocio	<i>Psorophora ferox, Aedes scapularis, Culex spp.</i>	Equinos, humanos
Ilhéus	<i>Aedes spp., Psorophora spp.</i>	Aves, morcegos, roedores, primatas não humanos
Powassan	<i>Carapatos Ixodes spp., Dermacentor spp., Haemaphysalis spp.</i>	Roedores
Bunyaviridae		
Oropouche	<i>Aedes aegypti, Ae. albopictus, Culex quinquefasciatus, Culicoides spp.</i>	Aves, primatas não humanos
Encefalite da Califórnia	<i>Aedes spp., Culex spp., Coquillettidia spp., Culiseta spp.</i>	Coelhos, lebres
Vírus Jamestown Canyon	<i>Culex spp, Coquillettidia, Culiseta, Anopheles</i>	Mamíferos
Vírus da Lebre Snowshoe	<i>Culiseta spp., Anopheles spp.</i>	Lebres

1.5.1 Principais vírus de interesse circulantes nas Américas

1.5.1.1 FAMÍLIA *Togaviridae*, Gênero *Alphavirus*

Os vírus do gênero *Alphavirus* pertencem ao grupo IV da família *Togaviridae* e todos são envelopados possuindo estrutura esférica com tamanho entre 60 e 70 nm, possuindo RNA de fita simples e polaridade positiva contendo entre 11 e 12 mil nucleotídeos. São conhecidos 31 vírus capazes de promover infecções em vertebrados ((ICTV), [S.d.]), sendo que, apenas 2 vírus não são transmitidos por vetores insetos como o vírus da doença pancreática do salmão, que infecta salmões e trutas e o vírus do elefante marinho do Sudeste (SESV – Southern elephant seal virus) (FORRESTER *et al.*, 2012). A maioria dos vírus deste gênero quando acomete humanos promove febre, *rash*, artrite ou artralgia e em alguns casos, encefalite (FORRESTER *et al.*, 2012, POWERS, 2014).

1.5.1.2 Vírus Chikungunya (CHIKV)

Este vírus foi isolado pela primeira vez em 1953 em um paciente da Tanzânia durante uma epidemia que ocorreu entre os anos de 1952 e 1953. A doença provocada pelo vírus Chikungunya recebeu maior atenção no ano de 2005 quando surgiu uma epidemia parecida com a dengue nas Ilhas Camorras ao noroeste de Moçambique. Em 2006, no território francês de La Reunion, após um período intenso de chuvas, houve um aumento substancial no número de casos uma vez que o vírus teve aumentada sua capacidade de infectar o *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (POWERS, 2014). Esta epidemia que atingiu as ilhas do Oceano Índico levou a mais de 240 mil casos e 203 óbitos, no entanto, cabe ressaltar que, como houve casos reportados com sendo provocados pelo vírus da Dengue, o número de casos contabilizados pode estar subestimado. No ano de 2014 foi registrado o primeiro caso de CHIKV no Brasil, na cidade de Oiapoque, no Amapá e a partir de então, foram registrados mais casos de pessoas infectadas pelo país afora (MORRISON, 2014, LIMA-CAMARA, 2016).

Os vetores apontados como responsáveis pelo espalhamento do CHIKV são mosquitos do gênero *Aedes*, sendo que no continente Africano, *Aedes furcifer-taylori* (Edwards, 1913) e *Mansonia africana* (Theobald, 1901) são os principais vetores silvestres; na Europa, América do Norte e continente Asiático, *Ae. albopictus* está envolvido no ciclo urbano e no Brasil temos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Ae. albopictus* (MORRISON, 2014, POWERS, 2014, LIMA-CAMARA, 2016).

1.5.1.3 Vírus Mayaro (MAYV)

O vírus Mayaro (MAYV) é considerado um vírus oriundo do Velho Mundo por suas características genéticas. O MAYV foi isolado de trabalhadores florestais de Mayaro em Trinidade em 1954 e desde então, vem sendo encontrado em surtos esporádicos pela América do Sul, em países como Brasil, Equador, Peru, Suriname, Bolívia, Guiana Francesa e Trinidade sendo que, a maioria dos casos, ocorreu no Brasil. O MAYV é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Haemagogus* que habitam as copas das árvores mas, de acordo com ensaios em laboratório, também pode ser transmitido pelo *Ae. aegypti*, ressaltando-se que ainda se desconhece a eficiência da espécie como vetor para o MAYV (AUGUSTE *et al.*, 2015, SANTIAGO *et al.*, 2015). A maioria dos casos envolve trabalhadores que adentram as florestas, isso porque a doença é uma zoonose de primatas, que se infectam após a picada dos mosquitos vetores (PAULA *et al.*, 2012); é considerada também a possibilidade de que pássaros migratórios sejam infectados pelo vírus (TERZIAN *et al.*, 2015). O MAYV é capaz de promover grandes surtos epidêmicos como o que ocorreu no Brasil entre os anos de 1977 e 1978, com 55 casos confirmados em Belterra, Pará (PINHEIRO *et al.*, 1981).

1.5.1.4 Vírus Encefalite Equina Oriental – Eastern equine encephalitis vírus (EEEV)

Este vírus foi isolado pela primeira vez nos estados de Nova Jersey e Virginia nos EUA em 1933 a partir do cérebro de equinos durante um surto epidêmico. Desde então, foi evidenciado que se encontra distribuído pelo leste dos EUA acometendo equinos e alguns raros casos em humanos. O EEEV também é encontrado no México, Panamá, Brasil, Argentina e Guianas, sendo que o primeiro caso isolado na América Latina foi em um cavalo na Argentina em 1936 (GO 2014).

Os hospedeiros implicados em sua amplificação são os pássaros, mas os vetores são mosquitos em geral do gênero *Culex*; entretanto ele também já foi isolado de *Ae. albopictus* (GARDNER *et al.*, 2008, ARRIGO *et al.*, 2010, GO 2014).

1.5.1.5 Encefalite Equina Ocidental - Western equine encephalitis virus (WEEV)

Este vírus é encontrado na América do Norte e do Sul, sendo que ele possui diversas variantes antigênicas, principalmente na América do Sul. O WEEV foi isolado pela primeira vez em 1930 a partir do cérebro de cavalos com encefalite nos estados da Califórnia, Virgínia e Nova Jersey, nos EUA e também de uma criança infectada na cidade de Caracas, na Venezuela (LUSTIG *et al.*, 1988, ZACKS & PAESSLER, 2011, BERGREN *et al.*, 2014, HAHN, NGUYEN, DUC, *et al.*, [S.d.],).

Os vetores do WEEV são espécies do gênero *Culex*; na América do Norte o principal vetor é o *Culex tarsalis* (Coquillett, 1896) e *Culiseta melanura* (Coquillett, 1902), este último em áreas onde o *Cx. tarsalis* não está presente (BERGREN *et al.*, 2014, ZACKS & PAESSLER, 2011). Entretanto, o vírus já foi encontrado em outros vetores, sendo em, pelo menos, quatorze espécies do gênero *Aedes* e seis outras do gênero *Culex*. É descrito também que o vírus circula enzoonoticamente entre pequenas aves mantendo o ciclo entre elas e os vetores. Na América do Sul, supõe-se que o ciclo envolva mosquitos do gênero *Aedes* e pequenos roedores. Os equinos e humanos são os hospedeiros finais, ou seja, apesar do vírus ter sua replicação neles, não ocorre sua transmissão, talvez pela baixa taxa de replicação viral (PFEFFER & DOBLER, 2010).

1.5.1.6 Vírus da Encefalite Equina Venezuelana – Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)

Dentre as alfaviroses promotoras da encefalite equina, este é considerado mais importante devido a sua patogenicidade sendo relatados vários surtos nas Américas do Sul e Central. Assim como os demais vírus deste grupo, ele foi isolado pela primeira vez a partir de cavalos doentes durante um surto de encefalite; este isolamento se deu em 1936 na Colômbia e Venezuela (BECK & WYCKOFF, 1938, ZACKS & PAESSLER, 2011, WEAVER *et al.*, 2013). É relatado que o *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) seja o principal vetor, junto com os mosquitos do gênero *Culex* (PFEFFER & DOBLER, 2010, ZACKS & PAESSLER, 2011, VITTOR *et al.*, 2016). Este vírus circula de forma endêmica nas Américas Central e do Sul entre os vetores e roedores, mas também foi detectado em pássaros, principalmente em garças (PFEFFER & DOBLER, 2010). Um fato que chama atenção e que contribui muito para a alta infeciosidade é que o VEEV pode ser transmitido por aerossol. Este fato levou a vários acidentes de laboratório e também, a ser usado como vírus para o desenvolvimento de uma arma biológica pelos EUA e antiga União Soviética durante o período da Guerra Fria (ZACKS & PAESSLER, 2011, WEAVER *et al.*, 2013). Apesar disso, não foi relatado nenhum caso de transmissão humano a humano por aerossol (WEAVER, *et al.*, 2013).

1.5.1.7 Vírus Sindbis (SINV)

O vírus Sindbis (SINV) faz parte do complexo da Encefalite Equina do Oeste (WEE) e tem como vetores os insetos das espécies *Culex*, *Aedes* e *Culiseta* sendo que, os *Culex* spp. são considerados os principais vetores. Justamente *Aedes* é considerado vetor que pode promover

a dispersão do SINV entre aves e humanos nos centros urbanos e peri-urbanos. Os reservatórios do vírus Sindbis compreendem várias espécies de aves, especialmente os passeriformes. Este vírus está amplamente distribuído nas áreas tropicais, subtropicais e temperadas, principalmente pelo Velho Mundo (AZARI-HAMIDIAN *et al.*, 2019, LUNDSTRO & SEMMLER, 2019) e as aves tem boa participação no espalhamento do mesmo ao redor do mundo (LING *et al.*, 2019).

1.5.2 FAMÍLIA *Flaviviridae*

Os *Flavivirus* que são patogênicos aos humanos podem ter como vetores mosquitos ou carapatos (PERERA-LECOIN *et al.*, 2014, HOLBROOK, 2017). Os *Flavivirus* têm como característica serem vírus envelopados contendo uma fita simples de RNA com polaridade positiva, de aproximadamente 11 Kb, esta fita codifica três proteínas estruturais sendo elas o capsídeo, proteína de pré-membrana, envelope e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). O gênero *Flavivirus* engloba mais de 53 espécies, sendo 40 patogênicas aos humanos; 14 destas espécies não tem vetor conhecido, sendo descritas na literatura como No Known Vector (NKV) (ALKAN *et al.*, 2015, MOUREAU *et al.*, 2015, BLITVICH & FIRTH, 2017, (ICTV), [S.d.]). Os *Flavivirus* são classificados em complexos e sub complexos antigênicos os quais são sorologicamente, geneticamente e etiologicamente relacionados (MOUREAU *et al.*, 2015). Seguindo esta linha, temos pelo menos 3 complexos de *Flavivirus* que são considerados importantes patógenos para os humanos, sendo eles os complexos transmitidos por mosquitos, os complexos transmitidos por carapatos e o complexo de vetores desconhecidos denominado NKV (HUHTAMO *et al.*, 2014, MOUREAU *et al.*, 2015, HEINZ & STIASNY, 2017).

O complexo dos *Flavivirus* transmitidos por mosquitos é capaz de infectar uma variedade de animais e humanos, sendo que os pássaros são considerados os mais importantes no ciclo da transmissão enzoonótica. Os mosquitos apontados como vetores mais importantes neste complexo são os *Culex* e *Aedes*. Dos vírus que fazem parte deste grupo e que tem importância nas Américas são: vírus da febre amarela, vírus da dengue, vírus zika, vírus da febre do oeste do Nilo (WNF), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e vírus Rócio (MOUREAU *et al.*, 2015, HEINZ & STIASNY, 2017, HOLBROOK, 2017).

O complexo dos vírus transmitidos por carapatos tem os roedores como os mais importantes no ciclo de transmissão enzoonótica e os principais vetores carapatos são do gênero *Ixodes*, *Dermacentor* e *Haemaphysalis*. Os vírus que fazem parte deste grupo e presente na América do Norte é o vírus Powassan (HUHTAMO *et al.*, 2014, MOUREAU *et al.*, 2015,

HEINZ & STIASNY, 2017).

No complexo NKV estão os vírus que foram encontrados em pequenos animais como roedores e mamíferos como os morcegos, por exemplo os vírus Rio Bravo, que foi encontrado em morcegos e o vírus da Leucoencefalite de Mitose de Montana (MMLV) (HUHTAMO *et al.*, 2014, ALKAN, ZAPATA, *et al.*, 2015, MOUREAU *et al.*, 2015, BLITVICH & FIRTH, 2017).

As doenças promovidas pelos *Flavivirus* causam febre branda a elevada, quadro de sintomatologia parecida como gripe, aparecimento de rash, febre hemorrágica e encefalite.

1.5.2.1 Vírus da Dengue (DENV)

O vírus da dengue parece ter sua origem no continente Africano e teve sua entrada nas Américas via embarcações que transportavam escravos (BRAACK *et al.*, 2018). Atualmente a dengue é considerada um problema de saúde pública nas áreas tropicais e faz parte das doenças reemergentes na América Latina, sendo que a primeira onda de seu reaparecimento ocorreu entre os anos de 1980 e 1990 e que contribuiu para as epidemias provocadas pelos seus 4 subtipos virais classificados de DENV-1 a DENV-4. No Brasil o ressurgimento da dengue se deu inicialmente em 1982 em uma pequena cidade da região de Boa Vista em Roraima, depois em 1986 no Rio de Janeiro, onde foi detectado o DENV-1 (TEIXEIRA *et al.*, 2013). O vírus da dengue faz parte dos *Flavivirus* considerados como causadores de febre hemorrágica, que é o quadro mais grave da doença (BÄCK & LUNDKVIST, 2013, RODRIGUEZ-ROCHE & GOULD, 2013).

O principal vetor do vírus da dengue é apontado como sendo o *Ae. aegypti* sendo que outros mosquitos do mesmo gênero podem atuar como vetores como o *Ae. albopictus*, *Ae. polynensis* (Marks, 1951) e *Ae. niveus* (Ludlow, 1903) (BÄCK & LUNDKVIST, 2013, RODRIGUEZ-ROCHE & GOULD, 2013, KHETARPAL & KHANNA, 2016).

1.5.2.2 Vírus zika (ZKV)

O vírus da zika (ZKV) foi descoberto e identificado em 1947 em uma floresta em Uganda e se supunha que estava restrito ao continente Africano e que não representava uma ameaça à saúde pública e não tinha grandes implicações clínicas (SAFRONETZ *et al.*, 2017, YAREN *et al.*, 2017).

O primeiro caso confirmado de zika no Brasil ocorreu em maio ano de 2015, sendo posteriormente, sua presença confirmada em 26 estados da união federativa do Brasil (LONGOSZ *et al.*, 2014, ZANLUCA *et al.*, 2015).

O vetor com participação comprovada no ciclo do ZKV é *Ae. aegypti*, entretanto no ciclo silvestre temos vetores como *Anopheles*, *Culex*, *Lutzia*, *Coquillettidia*, *Mansonia* e provavelmente outros gêneros de insetos (ORIOLI *et al.*, 2005, EPELBOIN *et al.*, 2017, SAFRONETZ *et al.*, 2017, YAREN *et al.*, 2017).

1.5.2.3 Febre amarela – Yellow fever (YF)

Assim como o DENV, o vírus da febre amarela foi introduzido nas Américas durante o período da escravidão por volta dos anos de 1600, onde escravos infectados com o vírus e *Ae. aegypti* foram importados no transporte por navio. A epidemia esteve presente entre os séculos XVII e XX e só foi controlada com a erradicação do mosquito vetor na maioria dos países das Américas Central e do Sul. Entre os anos de 1950 e 1960 já não havia mais casos frequentes da febre amarela urbana, o mesmo sendo válido para os casos de Dengue (GUBLER, 2001, GARDNER & RYMAN, 2015, DONALISIO, RICARDO, ZUBEN, 2017, BRAACK *et al.*, 2018b).

O vírus da febre amarela é mantido nas áreas silvestres onde o mesmo circula principalmente entre os vetores dos gêneros *Haemagogus*, *Sabathes* e *Aedes* tendo os primatas como principal reservatório, porém, existe também o ciclo urbano, que apresenta a maior preocupação em áreas densamente povoadas e neste ciclo, o *Ae. aegypti* é o principal vetor (GUBLER, 2001, GARDNER & RYMAN, 2015, DONALISIO, RICARDO, ZUBEN, 2017, KUNO *et al.*, 2017). Também já foi evidenciada a presença do vírus da febre amarela em carapatos na espécie *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794), sendo possível a transmissão vertical destes carapatos e a capacidade de transmitir a infecção a macacos. Apesar desta evidência, não se tem ao certo se a participação dos carapatos no ciclo tem a mesma importância que os insetos possuem (HANLEY *et al.*, 2014).

1.5.2.4 Encefalite de Saint Louis – Saint Louis encephalitis virus (SLEV)

O vírus causador da Encefalite de Saint Louis (SLEV) faz parte do complexo dos vírus da Encefalite Japonesa. O SLEV é considerado de grande importância nos EUA; se encontra disperso por todo continente Norte Americano e também já foi encontrado circulando pela América Central e América do Sul; é considerado um vírus emergente na América do Sul (SCHWEITZER *et al.*, 2009b, BORGES *et al.*, 2015). O nome deste vírus foi dado em razão de um surto epidêmico provocado pelo mesmo em 1933 na cidade de Saint Louis no estado de Missouri e, desde esta época foram relatados casos no Canadá, EUA e México (SCHWEITZER *et al.*, 2009b, MAIA *et al.*, 2014, BORGES *et al.*, 2015).

O SLEV foi identificado pela primeira vez em 1960 no Brasil em *pools* de mosquitos *Sabethes belisarioi* (Neiva, 1908) coletados no estado do Pará, e posteriormente em 1967 e 1969 em ratos sentinelas, roedores selvagens e pássaros no estado de São Paulo. Os números de casos humanos infectados pelo SLEV no Brasil ainda são baixos, sendo um encontrado no Pará em 1978, um no Vale do Ribeira em São Paulo em 2005 e 20 pacientes em Ribeirão Preto, também em São Paulo (MAIA *et al.*, 2014, BORGES *et al.*, 2015). Os poucos casos relatados da doença no Brasil, provavelmente se devem a fatores como: doença sub-clínica; quadro semelhante ao de outras arboviroses, especialmente dengue levando a suposição errada sem o diagnóstico laboratorial adequado e poucas pesquisas quanto a prevalência do mesmo (CAROLINA *et al.*, 2011, SILVA *et al.*, 2013, MAIA *et al.*, 2014, NUNES *et al.*, 2018).

O SLEV já foi encontrado em *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922), *Culex* spp. (BORGES *et al.*, 2015) mas também existem outros prováveis vetores como espécies dos gêneros *Aedes*, *Mansonia* e *Sabethes* (BURGUEÑO *et al.*, 2013, NUNES *et al.*, 2018).

1.5.2.5 Vírus da Febre do Oeste do Nilo ou Febre Ocidental do Nilo – West Nile virus (WNV)

A Febre do Oeste do Nilo, também chamada de Febre Ocidental do Nilo teve seu agente isolado em 1937 a partir do sangue de uma mulher de 37 anos em Uganda, África. A descoberta foi um achado pois os pesquisadores estavam investigando a elevada incidência da resposta imune a febre amarela e a tentativa de isolar o vírus, e esta paciente apresentava quadro sugestivo de ser febre amarela, com febre de 38°C e sonolência (SMITHBURN *et al.*, 1940). Este vírus era apenas conhecido no velho mundo - África, Ásia e Austrália até que emergiu no novo mundo, mais especificamente em Nova York no ano de 1999. A partir de então, em cerca de 3 anos, ele se dispersou rapidamente por todo o continente Norte Americano e posteriormente chegou a América do Sul (LANCIOTTI *et al.*, 2000, CUPP *et al.*, 2008, ROEHRIG, 2013, CHANCEY *et al.*, 2015).

Os vetores envolvidos na transmissão do WNV são mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*, *Coquillettidia*. Em geral, os melhores vetores são os mosquitos que fazem o repasto em aves e mamíferos e as aves são consideradas como o principal reservatório do vírus. O ciclo do WNV envolve mosquitos como vetores e vertebrados como aves, répteis e mamíferos como hospedeiros. Com exceção das aves, os demais hospedeiros vertebrados são considerados como reservatórios finais uma vez que, não conseguem transmitir o vírus para os mosquitos (CHANCEY *et al.*, 2015, SULE & OLUWAYELU, 2016). Além do ciclo de transmissão por vetores, foi observado nos EUA que o WNV pode ser transmitido pela transfusão sanguínea,

isso fez com que todo doador de sangue passasse a ser investigado para a presença do vírus (PFEFFER & DOBLER, 2010, ROEHRIG, 2013, CHANCEY *et al.*, 2015).

1.5.2.6 Vírus Rocio (ROCV)

Este vírus foi detectado no Brasil entre os anos de 1975 e 1976 na região litorânea do estado de São Paulo chegando até o Vale do Ribeira, promovendo uma epidemia de encefalite e desde então foi encontrado em equinos na região do Pantanal de Mato Grosso (LOPES *et al.*, 1981, COIMBRA *et al.*, 2008, CAMPOS *et al.*, 2014a).

O ciclo de transmissão deste vírus parece envolver as espécies *Psorophora ferox* (von Hunboldt, 1819) e *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) e talvez o gênero *Culex* spp. como vetores, tendo equinos e humanos como reservatórios que vivem próximos ao ambiente florestal (MITCHELL *et al.*, 1986, COIMBRA *et al.*, 2008, ELLWANGER *et al.*, 2017).

1.5.2.7 Vírus Ilhéus (ILHV)

O vírus Ilhéus (ILHV) foi isolado em 1944 durante uma investigação para febre amarela na cidade de Ilhéus na Bahia. O seu isolamento se deu a partir mosquitos *Aedes* spp. e *Psorophora* spp. (AZEVEDO *et al.*, 2010, KENNEY *et al.*, 2013). Este vírus já foi encontrado na América do Sul em países como Panamá, Trinidade, Colômbia, Guiana Francesa, Equador e Bolívia ((ICTV), [S.d.], SIMMONDS *et al.*, 2018).

O ILHV, apesar dos poucos estudos realizados, além de ser encontrado em humanos, já foi encontrado em uma grande variedade de animais, incluindo-se morcegos, pássaros, macacos e roedores demonstrando que ele é mantido em ciclos zoonóticos (AZEVEDO *et al.*, 2010, KENNEY *et al.*, 2013). Ainda se desconhece a capacidade de infectar animais domésticos, contudo, já foram encontrados anticorpos para o ILHV em equinos da região do Pantanal em Mato Grosso, região Centro Oeste do Brasil sendo constatado em uma pesquisa a existência do vírus em mosquitos que se alimentam somente desses animais (KENNEY *et al.*, 2013). Os vetores do ILHV parecem ser mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Psorophora*, *Culex*, *Sabettus*, *Haemagogus* e *Trichoprosopon* (AZEVEDO *et al.*, 2010, VENEGAS *et al.*, 2012, KENNEY *et al.*, 2013).

1.5.3 Família Bunyaviridae

A família *Bunyaviridae* é dividida em 5 gêneros, sendo eles, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, Vírus Hataan, *Tospovirus* e *Bunyavirus* (ALATOOM, ADNAN, PAYNE, 2009, PAUVOLID-CORR *et al.*, 2017).

O gênero *Orthobunyavirus* pertence a família *Peribunyaviridae*, ordem Bunyavirales e, atualmente possui 49 espécies de vírus conhecidos (GEDDES *et al.*, 2018, CAMARÃO *et al.*, 2019).

Os *Bunyavirus* possuem envelope lipídico, possuem RNA tri segmentado, fita simples, polaridade negativa; estes segmentos são denominados grande (L), médio (M) e pequeno (S), com os tamanhos aproximados de 6.9Kb, 4.5Kb e 1.0Kb (LAMBERT & LANCIOTTI, 2009, NUNES *et al.*, 2018; CAMARÃO *et al.*, 2019).

1.5.3.1 Vírus Oropouche (OROV)

Este vírus é o agente da Febre Oropouche que promove quadro clínico indiferenciado das demais arboviroses. Os casos relatados de infecção por este vírus se deram no Brasil, Panamá, Peru e Trinidad Tobago. No Brasil, desde o seu isolamento em 1980, existem diversos relatos de casos na região do Pará, Rondônia e Mato Grosso (ALATOOM, ADNAN, PAYNE, 2009, FERNANDO *et al.*, 2017).

O espalhamento do vírus está relacionado aos vetores amplificadores assim como ao trânsito de pessoas para áreas endêmicas; por este motivo, temos dois ciclos de manutenção do vírus, o ciclo silvestre e o ciclo urbano. O ciclo silvestre envolve a participação de aves, preguiças, primatas e táxons dos gêneros *Aedes* e *Culicoides* sendo que também existe a suspeita de que mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) possam ter a participação na transmissão (CARDOSO *et al.*, 2015, FERNANDO *et al.*, 2017), mesmo assim, segundo Fernando *et al.* (2017), o principal vetor deste vírus ainda é desconhecido.

1.5.3.2 Vírus da Encefalite da Califórnia, Vírus Jamestown Canyon e Vírus da Lebre Snowshoe

Estes vírus pertencem ao sorogrupo dos vírus da Califórnia, que estão relacionados ao grupo dos Orthobunyavirus na família *Peribunyaviridae* ordem Bunyavirales (ALATOOM, ADNAN, PAYNE, 2009, LUDWIG *et al.*, 2019).

Apesar de não haver relatos dos mesmos em nosso país, eles compartilham de espécies de vetores existentes aqui como *Aedes*, *Culiseta*, *Coquillettidia* e *Anopheles*, além disso, devido a maior facilidade do trânsito de pessoas entre as diversas cidades, e as mudanças climáticas que vem ocorrendo em nosso planeta, são fatores que podem vir contribuir no espalhamento destes vírus, sendo necessário estarmos alertas para montar mecanismos de detecção e prevenção (PABBARAJU *et al.*, 2009, PASTULA *et al.*, 2015, WEBSTER *et al.*, 2017, EVANS & PETERSON, 2019, LUDWIG *et al.*, 2019).

2.0 OBJETIVO PRINCIPAL:

Estudar a diversidade de Culicidae e detectar a circulação de arbovírus em áreas com diferentes níveis de preservação no domínio de Mata Atlântica dos Municípios de Nova Iguaçu, Casimiro de Abreu, Silva Jardim e Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, avaliando o risco de emergência e transmissão de arboviroses.

2.1 Objetivos Específicos:

1. Avaliar a distribuição, abundância, sazonalidade e correlacionar as variáveis climáticas com as espécies vetores e o efeito de múltiplas imersões de ovos de mosquitos em remanescente de Mata Atlântica da Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu. Este objetivo permite compreender como as condições climáticas influenciam a dinâmica populacional dos vetores, permitindo assim, identificar padrões para o controle de vetores e patógenos transmitidos por eles.
2. Avaliar a taxa de eclosão de ovos de culicídeos na primeira imersão comparada com imersões posteriores por estação climática do ano, analisar as espécies com importância médica por armadilha de ovitrampa e a proporção de fêmeas e machos por espécie em remanescente de Mata Atlântica da Fazenda Três Montes, município de Casimiro de Abreu. Neste objetivo visamos verificar a eficácia das estratégias de monitoramento e controle identificando quais espécies apresentam maior dominância, diversidade e equabilidade, a fim de gerenciar os riscos de dispersão dos insetos.
3. Analisar a distribuição das espécies em diferentes alturas, tendência do número de ovos ao longo dos meses e compreender como a altura e variáveis ambientais afetam a abundância de ovos de mosquitos na área da Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim.
4. Determinar a composição faunística de imaturos de culicídeos quanto à diversidade, abundância, dominância, equabilidade e influência das variáveis ambientais por criadouro na área do sítio Terra Boa, município de Silva Jardim. Este estudo é importante para mapear a biodiversidade local permitindo compreender a estrutura das comunidades de mosquitos, podendo facilitar o controle dessas populações vetoras.
5. Avaliar a fauna de culicídeos quanto à abundância, riqueza, dominância, diversidade e equabilidade e a análise da eficácia das armadilhas de Shannon, CDC e Técnica de Armadilha Humana Protegida (TAHP) na área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu. Buscamos caracterizar as comunidades de mosquitos na reserva a fim de verificar as diferenças entre uma área em recuperação, com maior presença antrópica e outra área mais preservada com menor presença de humanos.

6. Analisar a infecção natural em populações de mosquitos por alguns arbovírus patogênicos ao homem nos diferentes fragmentos de Mata Atlântica nos municípios de Nova Iguaçu (Sítio Boa Esperança) e Casimiro de Abreu (Fazenda Três Montes). Este objetivo é crucial para contribuir com a vigilância epidemiológica e prevenção de surtos de patógenos transmitidos pelos vetores.

Todos estes objetivos analisados em diferentes áreas, são abordados de forma integrada visando ampliar o conhecimento sobre a ecologia dos mosquitos na Mata Atlântica e também, fornecer informações valiosas para a saúde pública e conservação ambiental.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

Toda a pesquisa foi realizada de acordo com a licença científica número 44333 fornecida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Chico Mendes de Biodiversidade Conservação (ICMBio), Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO). Os mosquitos foram coletados com o consentimento e cooperação de proprietários, moradores, e autoridades locais. Todos os membros da equipe utilizaram Equipamento de Proteção Individual (EPI), garantindo a segurança dos pesquisadores durante as atividades de campo e vacinados contra a febre amarela e cientes dos riscos potenciais nas áreas em estudo.

3.2 Etapas executadas no período de estudo visando o alcance dos objetivos

Durante todo o decorrer deste estudo, conduzimos uma revisão abrangente da literatura, consultando periódicos, teses, capítulos de livros e websites, conforme evidenciado nas citações incorporadas neste trabalho. Paralelamente à análise dessas fontes, empregamos informações geradas internamente para conduzir uma avaliação aprofundada dos aspectos biológicos, ecológicos, taxonômicos e da presença de arbovírus nas populações de mosquitos capturados nos fragmentos de Mata Atlântica sob investigação.

A abordagem integrativa desta pesquisa foi efetuada por meio de consultas em diversas bases de dados eletrônicas, tais como Medline, Cinahl, Embase, Lilacs, Cochrane Controlled Trials Database, SciSearch e PubMed. Essa revisão bibliográfica foi incorporada ao longo do desenvolvimento do projeto, com o intuito de contextualizar e enriquecer as informações coletadas.

A riqueza de dados compilados foi organizada de maneira sistemática, resultando na criação de um Banco de Dados do tipo Metadados. Este levantamento abrangente incluiu uma análise taxonômica da família Culicidae, com foco especial no gênero *Haemagogus*, destacando dados primários de entomologia relacionados a bioecologia e à detecção de arbovírus em mosquitos.

3.3 Áreas de estudo

O estudo foi desenvolvido em diferentes remanescentes de Mata Atlântica, estado do Rio de Janeiro, Brasil (Quadro 2), sendo as amostragens realizadas mensalmente, no período de agosto de 2018 a fevereiro de 2024, em três dias consecutivos, com intervalo mínimo de 15

dias entre elas havendo, por segurança no trabalho de campo, a presença de pelo menos 4 membros da equipe por coleta.

Essas áreas foram escolhidas por serem remanescentes da Mata Atlântica ainda preservados, sendo a única exceção, a coleta realizada na Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu, pois esta é uma reserva que vem sendo recuperada a mais de 10 anos, pois antes era usada para criação de gado e atualmente nos seus arredores existem áreas de plantação de gramíneas, vegetais e frutas como jiló, beringela, goiaba. Devido a esse uso, ela apresenta a possibilidade de fornecer resultados diferentes e ao mesmo tempo, servir de comparação com as demais áreas.

Quadro 2 – Áreas de amostragem nos diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro com sua geolocalização.

Localidade	Latitude	Longitude	Municipio
Fazenda Três Montes	22°31'40.1"S	42°02'58.6"W	Casimiro de Abreu
Fazenda Três Irmãos Sítio Terra Boa	22°36'49.1"S 22°36'32.5"S	42°27'34.1"W 42°29'13.3"W	Silva Jardim
Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu	22°45'12.12"S	42°73'89.48W	Cachoeiras de Macacu
Sítio Boa Esperança	22°65'68.41"S	43°37'65.86"W	Nova Iguaçu

As áreas de Mata Atlântica estudadas, que compreendem os municípios de Casimiro de Abreu, Silva Jardim e Cachoeiras de Macacu fazem parte da área de proteção ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão Dourado, criada em 2009 e sendo gerenciadas pelo Instituto Chico Mendes de conservação da Biodiversidade (<https://uc.socioambiental.org/en/arp/3202>) sendo compostas por Floresta Ombrófila Densa, que abriga grande quantidade de cachoeiras, presentes em montanhas, picos, morros e morrotes de perfis arredondados e baixadas. A cobertura vegetal de florestas ocorre em montanhas na altura entre 500 e 1500m e na área submontana estando presente em encostas de até 500m e ao seu redor, estão as áreas de baixada e os morros (IBGE, 2019, 2021, BORÉM & SANTOS, 2024). A área de Mata Atlântica, conta com a presença de uma fauna diversificada como a onça parda (*Puma concolor*, Lineu, 1771), lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815), primatas, especialmente do mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus, 1776) que transita nesta área além de diversas aves,

algumas migratórias, répteis, anfíbios e insetos. Infelizmente estas áreas são sabidamente perturbadas por atividades antrópicas prejudiciais como atividades agropecuárias, uso indiscriminado de agrotóxicos, queimadas, exploração da flora e caça a fauna. A distribuição das chuvas nessa região apresenta forte variação promovida pelas massas de ar que aparecem na região ao longo do ano devido às características do meio ambiente que inclui as bacias e a região costeira próxima, a saber Cabo Frio e Arraial do Cabo. Durante os meses de novembro a abril (estação do verão) ocorre a predominância da massa de ar Continental Equatorial determinando o período abafado e chuvoso; durante os meses de setembro a novembro (estação da primavera) costuma ocorrer a passagem de Frentes Polares Atlânticas caracterizando o período mais seco e durante o resto do ano tem-se a presença da massa de ar Tropical Atlântica. A região de Silva Jardim e Casimiro de Abreu são altamente influenciadas pelo Oceano Atlântico e apresentam uma temperatura média de 26,8°C, umidade relativa de 56% e a média anual de precipitação entre 2000 e 2500mm. Os maiores níveis de precipitação ocorrem de outubro a março, com variação de temperatura entre 17°C até 32°C. Na região de Cachoeira de Macacu se encontra a cabeceira do Rio São João e por onde passa o Rio Guapiaçu, a precipitação anual se situa entre 1500 e 2000mm e a temperatura varia entre 17°C e 30°C (“Weatherspark”, [S.d.], “Meteoblue”, [S.d.], FRAGA & RIBEIRO, 2012, INMET, 2022).

Outra área de Mata Atlântica estudada, o Sítio Boa Esperança localizado no município de Nova Iguaçu, tem predomínio de propriedades rurais com baixo índice populacional se comparado ao centro de Nova Iguaçu. O Sítio Boa Esperança faz parte da Reserva Biológica do Tinguá, que foi criada em 1989 e é administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio). A Unidade de Conservação Rebio do Tinguá, que faz parte da Unidade Ambiental da Escarpa da Serra do Mar, ocupa uma área de 26 mil hectares abrangendo seis municípios: Nova Iguaçu, Duque de Caxias, Petrópolis, Miguel Pereira, Queimados e Japeri, sendo que os dois últimos têm áreas inclusas na Zona de Amortecimento. A área da Reserva Biológica do Tinguá, apresenta vegetação composta pela Floresta Ombrófila Densa, apresentando formações de terras baixas, submontana, montana e altomontana comportando nascentes de rios e áreas florestais importantes para a manutenção da qualidade de vida da região. A vegetação apresenta grande diversidade, tendo o registro de 1310 espécies (1140 angiospermas, 169 samambaias e licófitas e 1 gimnosperma). Infelizmente a mesma apresenta-se alterada em diversos pontos dada a proximidade de alguns centros urbanos (BOCHORNY *et al.*, 2023). Assim como a área da Bacia do Rio São João, algumas espécies ameaçadas podem ser encontradas, destacando-se o gavião-pomba (*Amadonastur lecernulatus*, Temminck, 1827), águia-cinzenta (*Urubutinga coronata*, Vieilot, 1817), muriqui-do-sul

(*Brachytes aracnoides*, Geoffroy, 1806), gato-maracajá (*Leopardus pardalis mitis*, Linnaeus, 1758), morcego vermelho (*Myotis ruber*, Geoffroy, 1806), onça-parda (*Puma concolor*), onça-pintada (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) e primatas como os *Callitrix aurita* (Moojen, 1950), *Alouatta fusca* (Humboldt, 1812) - bugio e o *Cebus apella* (Linnaeus, 1758) - macaco-prego. Este último é raro e só pode ser encontrado em trechos pouco perturbados pela ação antrópica. Apesar de não serem nativos dessa região, já que são originários da região Norte e Nordeste do Brasil, também se encontram os saguis *C. jacchus* (Lineu, 1758) e *C. pennicillata* (Geoffroy, 1812) (MMA/IBAMA, 2006, ICMBIO 2015).

Em relação ao clima, a região de Nova Iguaçu, apresenta clima subtropical com inverno seco e verão quente tropical chuvoso de região florestal, com temperatura média de 23,4°C. A média anual de precipitação é estimada em 1595,3mm (ICMBIO 2015, INMET, 2021). Durante o verão, a precipitação média é de 208,4mm, sendo mais intensa em janeiro, já durante o inverno 62,5mm, sendo julho o mês mais seco (ICMBIO 2015, INMET, 2021).

A amostragem de ovos de Culicidae foi realizada em três localidades, no município de Casimiro de Abreu, que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Rio São João: Fazenda Três Montes e Fazenda Três Irmãos e no município de Nova Iguaçu, no Sítio Boa esperança. A primeira foi amostrada entre agosto de 2018 e outubro de 2022, sendo a cada coleta, instaladas 15 armadilhas ovitrampas.

A área de coleta foi realizada em áreas próximas a regiões com notificação de um surto grave da Febre Amarela em humanos ocorrido entre os anos de 2016-2018 (DIETZ *et al.*, 2019). A fazenda Três Montes, está situada junto ao Morro São João, uma elevação de aproximadamente 816m, formado por magma cristalizado, (MOTA *et al.*, 2009) encoberto pela vegetação nativa de Mata Atlântica, sendo circundado por um relevo parcialmente plano que serve de local de campo e pastagem (Figura 3).

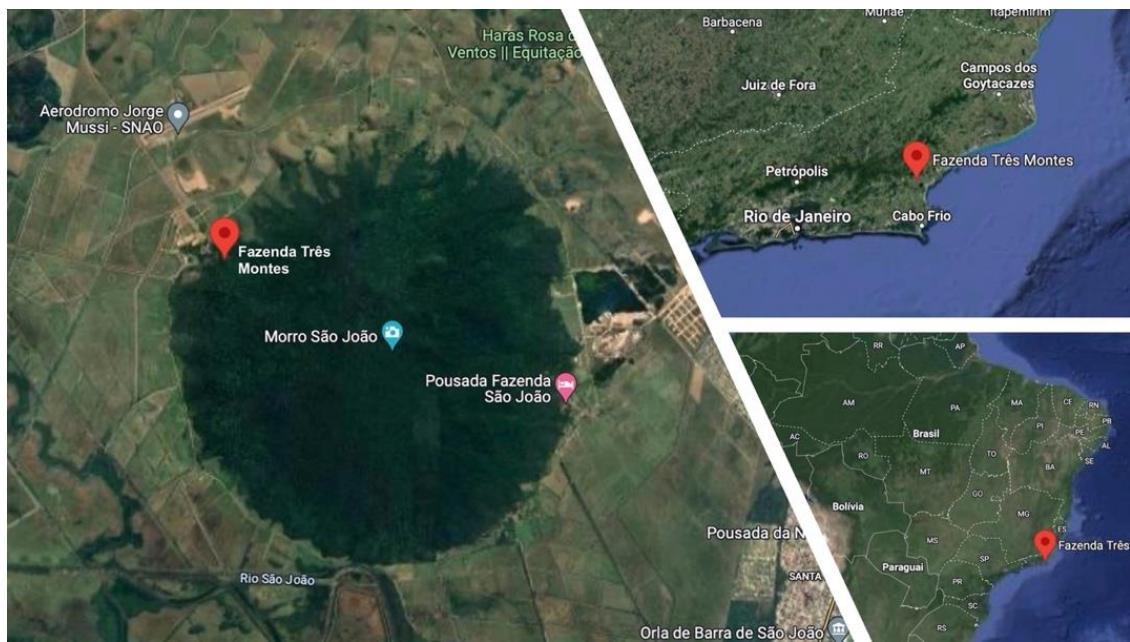


Figura 3. Vista panorâmica da Fazenda Três Montes, município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro. Em 23/02/2023 Fonte: Google Earth.

Já a Fazenda Três Irmãos (figura 4) foi amostrada entre os meses de março de 2020 e outubro de 2022 para o estudo dos vetores de arbovírus.

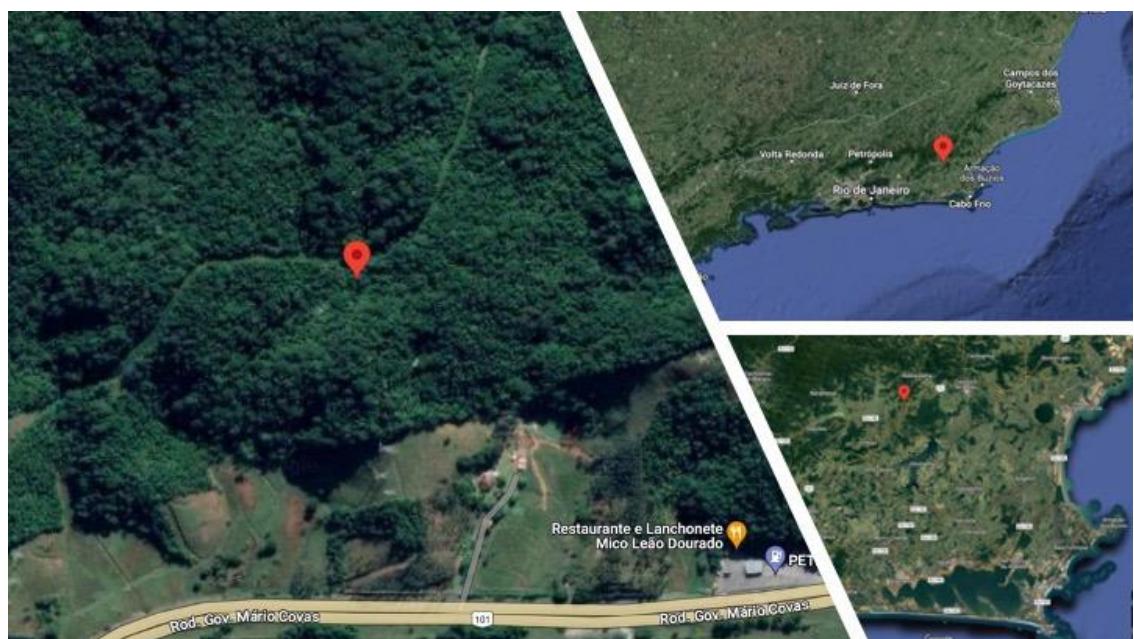


Figura 4. Vista panorâmica da Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. Em 14/06/2023 Fonte: Google Earth.

O sítio Boa Esperança, localizado no município de Nova Iguaçu, e se situa na região da Reserva Ecológica do Tinguá e se localiza a aproximadamente 30Km do centro da cidade do Rio de Janeiro. Esse sítio fez parte dos estudos com ovos de culicídeos e da circulação de arboviroses (Figura 5).

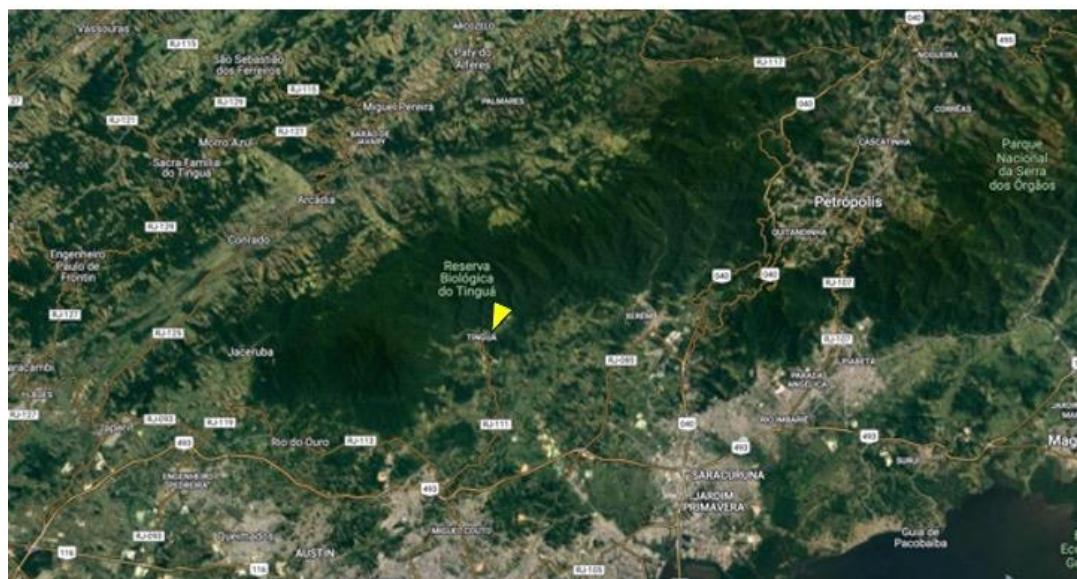


Figura 5 - Mapa apresentando a região que engloba a Reserva Biológica do Tinguá. O ponto amarelo indica a localização aproximada do Sítio Boa Esperança. Fonte: google maps.

Para a avaliação de larvas e pupas de culicídeos, a amostragem foi realizada de setembro de 2022 a março de 2023 no sítio Terra Boa localizado no município de Casimiro de Abreu, também fazendo parte da Bacia Hidrográfica do rio São João, estado do Rio de Janeiro (figura 6).

Para a avaliação da fauna de culicídeos adultos, o estudo foi realizado entre os meses de março de 2023 a fevereiro de 2024, na Trilha Amarela e na Trilha Verde da Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu (REGUA) que corresponde a mais um fragmento da Mata Atlântica da Bacia Hidrográfica do rio São João e fica situado no município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro (Figuras 7 e 8).

A REGUA apresenta atualmente 6 trilhas, quase todas identificadas pelo nome de uma cor, sendo elas: Amarela, Marrom, Verde, Vermelha, Lilás e a mais recente, recebeu o nome da gestora do parque, a Trilha Raquel.

A trilha Amarela se trata de uma área plana que compunha uma área de pastagem de gado até o início dos anos 2000 e começou a ter sua vegetação recomposta em 2005 com a flora

local, a partir de mudas de outras áreas de mata da reserva. Essa trilha, circunda um lago artificial sendo localizada perto da sede da reserva (Figura 7).



Figura 6. Vista panorâmica da área de amostragem do Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. Em 13/06/2023 Fonte: Google Earth.

A trilha Verde é uma área submontanhosa, com mata ainda nativa mais densa, e com terreno rochoso de subida, apresentando alguns rios não perenes e perenes ao longo do seu percurso (Figura 8).



Figura 7. Vista panorâmica da área de amostragem e localização das armadilhas CDC e Shannon instaladas na Trilha Amarela da REGUA, Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro. Em 13/06/2023 Fonte: Google Earth.

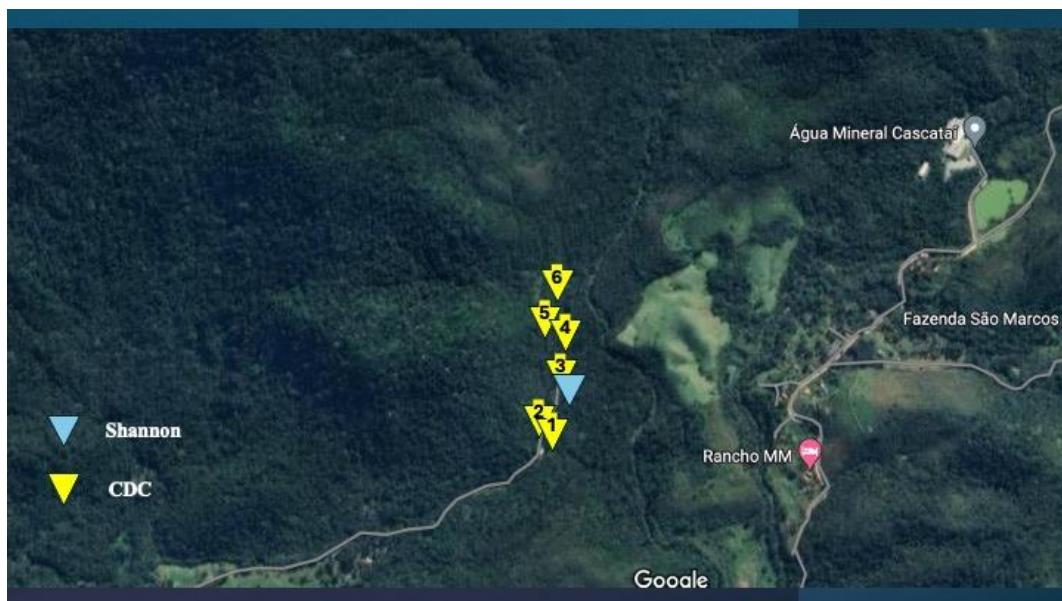


Figura 8. Vista panorâmica da área de amostragem e localização das armadilhas CDC, Shannon e Ovitrampas instaladas na Trilha Verde da REGUA, Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro. Em 13/06/2023 Fonte: Google Earth.

3.4 Amostragem de mosquitos

3.4.1 Coleta de ovos

As coletas dos ovos foram realizadas utilizando armadilhas de ovitrampas compostas por potes pretos de 500 mL, sem tampa, parecidos com vasos de planta (Figura 9A). Nesse recipiente foi adicionado água natural, restos de folhas (serrapilheira) e resíduos orgânicos encontrados no solo da floresta além de quatro palhetas de Eucatex (pás de oviposição) medindo 2,5 cm x 14 cm, dispostas verticalmente e fixadas por um clipe nº2 (Figura 9B) (ALENCAR *et al.*, 2022). As ovitrampas foram instaladas nas alturas de 2m, 4m e 6m em relação ao nível do solo para verificar a distribuição das espécies.

As palhetas foram levadas ao laboratório sendo imersas em bandejas com água sem cloro. Após 3 dias as palhetas eram retiradas da água e deixadas secar ao ar por 3 dias, sendo as larvas eclodidas criadas em incubadoras BOD com ciclo de luz, simulando o período diurno e noturno, conforme o protocolo previamente descrito por ALENCAR *et al.* (2015). Os ovos não eclodidos nas palhetas eram de novo deixados secar por 3 dias onde repetíamos o processo das imersões, conforme já descrito, até a décima quinta imersão caso nem todos os ovos tivessem eclodido. Os ovos que não tivessem eclodido até a décima quinta imersão eram incorporados a coleção do laboratório (ALENCAR *et al.*, 2015) (Figura 10).



Figura 9A. Armadilha de oviposição ovitrampa **B** - Palhetas de Eucatex.



Figura 10. Método de coleta de ovos com o uso de armadilha ovitrampa e dinâmica de eclosão dos ovos em estufa tipo B.O.D em laboratório.

3.4.2 Coleta de larvas e pupas

As coletas de larvas e pupas foram realizadas em criadouros naturais permanentes ou semipermanentes (bambus, taquaras, bromélias, buraco de árvore) e transitórios (cocos, conchas, folhas caídas), fazendo uso de conchas entomológicas (Figuras 11A, 11C) e sugador manual, sendo a água despejada em bandejas, e as larvas e pupas coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As larvas e pupas foram coletadas e transferidas a sacos plásticos de 250 ml (Whirl-Pak® bags, BioQuip®) e transportadas ao laboratório no qual eram mantidas em bacias contendo água dos seus criadouros naturais e completadas com água destilada em caso de evaporação. Cada amostra era identificada quanto ao local, data, tipo de criadouro, volume de água, pH da água, temperatura da água e temperatura ambiente para análise neste estudo.

Foram utilizadas também armadilhas do tipo Bambu-tramp (Figura 11B), colocadas em copas de árvores com o intuito de coletar larvas e/ou ovos de mosquitos acrodendrófilos.



Figura 11 A. Ponto amostral (Trilha verde) coleta de imaturos em raízes tabulares **11 B –** Coleta em bambu (Trilha verde) **11 C –** Ponto amostral (Trilha amarela) coleta em lagoa utilizando concha entomológica na Reserva Ecológica do Guapiaçu (REGUA), Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro.

3.4.3 Captura dos espécimes adultos

As capturas dos espécimes adultos foram realizadas com Técnica de Atração por Humano Protegido (TAHP) e auxílio de capturadores de Castro, armadilhas luminosas de CDC (Centers for Disease Control) e Shannon (Figura 12A e B), em seguida, os espécimes foram

transferidos para pote plástico com tampa telada com nylon (“gaiolas”) (Figura 12C). Ao final de cada captura os adultos foram levados ao laboratório de campo onde permaneceram durante aproximadamente 20 minutos no congelador, e acondicionados em pequenas caixas padronizadas. Foi utilizado termo-higrômetro da marca Oregon Scientific, modelo RMR132HG, fixado no local de captura a um metro de altura do solo, para a coleta de temperatura e umidade relativa local. As medições das médias de umidade, de temperatura (máxima, mínima e média compensada) e precipitações pluviométricas foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Após a captura, 20% dos espécimes foram armazenados em tubos de criopreservação devidamente identificados quanto à data, ao local e ao tipo de captura e conservados em nitrogênio líquido (N_2) e, posteriormente, levados ao laboratório onde foram imobilizados em placa refrigerada adaptada para identificação das espécies e para detecção de *Flavivirus*.



Figura 12 A. Instalação de armadilha luminosa de CDC **B** - Armadilha Shannon para captura de mosquitos. **C** – Armadilha de Castro e Gaiola para transporte dos mosquitos.

3.4.4 Identificação dos espécimes de mosquitos

As identificações das espécies foram realizadas a partir da observação direta dos caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio estereoscópico (Zeiss®), e com a utilização de chaves dicotômicas elaboradas por LANE (1953a,b), CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994) e FORATTINI (2002). As abreviaturas dos nomes genéricos e subgenéricos seguem a proposta por REINERT (2009). Após a determinação específica, todos os espécimes

foram incorporados à Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, sob o título de “Coleção de mosquitos da Mata Atlântica, Rio de Janeiro”.

3.4.5 Cálculo dos índices entomológicos e ecológicos e análises estatísticas

Foram calculados os índices entomológicos e ecológicos para avaliar a diversidade, abundância e a dinâmica populacional de mosquitos nos ambientes estudados. Os índices analisados que ajudam no entendimento da ecologia dos insetos e suas interações com o meio ambiente foram: Índice de positividade de ovitrampa (IPO), Índice de densidade de ovos (IDO), Índice de massa de ovos (IMO), Índice de positividade de larvas (IPL), Índice de densidade de larvas (IDL), Índice de massa de larvas (IML), Dominância (D), Equabilidade (J), Diversidade (H).

Para determinação do IPO realizamos, com auxílio da microscópio estereoscópico, a contagem do número total de ovos depositados na palheta. Essa contagem era realizada em cada palheta trazida do trabalho de campo e o resultado é expresso em percentual.

$$\text{IPO} = (\text{Nº armadilhas positivas} / \text{Nº ovitrampas inspecionadas}) \times 100.$$

$$\text{IDO} = (\text{Total de ovos nas paletas} / \text{Total de armadilhas positivas}).$$

$$\text{IMO} = (\text{Nº de ovos coletados} / \text{Nº ovitrampas inspecionadas}).$$

Para o cálculo do IPL, é necessário medir o volume de água contendo as formas imaturas. Por exemplo, a água acumulada em um oco de árvore, anotamos o volume coletado e contamos o total de larvas presentes, sendo o resultado expresso em percentual.

O IPL é calculado e expresso em percentual de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{IPL} = (\text{Nº total de larvas} / \text{Volume de água coletada}) \times 100.$$

$$\text{IDL} = (\text{Nº de larvas coletadas} / \text{Valor da área que o volume ocupa}) = \text{larvas/cm}^2.$$

Para calcular o IML, procedemos a pesagem em balança de precisão, de todas as larvas presentes nos recipientes coletados por área. Posteriormente, sabendo qual a área que a água ocupa em cada recipiente, usamos então a seguinte fórmula:

$$\text{IML} = (\text{massa total das larvas} / \text{área ocupada pela água}) = \text{larvas por mg/cm}^2.$$

Diversidade (H) é uma medida que expressa a variedade e a distribuição das espécies em uma comunidade ou amostra, que foi calculado pelo Índice de Shannon-Wiener (H), onde quanto maior o seu valor, maior a diversidade da amostra.

Dominância (D) verifica a predominância de uma espécie em uma comunidade ou amostra, tendo por base a abundância das espécies presentes. Para o cálculo, usamos o Índice de Simpson, que avalia a probabilidade de que dois insetos escolhidos aleatoriamente pertençam

à mesma espécie. Quanto mais próximo o valor obtido estiver de 1, significa que a dominância é maior e a diversidade menor.

Equabilidade (J) é o índice que serve para expressar a uniformidade na distribuição das abundâncias de diferentes espécies em uma comunidade da amostra e permite avaliar quão equitativa é a distribuição de indivíduos entre as espécies. Porém, para ser calculado, é necessário calcular primeiro o índice de Shannon-Wiener (H), que combina riqueza e equabilidade fornecendo uma medida da diversidade de espécies em uma comunidade. O índice H é dividido pelo logaritmo natural do número total de espécies da amostra. Esse índice varia de 0 a 1 sendo que quanto mais próximo de 1, mais equitativa é a distribuição entre as comunidades.

Usamos o teste de Mann-Whitney para comparar as medianas entre grupos diferentes, por ser um teste não paramétrico adequado para amostras independentes que não seguem uma distribuição normal. Esse teste permite a análise das diferenças entre grupos de forma confiável e eficaz.

Para análise dos índices de similaridade, usamos o índice de Bray-Curtis.

Para a divisão de categorias de dominância, propostas por Friebe (1983), lançamos mão da fórmula $D\% = (\text{número total de indivíduos da espécie} / \text{número total de indivíduos capturados}) * 100$ foi utilizada para estabelecer as categorias em: eudominante ($D > 10\%$), dominante ($D > 5-10\%$), subdominante ($D = 2-5\%$), eventual ($D = 1-2\%$) e raro ($D < 1\%$).

Usamos o índice de similaridade de Morisita para avaliar a eficiência entre as armadilhas TAHP, CDC e Shannon.

3.5 Detecção de Arbovírus em mosquitos

Foram processados, 12769 mosquitos em 1418 *pools* contendo entre 1 e no máximo 20 espécimes de culicídeos adultos com a finalidade de não reduzir a eficiência de separação do Ácido Ribonucleico (RNA). Os espécimes estavam previamente identificados e separados por espécie, sexo, tipo de armadilha, estado de ingurgitação, data e local de captura.

A detecção de arbovírus do gênero *Flavivirus* foi realizada através da reação de PCR pela amplificação da região NS5, que corresponde à última parte do quadro de leitura aberto (ORF) e codifica a proteína maior e altamente conservada, região essa que já foi utilizada anteriormente para detecção de *Flavivirus* por BALEOTTI *et al.* (2003), PAUVOLID-CORRÊA *et al.* (2013), CAMPOS *et al.* (2015), TERZIAN *et al.* (2015), FERREIRA-DE-BRITO *et al.* (2016).

De cada *pool* de insetos foi realizada a extração do RNA usando-se o kit High Pure Viral RNA (Roche, USA) ou o kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Germany) ou o kit QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Germany). Uma vez extraído, foi realizada a quantificação e verificação da qualidade do mesmo no espectrofotômetro/fluorômetro Denovix-DS11 FX+ (Denovix, USA) no comprimento de onda de 260-280 nm. Posteriormente foi montado o cDNA no mesmo dia com o uso do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) seguindo o protocolo do fabricante. Essa amostra transformada em cDNA também foi quantificada no espectrofotômetro/fluorômetro Denovix-DS11 FX+ (Denovix, USA) no comprimento de onda de 260-280 nm.

A partir do cDNA obtido, foram realizadas as reações de PCR usando iniciadores que ancoram entre os nucleotídeos 8985 e 9259 do genoma dos flavivírus na região NS5, onde os produtos amplificados tem o tamanho esperado entre 270 e 320 pares de base (pb), que foram visualizados em gel de agarose a 1,5% e corados com um agente intercalante de ácidos nucleicos (Brometo de Etídeo). Os iniciadores usados foram modificados e tiveram o protocolo adaptado a partir dos iniciadores descritos por Patel e colaboradores (2013).

Em toda reação de PCR foram usados como controle amostras padrão positivas de Vírus Dengue, Vírus da Zika, Vírus da Febre Amarela e Vírus da Febre do Nilo Ocidental e controle sem amostra como controle negativo.

O mix de reação usado continha 10 pM dos iniciadores senso BetterFlavFW 5'-TAC AAC ATG ATG GGG AAR CGW GAR AA-3' e BetterFlavREV 5'-GTG TCC CAG CCN GCK GTR TCR TC-3', tampão de reação 1x (100 mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1 U de DNA polimerase Platinum (Thermo Fischer Scientific, 168 Third Avenue, Walthan, MA 02451, USA) em um volume total de reação de 25 µL. As condições de ciclagem foram 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e a extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as amostras que tiveram a detecção positiva foram quantificadas em um espectrofotômetro Denovix-DS11 FX+ (Denovix, USA) no comprimento de onda de 260 nm, purificadas com o kit Cellco PCR purification kit (Cellco Biotec do Brasil Ltda, ctt. #DPK-106L, São Carlos, SP, Brazil) ou o kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN, Germany) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras purificadas foram re-quantificadas e armazenadas em ultrafreezer à -80°C até o momento do sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada na Plataforma de Sequenciamento RTP01A do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sendo executado com o material

contendo entre 10 e 40 ng do produto purificado de PCR no equipamento ABI3730 DNA Analyser (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) seguindo o protocolo do BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Protocol.

As sequências obtidas foram analisadas usando o programa Geneious R10 (Biomatters, v.10.2.6) onde os “contigs” foram comparados com as sequências referência usando o NCBI Blast (Basic Local Alignment Search Tool) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Com estes resultados, podemos calcular a taxa de infecção estabelecendo a proporção de mosquitos positivos para arbovírus em relação ao total de mosquitos analisados, onde uma taxa elevada pode indicar o risco de dispersão dos patógenos. Aliado a isso, a análise da distribuição espacial, sazonalidade e fatores ambientais (temperatura, umidade, precipitação) podem ajudar na análise de emergência.

A identificação dos mosquitos vetores também é uma aliada no estudo, pois algumas espécies são mais eficientes na dispersão de patógenos.

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição, abundância e o efeito de múltiplas imersões de ovos de mosquitos em remanescente de Mata Atlântica, Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro (objetivos 1 e 2)

Durante o período amostral, agosto de 2018 a janeiro de 2021 (2 anos e 5 meses) foram encontradas na Fazenda Três Montes, as seguintes espécies com importância na transmissão de arbovírus: *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924) (n=1068, 53%), *Haemagogus janthinomys* (Dyar, 1921) (n=8, 0,4%), *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (n=519, 26%) e *Aedes terrens* (Walker, 1856) (n=414, 21%). A abundância das espécies de *Aedes* apresentaram similaridades, enquanto as espécies de *Haemagogus* foram encontradas em quantidades diferenciadas. Foi constatada a dominância de *Hg. leucocelaenus* e apresentando números maiores (n = 1068) quando comparada com *Hg. janthinomys* (n = 8). A abundância de uma espécie comparada com a outra foi fortemente divergente notando-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 4.65^{-08}$) entre elas.

4.1.1 Sazonalidade das espécies de mosquitos com importância médica entre agosto de 2018 a janeiro de 2021 na Fazenda Três Montes.

A espécie mais abundante no período do inverno foi *Ae. albopictus*, que foi a segunda mais abundante no verão e no outono. *Haemagogus leucocelaenus* foi a espécie mais abundante em todas as estações do ano com exceção do inverno. A maior abundância de *Ae. terrens* foi observada no verão, representando 29% das espécies com importância médica coletadas na Fazenda Três Montes. Foi possível observar que estação climática do verão favoreceu a abundância da maioria das espécies com importância médica com: 39% de *Hg. leucocelaenus*, 31% de *Ae. albopictus* e 29% de *Ae. terrens*.

Levando em consideração a abundância das espécies vetoras de arbovírus encontradas, as estações climáticas mais similares entre si de acordo com o índice de Bray-Curtis foram primavera e outono (Figura 13).

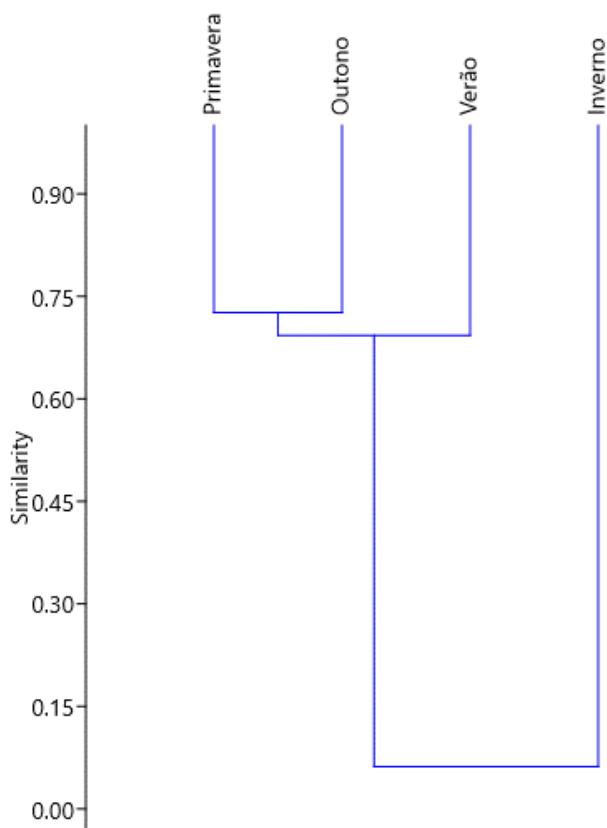


Figura 13. Índice de Similaridade de Bray-Curtis. Estações climáticas do ano da área de coleta de Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

Analizando os Índices Entomológicos Índice de Positividade de Ovitrampa (IPO), Índice de Densidade de Ovos (IDO) e Índice Médio de Ovos (IMO) e IPL? por mês, de agosto de 2018 a janeiro de 2021 na Fazenda Três Montes, Rio de Janeiro, Brasil (Tabela 1 e Figura 14), evidenciamos que os maiores IPO foram observados entre os meses de outubro de 2018 até abril de 2019 (variando entre 0,73 e 0,87), novembro de 2019 (IPO = 0,87), janeiro de 2020 (IPO = 0,80) e novembro de 2020 (IPO = 0,80). Quanto ao índice de densidade de ovos (IDO), as maiores densidades foram observadas nos meses de novembro de 2018 (IDO = 88,50), março de 2019 (IDO = 90,33), novembro de 2019 (IDO = 111,15), dezembro de 2019 (IDO = 118,90), e janeiro de 2020 (IDO = 115,00). O índice de positividade de larvas (IPL) acompanhou os índices IPO e IDO em outubro a abril de 2019 (IPL = 0,60 a 0,87), novembro de 2019 (IPD = 0,87), dezembro e janeiro de 2020 com índices iguais (IPL = 0,67) e novembro 2020 (IPL = 0,80).

Tabela 1. Índices Entomológicos (IPO, IDO, IMO, IPL, IDL e IML), da área amostral Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

Mês/Ano	IPO (%)	IDO (n)	IMO (n)	IPL (%)	IDL (n)	IML (n)	Ovos	Larvas
ago/18	0,13	3,87	3.60	0.27	7.25	1.93	54	29
set/18	0,40	25,83	10.33	0.40	21.67	8.67	155	130
out/18	0,73	29,91	21.93	0.60	31.44	18.87	329	283
nov/18	0,80	88,50	70.80	0.70	81.86	57.30	708	573
jan/19	0,73	47,73	35.00	0.60	42.22	25.33	525	380
fev/19	0,80	22,92	18.33	0.60	22.67	13.60	275	204
mar/19	0,80	90,33	72.27	0.73	60.73	44.53	1084	668
abr/19	0,87	66,77	57.87	0.87	53.46	46.33	868	695
mai/19	0,40	27,00	10.80	0.40	19.17	7.67	162	115
jun/19	0,27	16,25	4.33	0.20	16.33	3.27	65	49
jul/19	0,07	4,00	0.27	0.07	2.00	0.13	4	2
ago/19	0,20	1,33	0.27	0.20	1.00	0.20	4	3
set/19	0,40	6,67	2.67	0.07	14.00	0.93	40	14
out/19	0,53	12,43	5.80	0.27	7.75	2.07	87	31
nov/19	0,87	111,15	96.33	0.87	78.08	67.67	1445	1015
dez/19	0,67	118,90	79.27	0.67	96.80	64.53	1189	968
jan/20	0,80	115,00	92.00	0.67	116.80	77.87	1380	1168
fev/20	0,53	44,38	23.67	0.47	26.86	12.53	355	188
mar/20	0,47	27,29	12.73	0.47	17.86	8.33	191	125
mai/20	0,33	20,40	6.80	0.33	15.80	5.27	102	79
jun/20	0,07	7,00	0.47	0.07	3.00	0.20	7	3
ago/20	0,27	22,75	6.07	0.27	18.50	4.93	91	74
set/20	0,07	30,00	2.00	0.07	7.00	0.47	30	7
out/20	0,47	17,29	8.07	0.47	7.29	3.40	121	51
nov/20	0,80	74,42	59.53	0.80	26.42	21.13	893	317
dez/20	0,47	68,57	32.00	0.67	33.90	22.60	480	339
jan/21	0,60	14,78	8.87	0.00	0.00	0.00	133	0

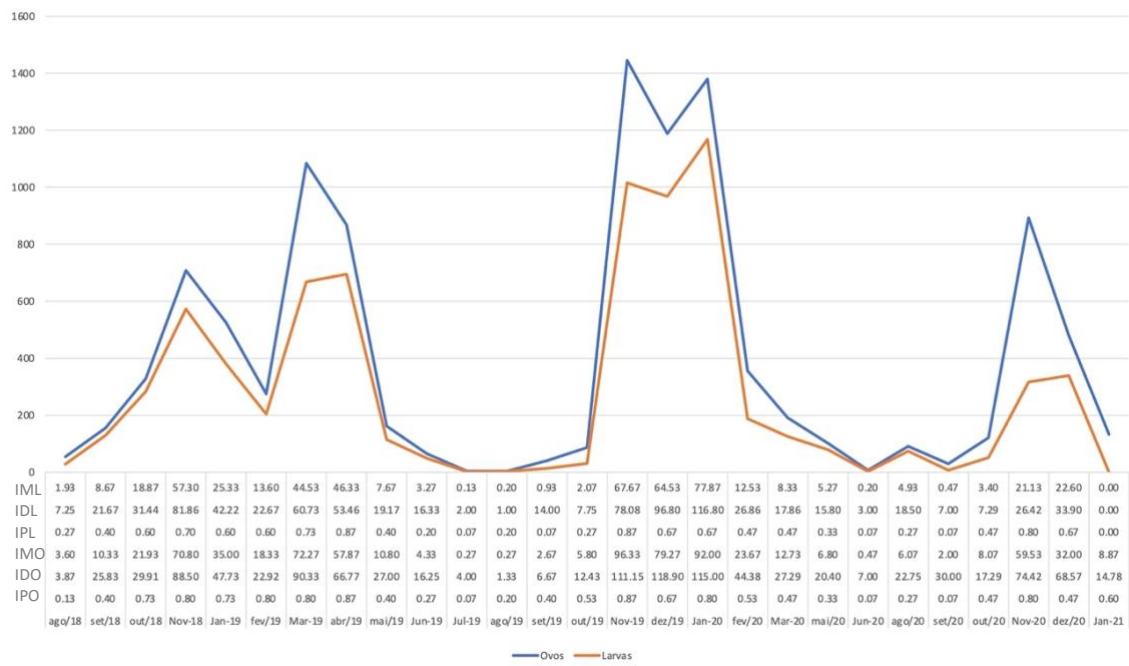


Figura 14. Índices Entomológicos da área amostral da Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

4.1.2 Correlação das variáveis climáticas temperatura, umidade e precipitação com as espécies de mosquitos *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, *Aedes albopictus* e *Aedes terrens* na Fazenda Três Montes.

Para essa análise, montamos um gráfico de correspondência canônica, para compreender a relação entre quatro espécies de mosquitos e variáveis ambientais (temperatura, umidade e precipitação). As espécies de mosquitos estão representadas por pontos azuis, enquanto os vetores (linhas verdes) indicam a influência das variáveis ambientais, os valores nos eixos x (abscissa) e y (ordenada) indicam os pesos das variáveis na combinação linear resultante. Analisando os vetores do gráfico, podemos verificar a força entre as variáveis independentes. Devemos considerar que cada ponto no gráfico representa uma observação no conjunto de dados e essa distância entre os pontos reflete a similaridade entre as variáveis analisadas. Diante disso, *Hg.s leucocelaenus* apresentou uma correlação positiva ($r = 0.41$) e estatisticamente significativa ($p = 0,025$) com a temperatura. *Aedes terrens* apresentou uma correlação positiva ($r = 0,437$) e significativa ($p = 0,016$) com essa mesma variável ambiental e a umidade, já *Ae. albopictus* demonstrou ter uma correlação positiva ($r = 0,46$) e significativa ($p = 0,010$) com a precipitação (Figura 15).

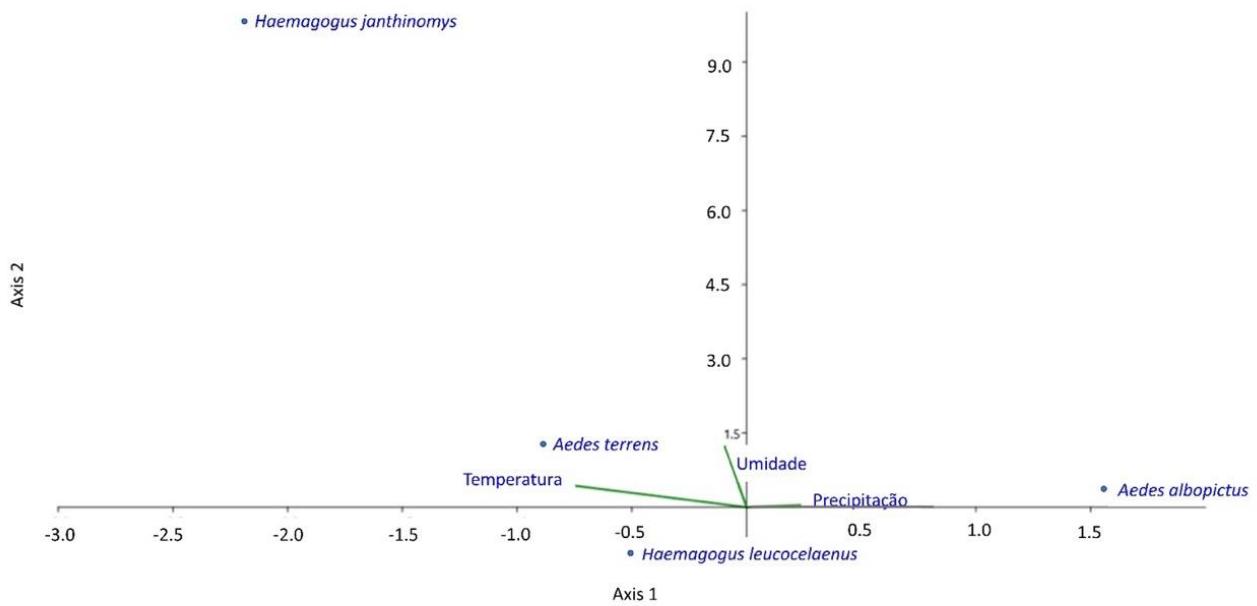


Figura 15. Correspondência Canônica. Variáveis climáticas e espécies de mosquitos vetorais de arbovírus na área de coleta da Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

4.1.3 Eclosão de larvas de mosquitos na primeira imersão de ovos em comparação com imersões posteriores ao longo das estações climáticas do ano.

As eclosões dos ovos de culicídeos coletados durante o período de agosto de 2018 a janeiro de 2021, foram comparadas de acordo com a estação climática do ano na qual foram coletados. Na estação do verão a porcentagem de ovos eclodidos na primeira imersão (48%) foi similar a de ovos eclodidos nas subsequentes imersões (52%). A estação da primavera, assim como a estação do verão, também apresentou porcentagens de eclosões similares, com 56% dos ovos eclodindo na primeira imersão e 44% nas demais. Em contrapartida, durante a estação do inverno foi apresentada uma diferença extrema no número de eclosões entre as imersões, com a maioria dos ovos (98%) eclodindo na primeira imersão e apenas 2% eclodindo nas imersões subsequentes. O comportamento de eclosão de ovos de culicídeos no período do outono foi similar ao inverno, porém com uma diferença consideravelmente menor entre o número de ovos eclodidos na primeira imersão (67%) e nas demais (33%), mas assim como no período do inverno, a maioria dos ovos eclodiram na primeira imersão (Tabela 2).

Tabela 2. Ovos de mosquitos que eclodiram por estação climática na primeira imersão e em imersões subsequentes na área amostral da Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

Estação	Primeira imersão	Imersões posteriores	Total
Verão	367 (48%)	401 (52%)	768
Outono	271 (67%)	132 (33%)	403
Inverno	253 (98%)	6 (2%)	259
Primavera	321 (56%)	255 (44%)	576

O perfil de eclosão de ovos durante estação climática do verão e da primavera foram similares, levando em consideração que as eclosões ocorreram abundantemente tanto na primeira quanto nas imersões subsequentes. Já nos períodos do inverno e outono, a maioria dos ovos eclodiu na primeira imersão e um número menor eclodiu nas subsequentes imersões, Odds ratio de 0,03 e 0,54 respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de ovos de mosquitos que eclodiram por estação climática na primeira e nas imersões subsequentes na Fazenda Três Montes entre agosto de 2018 a janeiro de 2021.

Estação	Primeira imersão	Imersões posteriores	Total	Odd ratio	95% CI
Primavera	321 (56%)	255 (44%)	576		
Verão	367 (48%)	401 (52%)	768	1,38	1,71; 1,11
Outono	271 (67%)	132 (33%)	403	0,54	0,70; 0,41
Inverno	253 (98%)	6 (2%)	259	0,03	0,07; 0,01

*Os dados mostram porcentagens de ovos que eclodiram nas primeiras e subsequentes imersões por estação climática, e em parênteses as frequências relativas dos ovos eclodidos em relação ao total de ovos eclodidos (expressos como porcentagens). A estação climática da primavera foi utilizada como valor de referência para calcular a razão de probabilidade.

4.1.4 Espécies de mosquitos com importância médica por armadilha de ovitrampa na Fazenda Três Montes, município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro entre agosto de 2018 a janeiro de 2021.

Das 15 ovitrampas instaladas durante o estudo, as que apresentaram o maior número de indivíduos foram a 2, coordenadas 22°31'40.1S 42°02'58.6W (n = 407), e a 7, coordenadas 22°31'49.5S 42°02'56.3W (n = 289), equivalentes a 20% e 14%, respectivamente, de todos os culicídeos coletados (Figura 16). Existe a possibilidade de que o ponto amostral onde estava instalada a armadilha 2 tenha sofrido uma maior influência devido a circulação humana que

frequentava essa área para acessar um mirante utilizado para observar a paisagem do local. Já no ponto amostral da armadilha 7 foi constatada uma forte presença de primatas não humanos o que possivelmente favoreceu a maior abundância de culicídeos. *Aedes albopictus* foi muito presente nas ovitrampas 1 ($n = 114$) e 2 ($n = 247$), sendo essa última a que apresentou o maior número de indivíduos dessa espécie. *Haemagogus leucocelaenus* foi muito abundante na ovitrampa 7 ($n = 235$), sendo que essa espécie apresentou abundância elevada em todas as outras ovitrampas (Figura 17).



Figura 16. Localização das armadilhas de ovitrampas de 1 a 8 na Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil fonte: Google Maps adaptada no Office 365.

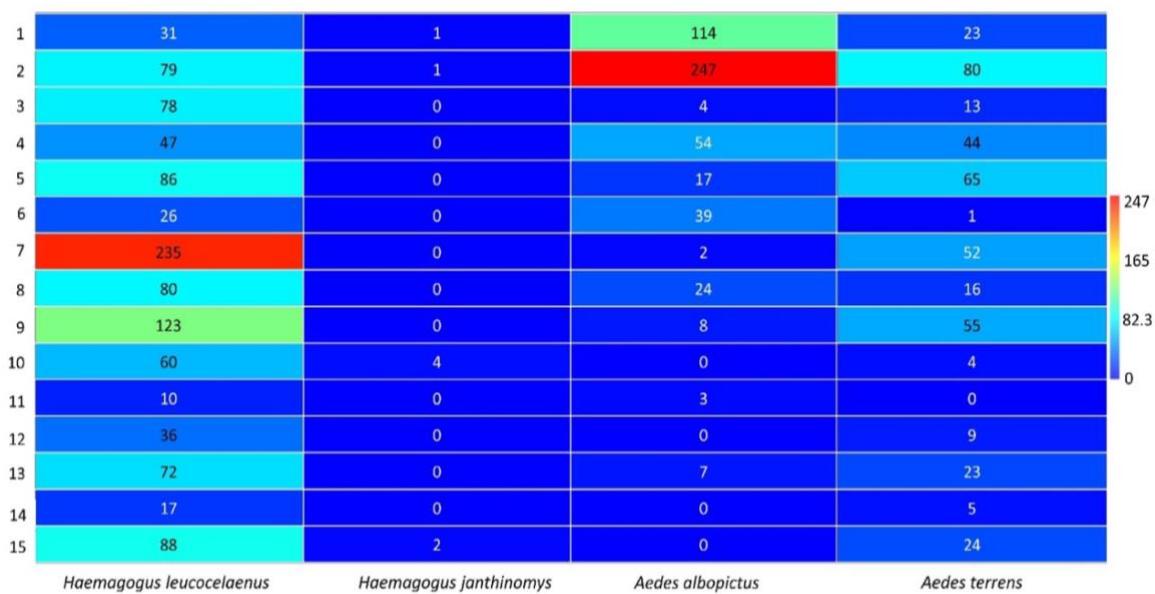


Figura 17. Matrix Plot. Espécies de mosquitos vetoras por ovitrampa (numeradas de 1 a 15), na área de coleta de Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

4.1.5 Proporção de fêmeas e machos por espécie de mosquitos *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, *Aedes albopictus* e *Aedes terrens* na Fazenda Três Montes, município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro entre agosto de 2018 a janeiro de 2021.

A porcentagem de exemplares fêmeas de *Hg. leucocelaenus* foi 10% maior que a de machos. *Haemagogus janthinomys* apresentou o número de fêmeas (62,5%) também superior quando comparado aos exemplares de machos (37,5%). Em contrapartida nas espécies do gênero *Aedes*, o número de machos foi superior ou muito similar ao número de fêmeas. A espécie *Ae. terrens* apresentou aproximadamente 10% mais machos do que fêmeas ($F = 44,7$; $M = 55,3$). *Aedes albopictus* apresentou porcentagens muito similares de machos e fêmeas ($F = 50,1$; $M = 49,9$) (Figuras 18 e 19).

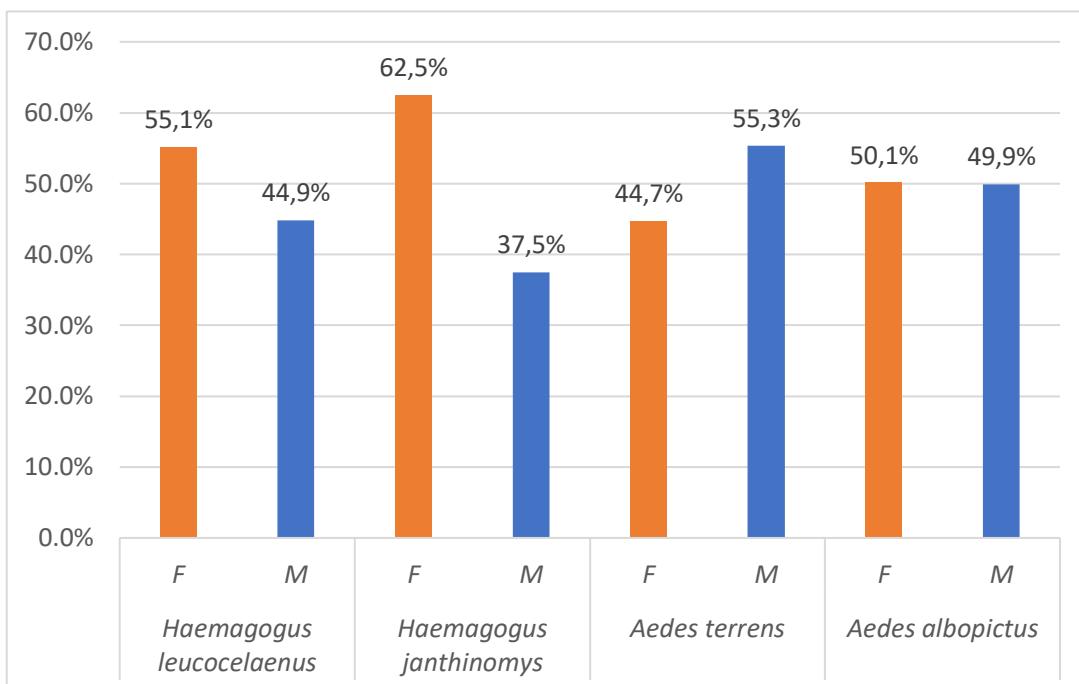


Figura 18. Porcentagens de fêmeas e machos de espécies de mosquitos com importância médica. Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

Embora o número total de fêmeas que emergiram tenha sido maior que o de machos, em algumas ovitrampas individuais, o número de machos superou o de fêmeas, apresentando diferença expressiva. Foi feita a razão do número de machos com o número de fêmeas, montando um gráfico Box Plot, de forma que, números positivos no gráfico representam uma maior quantidade de fêmeas encontradas nas ovitrampas e os números negativos (-0.01) a quantidade de machos. A linha mediana dentro do box, é o valor que divide a amostra ao meio, as hastes apresentam a dispersão dos dados, e os valores entre -0.01 e 0.01 indicam uma relação estreita nas proporções evidenciando maior quantidade de fêmeas (Figura 19).

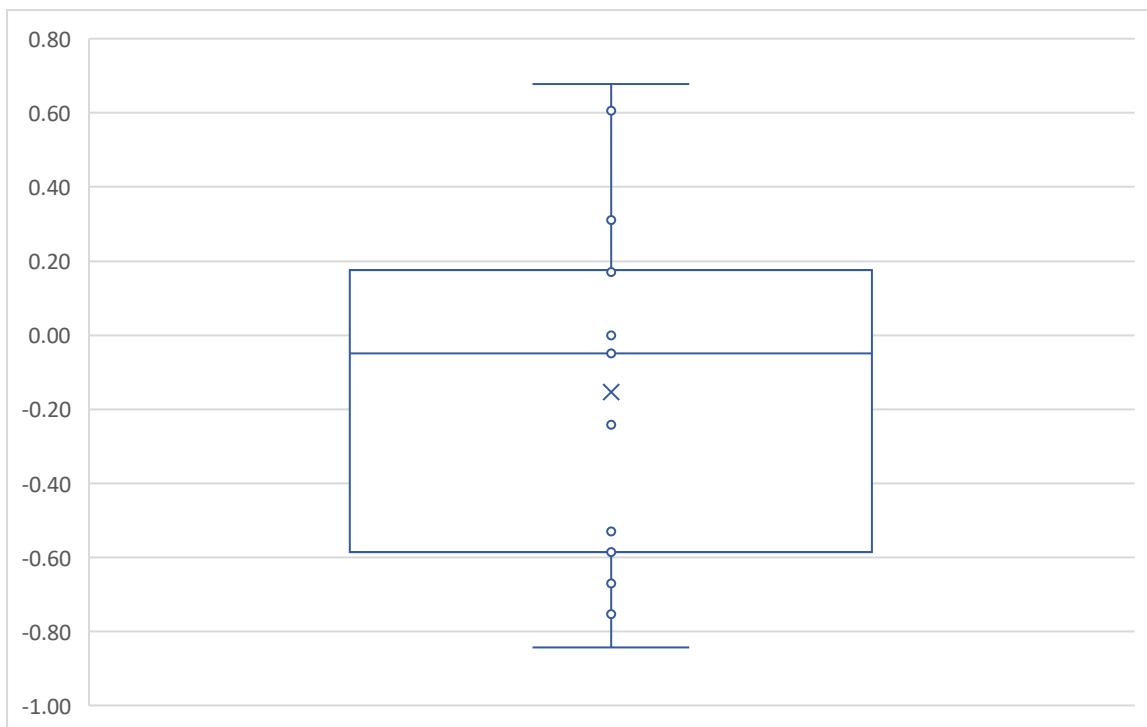


Figura 19. Variação das proporções de fêmeas e machos de espécies de mosquitos com importância médica. Fazenda Três Montes, Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, no período de agosto de 2018 a janeiro de 2021.

Analizando a porcentagem de eclosões de cada espécie por imersão, observamos que a espécie *Ae. albopictus* foi a que apresentou a quase totalidade de ovos eclodidos logo nas primeiras imersões. Em contrapartida, *Hg. janthinomys*, foi a que apresentou menor percentual de eclosões durante as primeiras imersões e pode-se observar que a partir da sétima imersão, foi atingida a eclosão acima de 50% dos ovos e a quase integralidade de ovos eclodidos se deu apenas na décima quinta imersão (Figura 20).

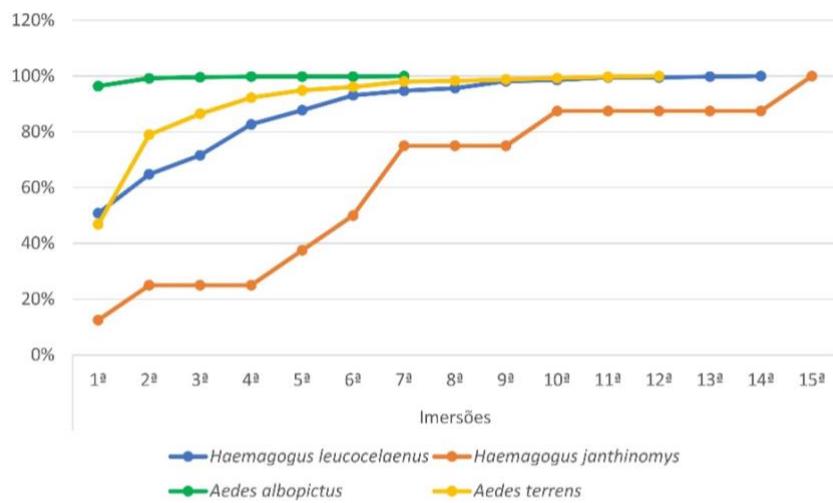
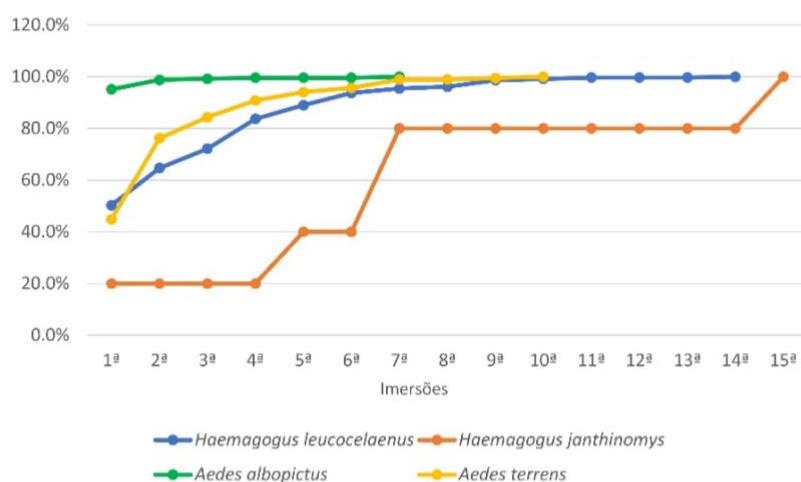
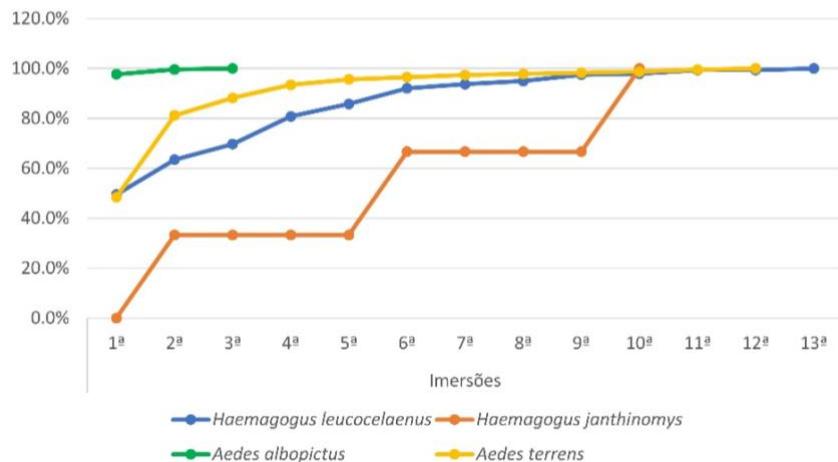
A**B****C**

Figura 20. Porcentagem cumulativa total de eclosões de cada espécie de mosquitos por imersão (A). Porcentagem de eclosões de fêmeas (B) e machos (C). Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, agosto de 2018 a janeiro de 2021.

4.2 Distribuição das espécies de mosquitos em diferentes alturas, tendência do número de ovos ao longo dos meses, influência das variáveis ambientais na abundância de ovos na área da Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro (objetivo 3).

4.2.1 Eclosão de larvas dos ovos de mosquitos nas ovitrampas da Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.

Considerando o conjunto total de ovos de culicídeos coletados ($n = 1514$) na Fazenda Três Irmãos e a eclosão de larvas conforme a metodologia já descrita; identificamos uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$; $p = 0,0004$) entre o número de ovos eclodidos ($n = 361$) e não eclodidos ($n = 1153$). Destaca-se que a predominância observada foi de ovos não eclodidos, representando 76% do total (Figura 21).

Observamos que 50% dos ovos eclodidos eram de culicídeos de importância médica, sendo que 24% destes correspondiam a espécie *Hg. leucocelaenus*, importante vetor na transmissão do vírus da febre amarela (VFA) (DE ABREU *et al.*, 2019).

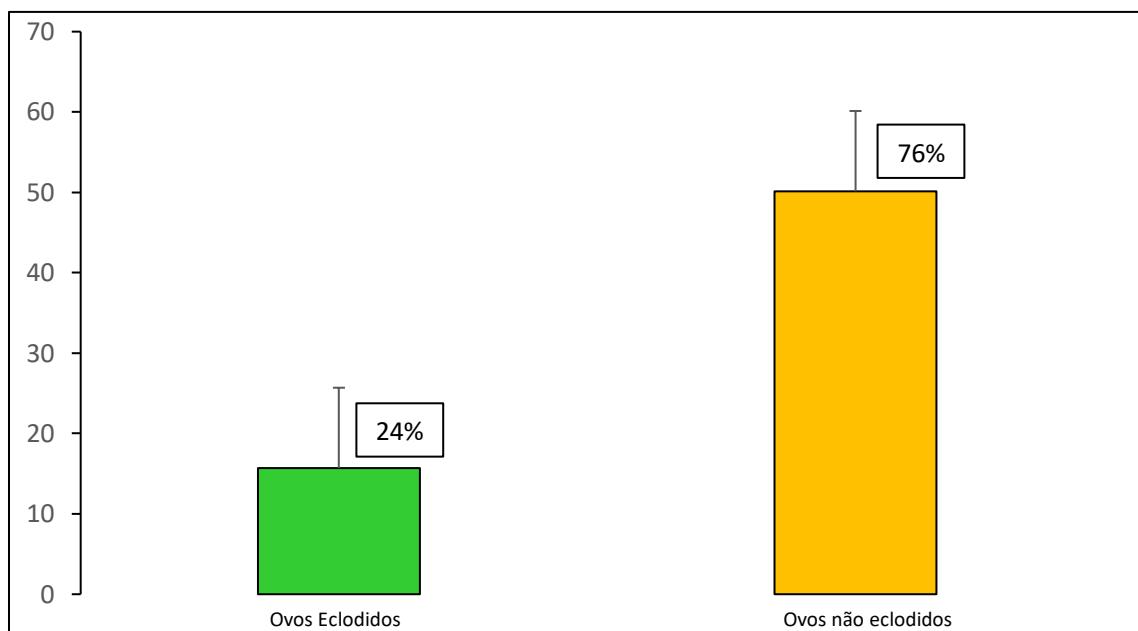


Figura 21. Média e desvio padrão do número de ovos eclodidos e não eclodidos coletados na Fazenda Três Irmãos, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, no período de março 2020 a outubro de 2022.

Houve diferença muito significativa ($p \leq 0,01$) entre o total de ovos coletados no período seco e chuvoso ($p = 0,0026$), com mais ovos coletados no período chuvoso (87%). O período seco apresentou a maior diferença entre o número de ovos eclodidos e não eclodidos (52%),

sendo maior o número de ovos coletados não eclodidos. O período chuvoso, apesar de também apresentar um maior número de ovos não eclodidos, teve uma diferença menor (33%) entre os dois. Foram encontrados mais ovos eclodidos no período chuvoso do que no período seco. Do total de ovos coletados, a porcentagem de ovos eclodidos no período chuvoso foi de 29%, enquanto no período seco foi de apenas 3%. Nesse caso, a sazonalidade parece ter influenciado a eclosão dos ovos. Provavelmente a pluviosidade estimulou a eclosão de uma quantidade maior de ovos e em um menor período (Figura 22).

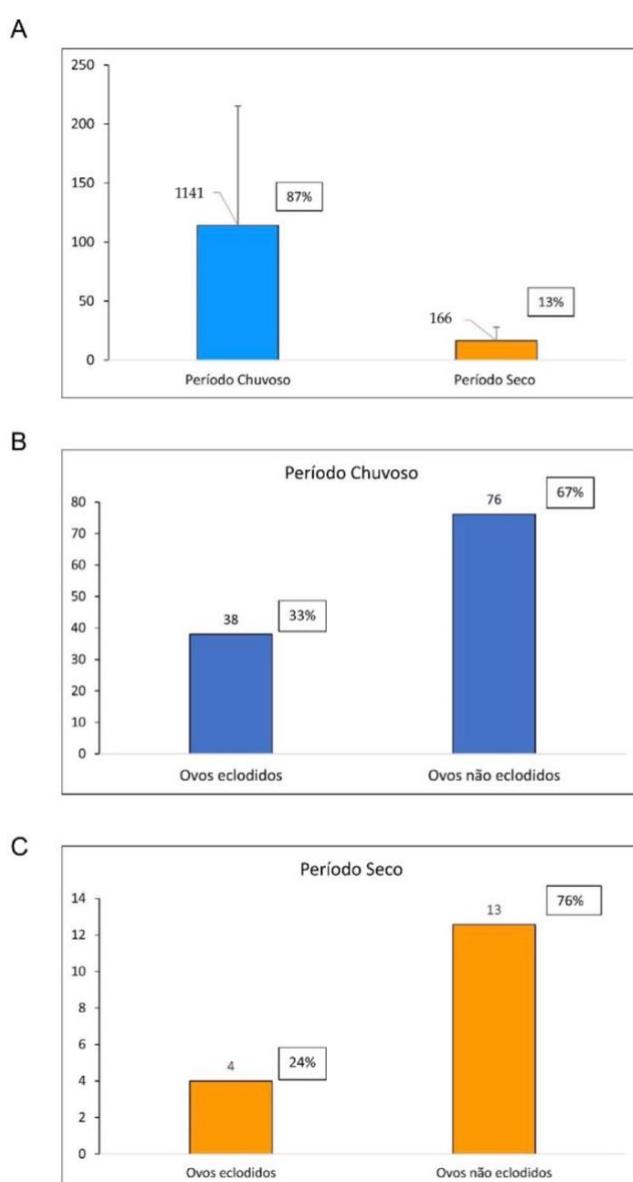


Figura 22. Número de ovos coletados no período seco e chuvoso (A). Número de ovos eclodidos e não eclodidos no período chuvoso (B) Número de ovos eclodidos e não no período seco (C). Fazenda Três Irmãos, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, no período de março 2020 a outubro de 2022.

4.2.2 Distribuição das espécies de mosquitos presentes nas ovitrampas instaladas em diferentes alturas na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.

A espécie com a maior abundância encontrada nas ovitrampas colocadas em diferentes alturas em relação ao nível do solo (solo, 2 m, 4 m e 6 m) foi *Hg. leucocelaenus*, representando 98% dos mosquitos com importância médica encontrados. A outra única espécie encontrada foi *Hg. janthinomys* (2%). Com relação a distribuição da espécie mais abundante, *Hg. leucocelaenus*, a maioria dos indivíduos foram registrados nas alturas de 2 m (53%) e 6 m (33%) (Tabela 4).

Tabela 4. Relação da distribuição das espécies de mosquitos por altura, na Fazenda Três Irmãos, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, período de março 2020 a outubro de 2022.

Espécie / Altura	Solo	2 m	4 m	6 m
<i>Hg. leucocelaenus</i>	3	29	5	18
<i>Hg. janthinomys</i>	0	1	0	0
Total	3	30	5	18

4.2.3 Tendência do número de ovos ao longo dos meses de coleta na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.

Durante o período de coleta (março 2020 a outubro de 2022) o número de ovos apresentou alguns picos expressivos nos meses de dezembro de 2020 ($n = 252$), novembro de 2021 ($n = 188$) e janeiro de 2022 ($n = 252$), todos compreendendo a estação chuvosa dos meses de verão. O mês de dezembro de 2020 apresentou a média mais alta de temperatura do ano ($22,4^{\circ}\text{C}$) e um alto nível de pluviosidade (4,3 mm) quando comparada com os demais meses de 2020. Janeiro de 2022 também foi marcado pela maior média de temperatura do ano ($22,8^{\circ}\text{C}$) (INPE 2023). As abundâncias mais baixas foram observadas nos meses de maio e agosto de 2021 com número de ovos igual a zero. Essas abundâncias menores correspondem aos meses do outono e inverno da estação seca, sendo que esses meses apresentaram baixas médias de temperatura e pluviosidade com valor igual a zero (Figura 23).

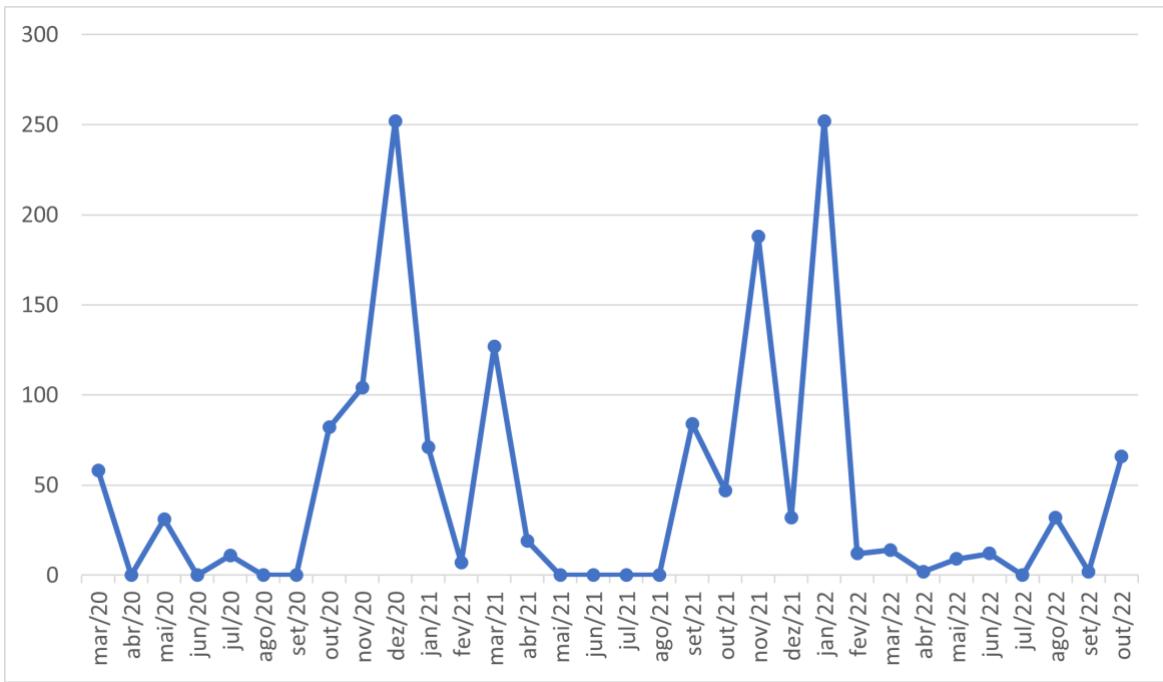


Figura 23. Tendência do número de ovos coletados por mês, no período de março 2020 a outubro de 2022 na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro.

4.2.4 Influência das variáveis ambientais na abundância de ovos de mosquitos na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.

Houve uma correlação positiva e não significativa ($r = 0,607$) entre o número de ovos de culicídeos e a temperatura e uma correlação positiva, porém fraca entre o número de ovos e a pluviosidade ($r = 0,222$) (Figura 24).

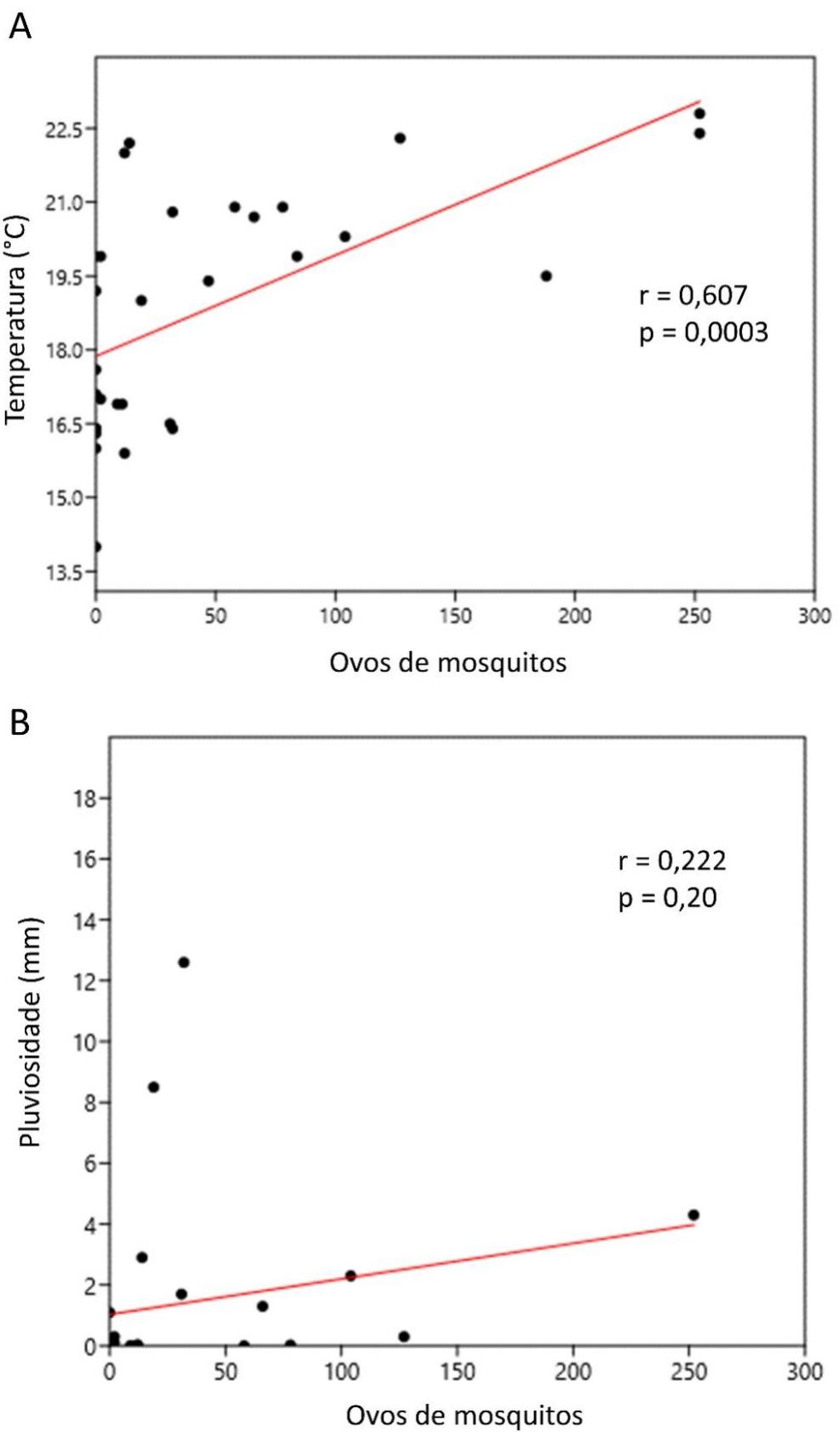


Figura 24. Regressão linear entre o número de ovos coletados e as variáveis ambientais temperatura (A) e pluviosidade (B). Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.

4.2.5 Correlação das variáveis ambientais com espécies de mosquitos importância médica na Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.

Houve uma correlação positiva entre *Hg. leucocelaenus* e as variáveis ambientais de temperatura ($r = 0,303$) e umidade ($r = 0,48$). *Aedes terrens* também apresentou correlação positiva com a temperatura ($r = 0,164$) e a umidade ($r = 0,21$). *Haemagogus janthinomys* teve uma correlação positiva e estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com a pluviosidade ($r = 0,86$) (Figura 25).

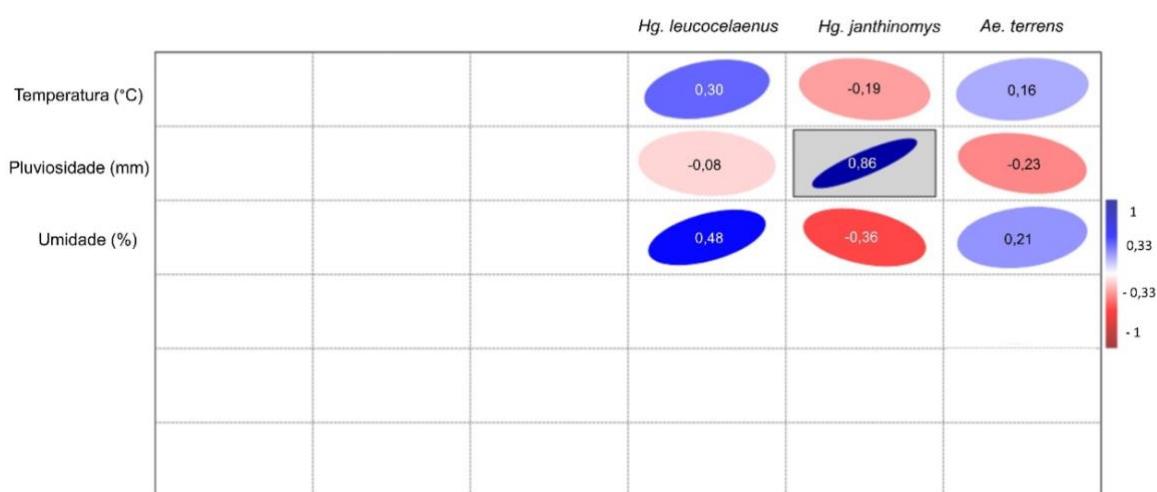


Figura 25. Correlação entre as espécies de mosquitos com importância médica (*Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys* e *Ae. terrens*) e as variáveis ambientais temperatura (°C), pluviosidade (mm) e umidade (%). Quanto mais intenso o azul, maior correlação positiva, destaque cinza para dado significativo. Fazenda Três Irmãos, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de março de 2020 a outubro de 2022.

4.3 Avaliação da composição faunística de imaturos de mosquitos quanto à diversidade, abundância, dominância e similaridade na área do Sítio Terra Boa, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro de setembro de 2022 a março de 2023 (objetivo 4).

A maior diversidade foi observada no mês de dezembro de 2022 ($H = 1,72$). O segundo maior índice de diversidade de Shannon e o maior índice de equabilidade foi observado em setembro de 2022 ($H = 1,71$; $J = 0,78$). Os maiores índices de dominância foram observados nos meses de outubro e novembro 2022, ambos com índice de $D = 0,48$, com alta abundância populacional de *Culex (Carrollia) iridescens*. A menor diversidade foi observada no mês de novembro de 2022 ($H = 0,93$). Os meses com as maiores abundâncias de culicídeos foram

dezembro de 2022 ($n = 343$) e março de 2023 ($n = 307$); o mês que apresentou a menor abundância foi janeiro de 2023 ($n = 47$). Considerando o período total de estudo, a espécie mais abundante foi *Culex (Carrollia) iridescentes* ($n = 718$; 51%), seguida de *Culex (Microculex) pleuristriatus* ($n = 239$; 17%) (Tabela 5).

De acordo com a análise multivariada de similaridade de Bray-Curtis, foi constatado que os meses mais similares entre si foram setembro e novembro de 2022 (0,62) e outubro e dezembro de 2022 (0,53). No entanto, foi observado que o mês de março de 2023 apresentou uma alta similaridade com os meses de setembro e novembro de 2022 (0,60 e 0,62) respectivamente. Entretanto, o mês mais diferente e destoante de todos os outros foi janeiro de 2023 (Figura 26).

Tabela 5. Abundância e índices de dominância (H), diversidade de Shannon e equabilidade (J) de mosquitos coletados por mês no Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado Rio de Janeiro, período de setembro de 2022 a março de 2023.

	set/22	out/22	nov/22	dez/22	jan/23	fev/23	mar/23
<i>Ae. (Oc.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	0	0	0	0	4	0	0
<i>Ae. (Pro.) terrens</i> (Zavortink, 1972)	3	7	14	23	0	0	0
<i>Ae. (St.) albopictus</i> (Skuse, 1895)	0	0	0	10	0	0	12
<i>Cx. (Car.) iridescentes</i> (Lutz, 1905)	60	192	126	98	0	48	195
<i>Cx. (Mcx.) neglectus</i> (Lutz, 1904)	0	0	0	0	0	4	0
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i> (Theobald, 1903)	6	0	50	116	0	34	34
<i>Cx. (Mcx.) retrosus</i> (Lane & Whitman, 1951)	0	5	0	0	0	0	0
<i>Cx. (Microculex) sp.</i> (Theobald, 1907)	13	14	0	4	0	0	0
<i>Hg. (Hag.) janthinomys</i> (Dyar, 1921)	3	0	0	0	0	0	0
<i>Li. durhamii</i> (Theobald, 1901)	18	0	6	0	0	0	24
<i>Li. pseudomethisticus</i> (Bonne-Wepster & Bonner, 1920)	9	0	0	0	0	0	6
<i>Tx. bambusicolus</i> (Lutz & Neiva 1913)	0	7	0	0	0	4	0
<i>Tx. cf. trichopygus</i> (Lutz, 1904)	0	5	0	4	0	0	0
<i>Tx. cf. violaceus</i> (Wiedemann, 1820)	0	0	0	4	0	0	0
<i>Toxorhynchites</i> sp. (Theobald, 1901)	0	0	0	7	0	0	0
<i>Tr. digitatum</i> (Rondani, 1848)	0	0	0	26	28	0	36
<i>Wy. (Pho.) edwardsi</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	25	37	0	53	12	1	0
<i>Wy. (Spi.) bourrouli</i> (Lutz, 1905)	0	5	0	0	0	0	0
<i>Wy. (Wyo.) arthrostigma</i> (Lutz, 1905)	3	13	0	0	0	4	0
<i>Wyeomyia</i> sp. (Theobald, 1901)	0	0	0	0	4	0	0
Total	139	282	195	343	47	95	307
Dominância (D)	0,25	0,48	0,48	0,23	0,42	0,39	0,44
Diversidade de Shannon (H)	1,71	1,22	0,93	1,72	1,08	1,16	1,19
Equidade (J)	0,78	0,55	0,67	0,75	0,78	0,65	0,66

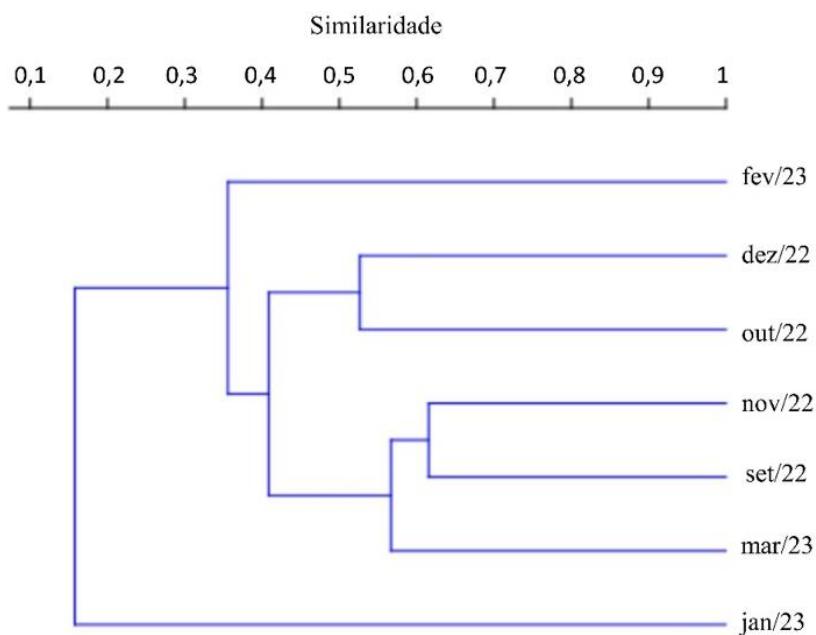


Figura 26. Índice de similaridade de Bray-Curtis entre os meses de coleta, no Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio Janeiro, período de setembro de 2022 a março de 2023.

Levando em consideração os índices ecológicos por criadouro para o período total do estudo (setembro de 2022 a março de 2023), o que apresentou a maior diversidade foi a bromélia ($H = 1,28$). Em contrapartida, a menor diversidade foi observada na folha caída ($H = 0,64$), embora tenha apresentado baixa diversidade, esse criadouro teve o maior índice de equabilidade quando comparado aos demais ($J = 0,92$). O maior índice de dominância foi o do bambu ($D = 0,64$), com alta abundância da espécie *Culex (Carrollia) iridescens* ($n = 718$) (Figura 27).

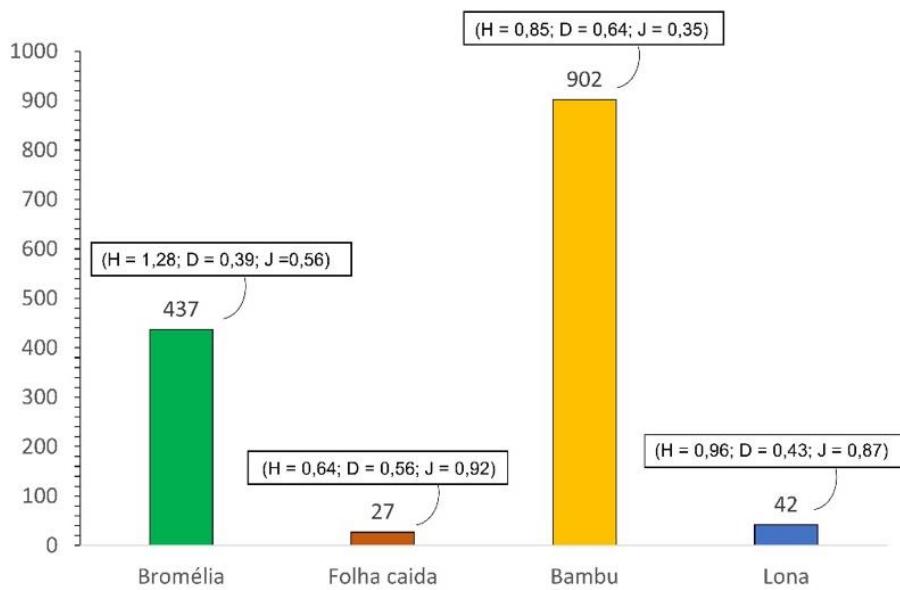


Figura 27. Abundâncias de mosquitos e índices ecológicos, Diversidade (H), Dominância (D) e Equabilidade (J) por criadouro, na área de coleta Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, período de setembro de 2022 a março de 2023.

Espécies de culicídeos eudominantes incluíram: *Culex (Carrollia) iridescens* (n = 718; 51%) e *Culex (Microculex) pleuristriatus* (n = 239; 17%). Espécies classificadas como dominantes incluíram: *Trichoprosopon digitatum* (n = 90; 6,4%) e *Wyeomyia (Phoniomyia) edwardsi* (n = 128; 9,1%). Espécies classificadas como raras incluíram: *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (n = 4; 0,2%), *Culex (Microculex) neglectus* (n = 4; 0,2%), *Culex (Microculex) retrosus* (n = 5; 0,3%), *Haemagogus janthinomys* (n = 3; 0,2%), *Toxorhynchites trichopygus* (n = 8; 0,6%) e *Toxorhynchites violaceus* (n = 4; 0,2%) (Tabela 6).

Tabela 6. Espécies de mosquitos coletados por categoria de abundância no Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, no período de setembro de 2022 a março de 2023.

	Abundância	%	Categoria
<i>Ae. (Oc.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	4	0,2%	raro
<i>Ae. (Pro.) terrens</i> (Zavortink, 1972)	46	3,3%	subdominante
<i>Ae. (St.) albopictus</i> (Skuse, 1895)	22	1,6%	eventual
<i>Cx. (Car.) iridescentes</i> (Lutz, 1905)	718	51%	eudominante
<i>Cx. (Mcx.) neglectus</i> (Lutz, 1904)	4	0,2%	raro
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i> (Theobald, 1903)	239	17%	eudominante
<i>Cx. (Mcx.) retrosus</i> (Lane & Whitman, 1951)	5	0,3%	raro
<i>Cx. (Mcx.) sp.</i> (Theobald, 1907)	30	2,1%	subdominante
<i>Hg. janthinomys</i> (Dyar, 1921)	3	0,2%	raro
<i>Li. durhamii</i> (Theobald, 1901)	48	3,4%	subdominante
<i>Li. pseudomethisticus</i> (Bonne-Wepster & Bonner, 1920)	15	1,1%	eventual
<i>Tx. bambusicolus</i> (Lutz & Neiva 1913)	11	0,8%	eventual
<i>Tx. cf. trichopygus</i> (Lutz, 1904)	8	0,6%	raro
<i>Tx. cf. violaceus</i> (Wiedemann, 1820)	4	0,2%	raro
<i>Tx. sp.</i> (Theobald, 1901)	7	0,5%	raro
<i>Tr. digitatum</i> (Rondani, 1848)	90	6,4%	dominante
<i>Wy. (Pho.) edwardsi</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	128	9,1%	dominante
<i>Wy. (Spi.) bourrouli</i> (Lutz, 1905)	5	0,3%	raro
<i>Wy. (Wyo.) arthrostigma</i> (Lutz, 1905)	20	1,4%	eventual
<i>Wy. sp.</i> (Theobald, 1901)	4	0,2%	raro

4.4 Avaliação da fauna de mosquitos quanto à abundância, riqueza, dominância, diversidade e equabilidade na área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro de março de 2023 a fevereiro de 2024 (objetivo 5).

4.4.1 - Índices ecológicos de mosquitos adultos dos gêneros *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Uranotaenia* encontrados nas Trilha Amarela entre março de 2023 a fevereiro de 2024.

Ao considerar as capturas realizadas com a Técnica de Armadilha Humana Protegida (TAHP), armadilhas luminosas de CDC e Shannon, identificamos 25 espécies de culicídeos (Tabela 7).

A armadilha Shannon destacou-se pela maior abundância absoluta de culicídeos, com 305 espécimes, o que representa 75% do total coletado por todos os métodos. Além disso, a Shannon apresentou a maior riqueza de espécies ($S=19$) e diversidade ($H=2,17$). A armadilha CDC, por sua vez, exibiu a segunda maior riqueza ($S=13$) e diversidade ($H=1,96$). Embora a TAHP tenha apresentado uma baixa riqueza de espécies ($S=6$) e diversidade ($H=1,37$), foi a que exibiu um elevado índice de dominância ($D=0,35$), com a espécie *Coquillettidia (Rhy) fasciolata* predominando, correspondendo a 54% dos indivíduos coletados por esse método (Quadro 3).

Quadro 3. Índices ecológicos dos mosquitos capturados na Trilha Amarela por tipo de armadilha, Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

	AHP	CDC	SHANNON
Abundância	35	67	305
Riqueza S	6	13	19
Dominância D	0,35	0,23	0,16
Diversidade	1,37	1,96	2,17
Equabilidade J	0,76	0,76	0,74

Escala de interpretação das cores

Menor valor  Maior valor

Ao avaliar a semelhança de eficiência entre as armadilhas CDC, TAHP e Shannon com base no índice de similaridade de Morisita (mede a similaridade entre duas comunidades), constatamos que as armadilhas mais semelhantes foram a Shannon e a TAHP. Além disso, observamos que as espécies comuns entre a Shannon e a TAHP foram *Cq. (Rhy.) fasciolata*, *Ma. (Man.) titillans* e *Aedes (Och.) scapularis* (Figura 28, Tabela 7).

Tabela 7. Abundância relativa de adultos de mosquitos capturados por armadilhas do tipo TAHP, CDC e Shannon na Trilha Amarela, área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

	TAHP	CD C	SHANNON	Total
<i>Ae. (Stg.) albopictus</i> (Skuse 1894)	1	1	0	2
<i>Ad. (Ady.) squamipennis</i> (Lynch Arribálzaga 1878)	0	1	3	4
<i>Ae. (Och.) scapularis</i> (Rondani), 1848	5	0	1	6
<i>Ae. (Och.) serratus</i> (Theobald, 1901)	0	0	3	3
<i>An. (Nys.) albitoris</i> (Lynch Arribálzaga, 1878)	0	8	43	51
<i>An. (Nys.) deaneorum</i> (Rosa-Freitas, 1989)	0	0	2	2
<i>An. (Nys.) evansae</i> (Brèthes 1926)	0	0	42	42
<i>An. evandroi</i> (Lima, 1937)/ <i>An. punctimacula</i> (Dyar & Knab, 1906)	0	0	1	1
<i>An. (Ano.) maculipes</i> (Theobald, 1903)	0	0	4	4
<i>Ch. fajardi</i> (Lutz, 1904)	0	0	1	1
<i>Cq. (Rhy.) chrysonotum</i> (Peryassú 1922)	0	1	2	3
<i>Cq. (Rhy.) albicosta</i> (Peryassú 1908)	0	2	14	16
<i>Cq. (Rhy.) fasciolata</i> (Lynch Arribálzaga 1891)	19	6	93	118
<i>Cq. (Rhy.) juxtamansonia</i> (Chagas 1907)	4	0	8	12
<i>Cq. (Rhy.) venezuelensis</i> (Theobald, 1912)	0	3	22	25
<i>Cx. (Mel.) cf. clarki</i> (Casal, 1963)	0	0	21	21
<i>Cx. (Mel.) cf. erraticus</i> (Dyar & Knab, 1906)	0	2	0	2
<i>Cx. (Mel.) cf. pereyrai</i> (Duret, 1967))	0	0	2	2
<i>Ma. (Man.) indubitans</i> (Dyar & Shannon, 1925)	0	1	0	1
<i>Ma. (Man.) titillans</i> (Walker 1848)	4	29	37	70
<i>Ps. (Jan.) ferox</i> (Humboldt 1819)	2	0	0	2
<i>Ur. (Ura.) calosomata</i> (Dyar & Knab, 1907)	0	0	2	2
<i>Ur. (Ura.) geometrica</i> (Theobald, 1901)	0	4	0	4
<i>Ur. (Ura.) pulcherrima</i> (Lynch Arribálzaga, 1891)	0	6	4	10
<i>Ur. (Ura.) davisi</i> (Lane, 1943)	0	3	0	3
Total	35	67	305	407

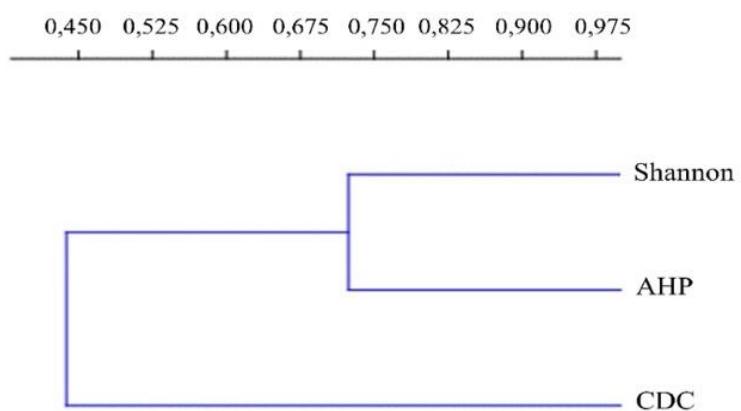


Figura 28. Índice de similaridade Morisita entre as armadilhas TAHP, CDC e Shannon usadas na Trilha Amarela, Reserva Ecológica do Guapiaçu Município de Cachoeiras de Macacu, período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

4.4.2 - Índices ecológicos de mosquitos adultos *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Haemagogus*, *Limatus*, *Psorophora*, *Rhynchotaenia*, *Sabethes*, *Trichoprosopon* e *Wyeomyia* encontrados nas Trilha Verde entre março de 2023 a fevereiro de 2024.

Na Trilha Verde, a TAHP, revelou a maior abundância absoluta de culicídeos, com 56 espécimes capturados, além de apresentar a maior riqueza de espécies ($S=13$) e diversidade ($H=2,2$). A armadilha Shannon foi a segunda em termos de riqueza ($S=5$) e diversidade ($H=1,56$). A armadilha CDC, por outro lado, exibiu baixa riqueza ($S=2$) e diversidade ($H=0,33$), combinadas com um elevado índice de dominância ($D=0,82$) (Tabela 8, Quadro 4)

Avaliamos as eficiências das armadilhas TAHP, CDC e Shannon usando o índice de similaridade Morisita, sendo possível verificar que as metodologias de Shannon e TAHP foram as mais similares entre si, observando que as espécies comuns entre as duas armadilhas foram *Rhynchotaenia (Run.) reverva*, *Aedes argyrothorax* e *Anopheles cruzii* (Quadro 4, Figura 29).

Tabela 8. Abundância relativa de adultos de mosquitos capturados por método de armadilhas do tipo TAHP, CDC e Shannon na Trilha Verde área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

	AHP	CDC	SHANNON	Total
<i>Ae. argyrothorax</i> (Bonne-Wepster & Bonne 1919)	7	0	2	9
<i>Ae. (Och.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	1	0	0	1
<i>An. cruzii</i> (Dyar & Knab, 1908)	1	0	1	2
<i>Culex</i> sp. (Linnaeus, 1758)	0	1	0	1
<i>Cx. (Cux.)</i> spp. (Linnaeus, 1758)	0	9	0	9
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i> (Theobald, 1903)	0	0	1	1
<i>Cx. (Mcx.)</i> sp. (Linnaeus, 1758)	2	0	0	2
<i>Hg. (Hag.) leucocelaenus</i> (Dyar & Shannon, 1924)	1	0	0	1
<i>Li. durhamii</i> (Theobald, 1901)	1	0	0	1
<i>Ps. (Jan.) ferox</i> (Humboldt, 1819)	3	0	0	3
<i>Rh. (Run.) reverva</i> (Lane and Cerqueira, 1942)	1	0	1	2
<i>Sa. chloropterus</i> (von Humboldt, 1819)	1	0	0	1
<i>Tr. (Tri.) digitatum</i> (Rondani, 1848)	0	0	1	1
<i>Tr. (Tri.) pallidiventer</i> (Lutz, 1905)	6	0	0	6
<i>Tr. compressum</i> (Theobald, 1901)	3	0	0	3
<i>Tr.</i> sp. (Theobald, 1901)	1	0	0	1
<i>Wy. (Pho.) edwardsi</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	8	0	0	8
Total	36	10	6	52

Quadro 4. Abundância, riqueza, dominância, diversidade e equitabilidade de adultos de mosquitos capturados por armadilhas do tipo TAHP, CDC e Shannon no ponto amostral Trilha Verde, Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

	TAHP	CDC	SHANNON
Abundância	36	10	6
Riqueza S	13	2	5
Dominância D	0,14	0,82	0,22
Diversidade H	2,22	0,33	1,56
Equitabilidade J	0,87	0,47	0,97

Escala de interpretação das cores

Menor valor  Maior valor

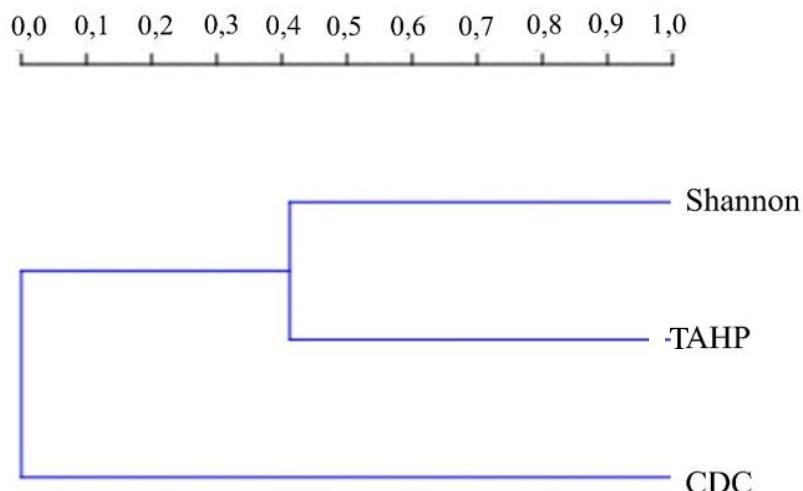


Figura 29. Índice de similaridade Morisita entre as armadilhas TAHP, CDC e Shannon usadas na Trilha Verde; Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

Foram identificadas 25 espécies distintas de culicídeos nas trilhas Amarela e Verde, conforme detalhado na Tabela 9. A análise dos dados revelou que a maior abundância absoluta de culicídeos ocorreu nos meses de novembro ($n=150$), outubro ($n=128$) e agosto ($n=119$) de 2023 (Figura 30).

Para o cálculo dos índices de diversidade, consideramos apenas os culicídeos identificados ao nível de espécie. Assim, os maiores índices de diversidade foram registrados em dezembro ($H=1,97$), novembro ($H=1,84$), maio ($H=1,74$) e julho ($H=1,71$) de 2023. Os meses com as maiores riquezas de espécies foram dezembro ($S=10$), novembro ($S=9$), outubro ($S=8$) e abril ($S=8$) de 2023. As maiores dominâncias foram observadas em fevereiro ($D=0,55$) e janeiro ($D=0,44$) de 2024, ambos com dominância da espécie *Cq. (Rhy.) fasciolata*, e em junho de 2023 ($D=0,38$) com dominância da espécie *An. (Nys.) albitalensis* (Quadro 5, tabela 9).

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar as medianas das duas trilhas, pois é um teste não paramétrico adequado para amostras independentes que não seguem uma distribuição normal. Os resultados obtidos indicam uma diferença estatisticamente muito significativa ($p < 0,01$) na abundância de culicídeos entre a Trilha Amarela e a Trilha Verde,

com $p = 0,0012$, confirmado pelo teste de Mann-Whitney ($U = 401,5$, $z = 32,37$, $p = 0,0012$). A Trilha Amarela apresentou uma maior abundância de culicídeos, representando 91% de todos os indivíduos coletados em ambas as trilhas, no entanto, a Trilha Verde apresentou mosquitos de gêneros e espécies com importância médica, como *Hg. leucocelaenus*, vetor silvestre da febre amarela (FA), e o gênero *Sabethes*, também relevante na transmissão do vírus da FA em áreas florestais.

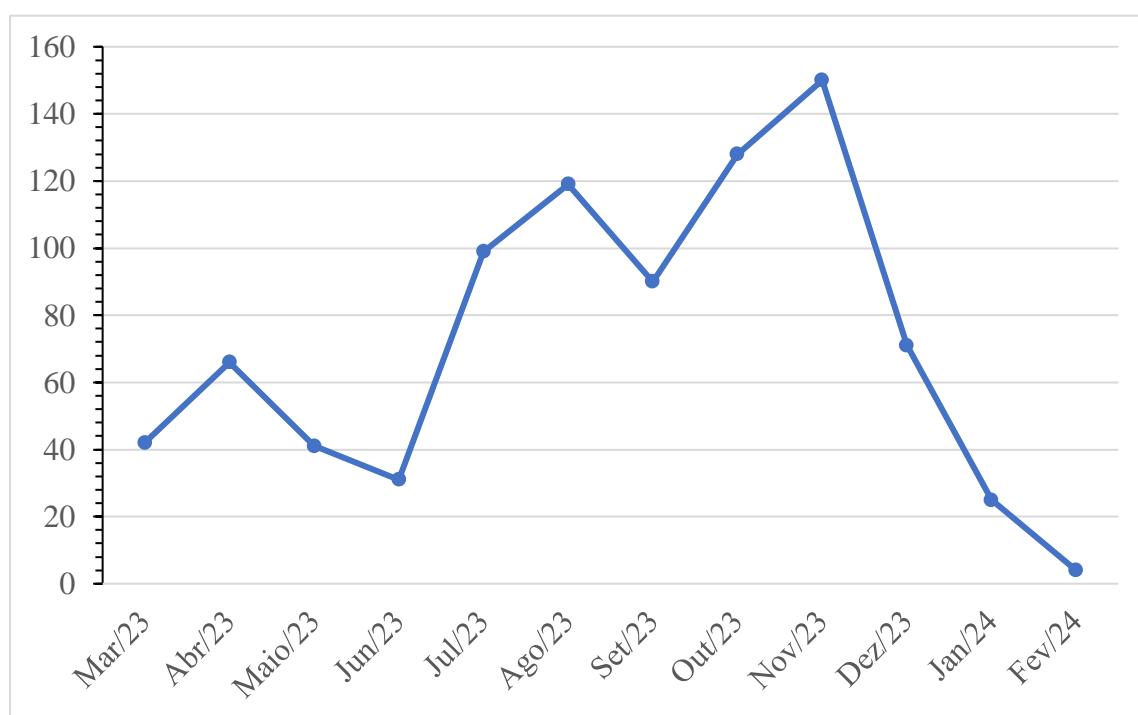


Figura 30. Variação da abundância de mosquitos por mês de coleta, Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

Tabela 9. Abundância relativa de adultos de mosquitos capturados por mês na área da Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, no período de março de 2023 a fevereiro de 2024.

Espécies	Mar/23	Abr/23	Maio/23	Jun/23	Jul/23	Ago/23	Set/23	Out/23	Nov/23	Dez/23	Jan/24	Fev/24
<i>Ae. (Stg.) albopictus</i> Skuse 1894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Ad. (Ady.) squamipennis</i> (Lynch Arribálzaga 1878)	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
<i>Ae. (Och.) scapularis</i> (Rondani 1848)	0	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<i>Ae. serratus</i> (Theobald, 1901)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>An. (Nys.) albitarsis</i> Lynch Arribálzaga, 1878	0	8	1	10	2	12	1	10	5	2	0	0
<i>An. (Nys.) deaneorum</i> Rosa-Freitas, 1989	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>An. (Nys.) evansae</i> (Brèthes 1926)	0	0	0	1	10	0	0	13	0	6	0	0
<i>An. evandroi</i> Lima, 1937/ <i>An. punctimacula</i> Dyar & Knab, 1906	0	0	0	0	0	0	0	1	12	0	0	0
<i>An. maculipes</i> (Theobald, 1903)	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
<i>Ch. fajardi</i> Lutz, 1904	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cq. (Rhy.) chrysonotum</i> (Peryassú), 1922	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Cq. (Rhy.) albicosta</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	7	5	0	0

(Peryassú 19 08)											
<i>Cq. (Rhy.) fasciolata</i> (Lynch Arribálzaga, 1891)	0	19	8	0	6	15	9	21	18	13	7
<i>Cq. (Rhy.) juxtamanson ia</i> (Chagas 1907)	0	4	6	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Cq. (Rhy.) venezuelensi s</i> (Theobald, 1912)	3	2	7	2	1	9	0	0	0	0	1
<i>Cx. (Mel.) cf. erraticus</i> (Dyar & Knab, 1906)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cx. (Mel.) cf. pereyrai</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cx. (Mel.) clark</i>	6	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0
<i>Ma. (Man.) indubitans</i> Dyar & Shannon, 1925	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ma. (Man.) titillans</i> (Wa lker 1848)	0	24	9	1	3	2	3	4	17	5	1
<i>Ps. (Jan.) ferox</i> (Humboldt 1819)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ur. (Ura.) calosomata</i> Dyar & Knab, 1907	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ur. (Ura.) geometrica</i> Theobald, 1901	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Ur. (Ura.) pulcherrima</i> Lynch Arribálzaga, 1891	0	0	0	2	4	0	2	0	0	2	0
<i>Ur. (Ura.) davisi</i> Lane, 1943	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Total</i>	14	64	35	17	28	44	30	55	67	39	11
											3

Quadro 5. Abundância, riqueza, dominância, diversidade e equitabilidade de espécies de Culicidae, em dois pontos de amostragem, período de março de 2023 a fevereiro de 2024, Reserva Ecológica do Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

	Mar-23	Apr-23	May-23	Jun-23	Jul-23	Aug-23	Sep-23	Oct-23	Nov-23	Dec-23	Jan-24	Feb-24
Abundância	42	66	41	31	99	119	90	128	150	71	25	4
Riqueza S	5	8	7	6	7	7	5	8	9	10	5	2
Dominância D	0,28	0,25	0,20	0,38	0,22	0,24	0,36	0,25	0,19	0,18	0,44	0,56
Diversidade H	1,44	1,62	1,74	1,32	1,71	1,60	1,23	1,62	1,84	1,97	1,16	0,64
Equitabilidade J	0,89	0,78	0,89	0,73	0,88	0,82	0,77	0,78	0,84	0,85	0,72	0,92

Escala de interpretação das cores

Menor valor  Maior valor

4.5 Infecção natural por transmissão vertical do vírus zika em mosquitos silvestres *Aedes albopictus* e *Haemagogus leucocelaenus*, estado do Rio de Janeiro, Brasil entre setembro de 2018 a março de 2019 (objetivo 6).

Foram processados 1843 espécimes de Culicidae em 725 pools de contendo de 1 a 33 insetos, pertencentes as espécies *Hg. leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924), *Ae. albopictus* (Skuse, 1984) e gêneros *Limatus* (Theobald, 1901), *Sabettus* (Robineau-Desvoidy, 1827), *Culex* (Linnaeus, 1758).

Seis pools de duas espécies, *Hg. leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924) e *Ae.albopictus* (Skuse, 1984) foram positivas para a detecção de Flavivírus por sequenciamento e identificadas como sendo vírus da zika e da febre amarela (Tabela 10). Na figura 31 pode-se observar a foto aérea com as indicações da localização aproximada de cada armadilha onde encontramos as amplificações positivas.

Este achado deu origem a uma publicação na Tropical Medicine and Infectious Disease no ano de 2021 (ALENCAR *et al.*, 2021). As sequências receberam os números de acesso MK972825, MK972826, MK972827, MK972828 e MK972829 no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Tabela 10. Detecção de vírus da febre amarela e da zika em *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus* em florestas primárias com base nos pools de insetos coletados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Pool ID	Espécies de Mosquito	Sexo	Total de Mosquitos	Mês/ano Coletado	Coordenadas Geográficas	Identificação das ovitrampas	Resultados PCR flavivirus	Sequências Encontradas
43	<i>Ae. albopictus</i>	♀	32	Jan/19	22°33'01.3"S 42°00'52.7"W	RPPNTM*	Positivo	zika
45	<i>Ae. albopictus</i>	♂	2	Out/18	22°31'40.1"S 42°02'58.6"W	FTM-2*	Positivo	zika
54	<i>Hg. leucocelaenus</i>	♀	6	Jan/19	22°35'11.98"S 43°24'34.12"W	Tinguá*	Positivo	zika
62	<i>Ae. albopictus</i>	♀	9	Out/18	22°31'43.9"S 42°02'56.8"W	FTM-3*	Positivo	Vírus febre amarela
64	<i>Hg. leucocelaenus</i>	♂	9	Set/18	22°31'49.5"S 42°02'56.3"W	FTM-37*	Positivo	Vírus febre amarela
65	<i>Hg. leucocelaenus</i>	♂	9	Out/18	22°31'43.5"S 42°02'56.3"W	FTM-7*	Positivo	Vírus febre amarela

*Pool ID, identificação do número de mosquitos processados por pool. FTM, Fazenda Três Montes, pontos 2, 3 e 7; RPPNTM, Reserva Particular do Patrimônio Natural Três Morros, ponto 32 (Município de Casimiro de Abreu); em Tinguá, Sítio Boa Esperança, (Município de Nova Iguaçu).



Figura 31. Localização dos *pools* de mosquitos encontrados positivos para febre amarela (FA) e zika vírus (VZIK) e a identificação numérica das armadilhas, coletados nos municípios de Nova Iguaçu e de Casimiro de Abreu no período de setembro de 2018 a março de 2019. Mapa. Fonte: Google maps, editado no Microsoft® Power Point for Mac Version 16.87.

5 DISCUSSÃO

5.1 Discussão (objetivos 1 e 2) - Resultados obtidos na Fazenda Três Montes, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro

Evidenciamos maior dominância de *Haemagogus leucocelaenus* (53%), ao passo que *Hg. janthinomys* foi a espécie em menor quantidade. *Aedes albopictus* e *Aedes terrens* apresentaram similaridade em suas abundâncias. Essa diferença no percentual da abundância de espécies pode ser um indicativo da variação nas condições ambientais e preferências de habitat. É sabido que a reprodução dos mosquitos está relacionada com local de oviposição, neste aspecto incluem-se a distribuição das larvas, interação com fatores químicos e físicos da água e temperatura ambiente (BENTLEY & DAY, 1989). Devemos também considerar que as espécies de *Hg. leucocelaenus* são acrodendrófilas, apresentando maior abundância próximo a copa das árvores (GARLINDO, CARPENTER, TRAPIDO 1955, ALENCAR, DÉGALLIER, N., *et al.* 2008).

Em relação a sazonalidade, verificamos que a espécie *Ae. albopictus* foi a mais abundante durante o inverno enquanto, *Hg. leucocelaenus* foi menos abundante, apesar de se manter abundante nas demais estações climáticas, o que pode ter implicações para a transmissão das arboviroses nos períodos menos frios (LIMA-CAMARA, 2016, LUDWIG, ZHENG *et al.*, 2019).

Quanto às diferenças das eclosões sazonais observadas nas imersões, a primavera, verão e outono apresentaram porcentagens similares de eclosões na primeira imersão comparado com as subsequentes imersões. No entanto, o inverno apresentou 98% de eclosões na primeira imersão comparado com apenas 2% nas subsequentes imersões. Provavelmente seja uma estratégia adaptativa dos culicídeos, pois períodos mais frios não possuem condições favoráveis a eclosão contínua de seus ovos, uma vez que a temperatura é uma variável de forte influência no ciclo de vida desses artrópodes (DE CASTRO *et al.*, 2013). Outros estudos também exploram essa relação das estações com a eclosão de ovos de culicídeos com resultados similares (ALENCAR *et al.*, 2022, SILVA *et al.*, 2021).

As ovitrampas que apresentaram maior número de ovos coletados foram aquelas que estavam em áreas de maior circulação de humanos e primatas - ovitrampas 2 e 7 respectivamente, indicando que a presença de vertebrados tem influência na manutenção da maior abundância de mosquitos, assim como indica a provável preferência de *Ae. albopictus* pelos humanos e do *Hg. leucocelaenus* por primatas (ALENCAR *et al.*, 2005, FITZPATRICK *et al.*, 2019).

Analizando as proporções de machos e fêmeas nas espécies estudadas, a maior proporção de fêmeas de *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* pode estar relacionada a características destas espécies, como o seu comportamento alimentar e adaptação ao fator climático. Já para as espécies de *Aedes*, observamos maior equilíbrio na proporção de machos e fêmeas, o que pode significar melhor adaptação das espécies, principalmente se analisamos que houve a quase totalidade de eclosões dos ovos nas primeiras imersões, essa capacidade adaptativa de *Ae. albopictus* inclusive como vetor e boa eficiência na transmissão de arboviroses tem sido relatada na literatura (ROMI *et al.*, 2006; WALTHER *et al.*, 2017).

5.2 Resultados da Fazenda Três Irmãos, Município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro (objetivo 3)

Um estudo que mapeou o risco de transmissão de arboviroses e extravasamento do vírus da febre amarela (VFA) no bioma da Mata Atlântica do Sudeste identificou o Rio de Janeiro como uma das áreas de maior risco, considerando a alta adequação para o vetor, a presença de primatas não humanos (PNH) como reservatórios hospedeiros e a elevada densidade populacional (LI *et al.*, 2022). A presença de mosquitos selvagens vetores em áreas florestais do Rio de Janeiro foi observada anteriormente em outros estudos (ALENCAR *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022). No presente estudo, o vetor com maior abundância foi *Hg. leucocelaenus*, no entanto, *Hg. janthinomys* e *Ae. terrens* também estiveram presentes. A ocorrência dessas espécies é preocupante porque *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* já foram relatados como vetores para VFA no Rio de Janeiro (DE ABREU *et al.*, 2019; ALENCAR *et al.*, 2021).

A estação chuvosa apresentou as densidades mais elevadas de populações de vetores, principalmente em dezembro de 2020, novembro de 2021 e janeiro de 2022; estes resultados corroboram os de outros estudos, que relataram picos elevados durante a estação chuvosa (ALENCAR *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022). Uma correlação positiva e significativa entre o número de ovos de Culicidae e a temperatura também foi observada na área de proteção ambiental Figueira Branca, localizada no município de Macaé, próxima ao distrito de Casimiro de Abreu, a 36,8 km da nossa área de estudo (SILVA *et al.*, 2022). Da mesma forma, em nosso estudo houve uma correlação positiva entre as espécies vetoras *Hg. leucocelaenus* e *Ae. terrens* com as variáveis ambientais temperatura e umidade. *Haemagogus janthinomys* teve uma correlação positiva e estatisticamente significativa com a precipitação. A dinâmica da transmissão de arbovírus parece ser significativamente influenciada pelas condições ambientais. Observou-se que as temperaturas elevadas aumentam o tamanho das populações de

mosquitos, e a densidade de mosquitos tem sido fortemente associada à propagação de patógenos por eles transportadas, como a FA. Fatores climáticos como a precipitação, parecem preceder as epidemias de ZIKV e CHIKV (FULLER *et al.*, 2017; BELLONE & FAILLOUX, 2020).

Os diferentes mecanismos de adaptação e sobrevivência que os mosquitos desenvolveram ao longo das suas trajetórias evolutivas são responsáveis pelo seu notável sucesso evolutivo em climas tropicais e temperados (DINIZ *et al.*, 2017). Algumas espécies exibem a estratégia de dormência dos ovos (diapausa ou quiescência) como uma tática reprodutiva que lhes permite suportar longos períodos em ambientes que não são adequados para a eclosão (VINOGRADOVA, 2007). *Haemagogus leucocelaenus* eclodiu até a décima quinta imersão e a necessidade de múltiplas imersões para a eclosão dos ovos nesta espécie também foi observada por Silva *et al.* (2018), que mostraram que *Hg. leucocelaenus* apresentou eclosão parcelada até a trigésima sétima imersão.

A seleção dos locais de oviposição pelas fêmeas é o principal fator responsável pela distribuição dos mosquitos na natureza (CONSOLI, 2003). Ovos de espécies epidemiologicamente importantes estavam presentes no mesmo local de reprodução (ovitrampas); eles pertenciam a *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys* e *Ae. terrens*. As espécies que foram observadas partilhando a mesma ovitrampa com mais frequência foram *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*, provavelmente devido ao fato de serem co-genéricas. *Haemagogus leucocelaenus* e *Ae. terrens* também foram observados partilhar o mesmo local de reprodução; no entanto, este cenário foi menos frequente. Essas observações corroboram com Silva *et al.* (2022) em que os autores observaram que essas espécies compartilhavam o mesmo criadouro e apresentavam correlação positiva entre si. A co-ocorrência destas espécies vetoras pode implicar a sobreposição do agente etiológico que transmitem, como o VFA (*Hg. leucocelaenus*) e o CHIKV (*Ae. terrens*) (GIOVANETTI *et al.*, 2019; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & FAILLOUX, 2017).

A compreensão da presença, abundância sazonal de vetores silvestres, e possível contato com reservatórios e seres humanos em fragmentos da Mata Atlântica no Rio de Janeiro é de grande interesse para a saúde pública, uma vez que pode ajudar a prever possíveis áreas de alastramento da FA. O conhecimento sobre as populações de mosquitos vetores desempenha um papel fundamental no fornecimento de uma estrutura para proteger os primatas selvagens e a saúde dos seres humanos, juntamente com a preservação dos ecossistemas que compartilhamos.

5.3 Aspectos ecológicos de imaturos (Diptera: Culicidae) em remanescente de Mata Atlântica, Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro (objetivo 4).

Entre os meses de setembro de 2022 a março de 2023 foram realizadas as análises de diversidade, abundância, uniformidade e dominância de Culicidae em diferentes habitats larvais (folhas caídas, bromélias, bambus cortados e lona) no Sítio Terra Boa, Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro.

Foi constatada pelo índice de Shannon que a maior diversidade foi registrada no mês de dezembro de 2022 ($H=1,72$), seguido por setembro ($H=1,71$), sendo dezembro o mês mais quente daquele ano a partir de uma elevação gradual da temperatura desde o mês de outubro (figura 32), isso reflete os dados já constantes na literatura onde os meses mais quentes e úmidos são mais propícios para maior abundância de mosquitos (SOUZA, 2000; MEDEIROS-SOUZA *et al.*, 2015; ALENCAR *et al.* 2021; SILVA *et al.*, 2022). Setembro de 2022, foi o mês que apresentou o maiores Índice de Equabilidade (J), indicando uniformidade na distribuição de indivíduos entre as espécies.

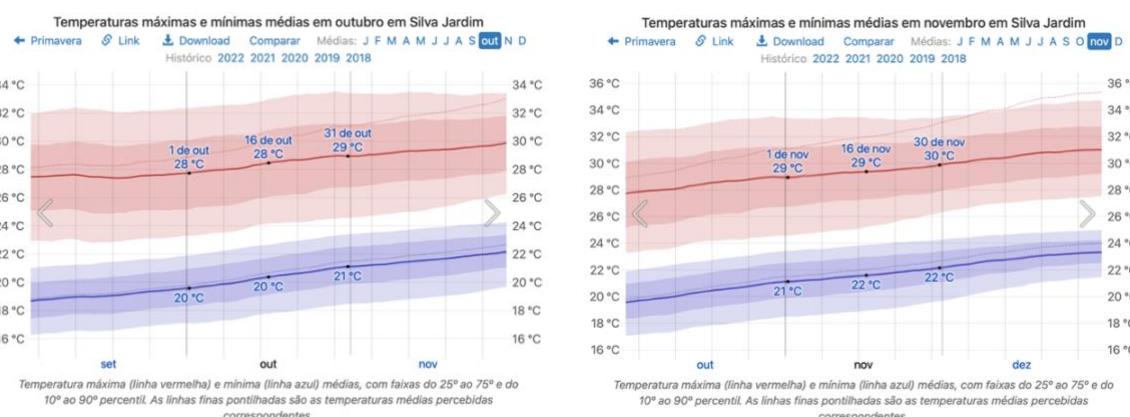


Figura 32. Dados da temperatura no Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, nos meses de outubro e novembro de 2022. Fonte: <https://pt.weatherspark.com>

Os índices de dominância corroboram ainda mais essa observação, demonstrando que os meses de outubro a novembro de 2022, marcados por maiores índices pluviométricos e de temperatura (figuras 33 e 34 (“Weatherspark”, [S.d.]), favoreceram a dominância dos Culicidae, com um D de 0,48. Especificamente, a espécie *Culex iridescens* apresentou uma densidade populacional notável, com 718 espécimes registrados durante esse período. Essa associação entre fatores climáticos e a dinâmica populacional de espécies específicas destaca a influência crítica das condições ambientais na ecologia dos mosquitos durante os meses analisados.

Foi realizada a análise de similaridade multivariada de Bray-Curtis para avaliar a composição e variabilidade mensais em um conjunto de dados ambientais, focando a similaridade entre os meses estudados. Notadamente, os meses mais semelhantes entre si foram setembro e novembro de 2022 (índice de Bray-Curtis de 0,62) e outubro e dezembro de 2022 (0,53) sendo este último idêntico ao mês de março de 2023. Analisando a média das temperaturas e pluviosidade do mês de março, verificamos que elas também foram semelhantes, isso pode ser um dos fatores que contribuíram para estes índices (figura 34).

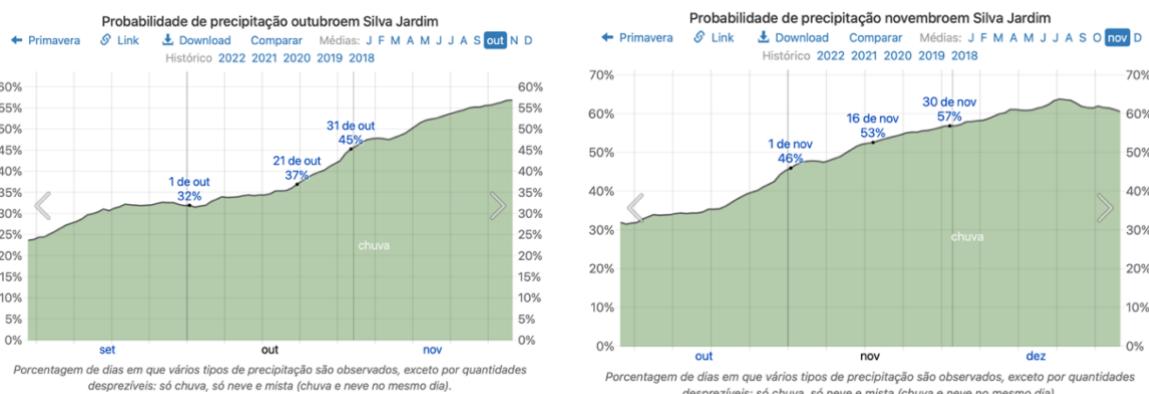


Figura 33. Dados pluviométricos do Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, nos meses de outubro e novembro de 2022. Fonte: <https://pt.weatherspark.com>

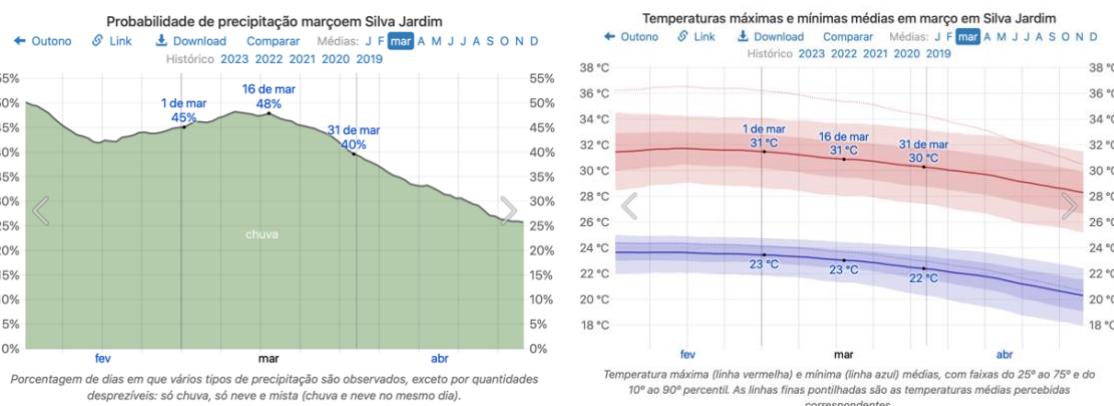


Figura 34. Dados pluviométricos e de temperatura do Município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, no mês de março de 2023. Fonte: <https://pt.weatherspark.com>

Analizando os espécimes coletados nas bromélias, foi observado o maior índice de diversidade com valor de 1,28, enquanto o criadouro de folha caída apresentou o menor índice de diversidade de 0,64. No entanto, o criadouro de folha caída apresentou o maior índice de equitabilidade de 0,92 quando comparado aos demais criadouros. O maior índice de dominância

foi observado no criadouro de bambu com índice D de 0,64, que apresentou alta abundância de espécies de *Culex iridescens*. Tais achados demonstram que o local de reprodução desempenha um papel significativo na determinação da diversidade e abundância de espécies de Culicidae e podem estar relacionados ao tamanho e preservação dos criadouros, uma vez que os bambus oferecem maior proteção aos ovos dos mosquitos enquanto as folhas não tem muita proteção além da área ser pequena. Entretanto, precisamos ainda proceder novos estudos para compreender essa maior dominância das espécies *Culex iridescens*; supondo que ela tenha maior capacidade de adaptação frente as demais espécies e sua preferência por bromélias como apontado no estudo de Medeiros-Sousa (2015).

Observamos duas espécies eudominantes de Culicidae, sendo *Culex iridescens* e *Culex pleuristriatus* com frequência de 51% e 17% respectivamente. Adicionalmente, identificamos duas espécies dominantes de Culicidae, *Trichoprosopon digitatum* e *Wyeomyia edwardsi*, com frequências de 6,4% e 9,1%, respectivamente. As espécies que apresentaram menor dominância, e assim classificadas como raras foram *Aedes scapularis*, *Culex neglectus*, *Culex retrosus*, *Hg. janthinomys*, *Toxorhynchites trichopygus* e *Toxorhynchites violaceus*. Estes dados estão compatíveis com publicações de diversos autores (TUBAKI *et al.*, 2010, CERETTI-JÚNIOR *et al.*, 2014; DE ABREU *et al.*, 2019b; SARAIVA *et al.*, 2020; BASTOS, 2021; SILVA *et al.*, 2021, TUBAKI *et al.*, 2023).

5.4 Índices ecológicos de adultos (Diptera: Culicidae) coletados em remanescente de Mata Atlântica, Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu (REGUA), Município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro (objetivo 5).

O estudo envolveu o uso dos métodos de captura de adultos TAHP, CDC e Shannon entre os meses de março de 2023 até fevereiro de 2024, além da análise dos dados de abundância, riqueza, diversidade, equitabilidade e dominância dos culicídeos capturados nas Trilhas Amarela e Verde da REGUA.

Analizando a abundância total de culicídeos a cada mês, foi possível ver que os meses de outubro até dezembro de 2023 foram os que apresentaram maior abundância de culicídeos (Figura 30), evidenciando mais uma vez a contribuição do fator climático temperatura, umidade e o período de incidência solar (FERREIRA, 2017, DA CRUZ *et al.*, 2019, SANTOS *et al.*, 2020, LI *et al.*, 2022, ALENCAR *et al.*, 2022). A temperatura que observamos no local variou entre 28°C e 39°C, sendo que, para corroborar com estes dados, consultamos o site da weatherspark. Infelizmente o mesmo não possui mais a estação meteorológica de registro de

dados climáticos ativos para a região em estudo, apenas os dados referentes aos aeroportos do Rio de Janeiro. Estes dados de temperatura, incidência da luz solar e umidade podem ser observados nas figuras 35, 36 e 37. Já os maiores índices de diversidade (H) ocorreram em novembro e dezembro de 2023, seguidos pelos meses de maio e julho do mesmo ano. Apesar de no site da weatherspark apontar que, para o Rio de Janeiro, os meses de maio a agosto apresentarem temperaturas mais amenas, o mesmo não foi observado quando estivemos na coleta de campo, exceto em junho, quando a sensação térmica na REGUA era mais fresca. A maior abundância, diversidade e equabilidade encontradas em junho talvez possa ser devido a nebulosidade e incidência solar (Figuras 36 e 38) apresentadas entre o final de junho e início de julho, fazendo com que a área de coleta se apresentasse abafada e assim favorecendo a eclosão de maior número de culicídeos. Esses dados estão condizentes com relatos presentes na literatura (SOUZA, 2000; MEDEIROS-SOUZA *et al.*, 2015; ALENCAR *et al.* 2021; SILVA *et al.*, 2022). As mesmas observações podem ser atribuídas para a baixa diversidade em janeiro e fevereiro de 2024 ($H= 1,16$ e $0,64$ respectivamente), quando tivemos menor incidência pluviométrica, conforme observamos nas coletas de campo e pelas informações fornecidas pelos trabalhadores da REGUA, deste modo, não favorecendo a eclosão de insetos.

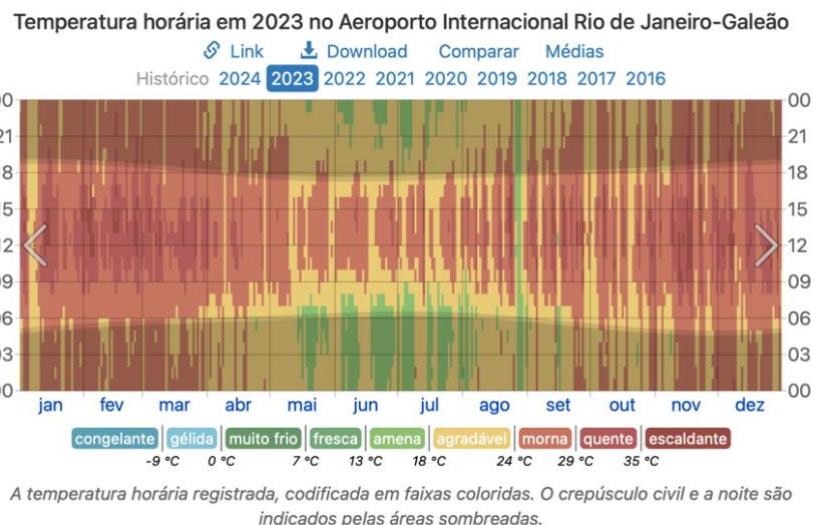


Figura 35 – Dados de temperatura média em 2023 no Rio de Janeiro. Fonte: <https://pt.weatherspark.com/h/y/147597/2023/Condições-meteorológicas-históricas-durante-2023-no-Aeroporto-Internacional-Rio-de-Janeiro-Galeão-Rio-de-Janeiro-Brasil>



Figura 36 – Dados de incidência solar em 2023 no Rio de Janeiro. Fonte: <https://pt.weatherspark.com/h/y/147597/2023/Condições-meteorológicas-históricas-durante-2023-no-Aeroporto-Internacional-Rio-de-Janeiro-Galeão-Rio-de-Janeiro-Brasil>



Figura 37 – Dados de umidade relativa do ar em 2023 no Rio de Janeiro. Fonte: <https://pt.weatherspark.com/h/y/147597/2023/Condições-meteorológicas-históricas-durante-2023-no-Aeroporto-Internacional-Rio-de-Janeiro-Galeão-Rio-de-Janeiro-Brasil>

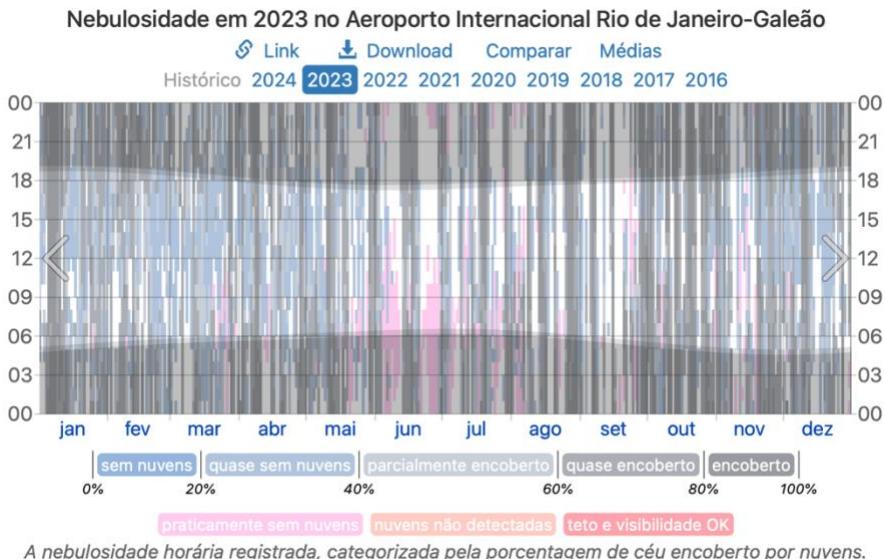


Figura 38 – Dados de nebulosidade em 2023 no Rio de Janeiro. Fonte: <https://pt.weatherspark.com/h/y/147597/2023/Condições-meteorológicas-históricas-durante-2023-no-Aeroporto-Internacional-Rio-de-Janeiro-Galeão-Rio-de-Janeiro-Brasil>

Na análise comparativa entre as Trilhas Amarela e Verde, atribuímos a maior abundância de culicídeos na Trilha Amarela (tabelas 7 e 8) à presença mais frequente de aves, répteis e mamíferos, como capivaras, antas e humanos, o que aumenta a disponibilidade de fontes alimentares para esses mosquitos. Em contraste, na Trilha Verde, que é pouco frequentada por humanos, mas conta com a presença de outros animais, a maior extensão da área permite maior dispersão dos animais e, consequentemente, dos mosquitos, resultando em uma menor densidade de culicídeos coletados.

Damos destaque a presença do *Hg. leucocelaenus*, *Sa. chloropterus* e *Ae. argyrothorax*, apesar da baixa abundância na Trilha Verde, uma vez que são considerados vetores importantes na transmissão de arboviroses como a febre amarela e vírus Ilhéus (GUBLER, 2001, PAUVOLID-CORRÊA, 2010, WILKERSON, 2015, GARDNER & RYMAN, 2015, DONALISIO, RICARDO, ZUBEN, 2017, KUNO *et al.*, 2017)

Ao analisarmos os dados de eficiência entre as armadilhas TAHP, CDC e Shannon, verificamos pelo índice de similaridade Morisita, que tanto a Shannon quanto a TAHP apresentaram a mesma eficiência, sendo as espécies em comum entre elas *Ae. (Och.) scapularis*, *Cq. (Rhy.) fasciolata* e *Ma. (Man.) titillans*, com maior abundância do *Cq. (Rhy.) fasciolata*, que já foi apontado como culicídeos presentes em áreas de degradação por ação antrópica (FORATTINI, 2002b, GUIMARÃES, 2003). Provavelmente essa maior eficiência se deve ao

fato de que os mosquitos são atraídos por algumas substâncias químicas que os vertebrados exalam, como o dióxido de carbono (CO_2), cuja concentração atmosférica está entre 300 e 400 ppm (partes por milhão), mas basta que ela se eleve em 0,03% para que as fêmeas de *Ae. aegypti* sejam atraídas. Ao que parece, a mistura de CO_2 e ácido láctico também é capaz de atrair as fêmeas, entretanto apenas o ácido láctico não tem poder atrativo (EIRAS & JEPSON, 1991). Encontramos descrição na literatura que os insetos hematófagos são atraídos pelos cairomônios exalados pelas pessoas presentes (CASAGRANDE, 2018) e, como durante a coleta de campo devido as condições climáticas, com o calor e esforço físico, o grupo exalava maior quantidade de CO_2 , certamente foi um fator contribuinte para nossos resultados.

As armadilhas CDC com atração luminosa apesar de apresentarem resultados menos eficientes, não deixam de ser importantes no estudo, entretanto existem outros tipos de armadilhas CDC como a CDC+ CO_2 +lurex® e Mosquito Magnet® (CHAVES, 2012), entretanto estas não seriam práticas em nosso trabalho devido a dificuldade de transporte das mesmas (Figuras 39 e 40). Devemos ainda considerar que a única forma de atração para os mosquitos na armadilha CDC é somente pela presença da luz, e mesmo que realizássemos o uso de armadilhas CDC com fonte luminosa de diferentes comprimentos de onda, como luz branca, azul verde ou ultravioleta utilizadas em outros estudos (VANDERLEI, 2013; MÜLLER, 2019; ARAUJO, 2021), não poderíamos garantir que esse resultado seria diferente.

Analizando os dados das armadilhas empregadas na Trilha Amarela, apesar da diferença encontrada nos dados de abundância absoluta dos culicídeos, podemos constatar que os dados de riqueza e diversidade foram maiores com as armadilhas Shannon e CDC ao passo que na TAHP, conforme citado anteriormente, houve uma maior dominância de *Cq. (Rhy.) fasciolata*, um mosquito notoriamente voraz e hematofágico, que apresenta atividade predominantemente crepuscular e noturna e com maior presença em áreas de mata com presença antrópica (FORATTINI, 2002b, GUIMARÃES, 2003). Esse padrão sugere uma provável atração pelos humanos devido a maior concentração do CO_2 exalado.

Em relação as armadilhas usadas na Trilha Verde, a similaridade metodológica das armadilhas Shannon e TAHP, calculado pelo índice Morisita, foi a mesma observada na Trilha Amarela, entretanto a espécie em comum encontrada nestas armadilhas foram *Ae. argyrothorax*, *Rh. (Run.) reverva* e *An. cruzii*. Destacamos que *Ae. argyrothorax* é uma espécie apontada por se desenvolver em buracos de árvores, lagoas rasas e rochas, o que é compatível com o cenário encontrado na Trilha Verde (PEREIRA 2005, MÜLLER, 2008) e ser apontada como de importância médica (PAUVOLID-CORRÊA, 2010, WILKERSON, 2015).



Figura 39 – A - Armadilha Mosquito Magnet® , B – Detalhe do recipiente de captura

fonte: <https://www.walmart.com/ip/Woodstream-Executive-Mosquito-Magnet/714230969>



Figura 40 . Armadilha CDC + CO₂ + Lurex®

Fonte: CHAVES, 2012.

5.5 Infecção natural por transmissão vertical do vírus zika em mosquitos silvestres *Aedes albopictus* e *Haemagogus leucocelaenus* do Rio de Janeiro, Brasil (objetivo 6).

Por meio de sequenciamento, identificamos RNA de VZIK e VFA em duas espécies de mosquitos. O vírus da FA é geralmente encontrado em *Ae. albopictus*, *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* (MITCHELL *et al.*, 1987; MILLER *et al.*, 1989; CHANG *et al.*, 1995;

FIGUEIREDO, 2000; JOHNSON *et al.*, 2002; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2003) e circula em florestas em primatas não humanos como hospedeiros amplificadores. Esta é uma das primeiras detecções de RNA de VZIK em mosquitos selvagens presente em ambientes florestais das Américas. *Haemagogus leucocelaenus* parece ser uma espécie que, apesar de bem adaptada a ambientes silvestres, vem se adaptando a ambientes urbanos e *Ae. albopictus* está adaptado a ambientes silvestres e urbanos e é considerada epidemiologicamente, espécie importante envolvida no ciclo de transmissão dos arbovírus (TAVIL, 1985; MONTAGNER *et al.*, 2018; DE ABREU *et al.*, 2019a). *Aedes albopictus* já foi relatado como um vetor natural do VZIK em vários países (FIGUEIREDO *et al.*, 2010; GRARD *et al.*, 2014; FERREIRA-DE-BRITO *et al.*, 2016; KUNO *et al.*, 2017).

A presença de RNA de VZIK em *Hg. leucocelaenus*, uma espécie acrodendrófila, sugere uma espécie silvestre no ciclo de manutenção do VZIK no Brasil. Estudos de laboratório demonstraram a competência vetorial dos *Ae. albopictus* em transmitir VZIK. Além disso, a descoberta de RNA de VFA em *Ae. albopictus* nesta área sugere o risco de transbordamento da floresta para ambientes modificados por humanos (DI LUCA *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2019).

Haemagogus leucocelaenus pode se alimentar de uma ampla variedade de vertebrados. Os pássaros podem ser uma fonte de sangue comum para esta espécie. No entanto, esses insetos também podem se alimentar de várias espécies de mamíferos presentes em ambientes florestais, conforme demonstrado em estudos realizados nos estados do Rio de Janeiro e Goiás (CHOUIN-CARNEIRO *et al.*, 2016). *Aedes albopictus* realiza repasto sanguíneo principalmente de mamíferos, embora apresente uma tendência por sangue humano (CONSOLI, 1994; LIU *et al.*, 2017).

Aedes albopictus também foi considerado vetor biológico para dois outros arbovírus, CHIKV e DENV (DOS SANTOS *et al.*, 2018). Além disso, por meio de testes laboratoriais de coinfecção e superinfecção, a possibilidade de transmissão simultânea desses dois vírus para humanos foi demonstrada (RICHARDS *et al.*, 2006). Nossos resultados indicaram um possível ciclo silvestre para VZIK na América do Sul. *Aedes albopictus* habita ambientes florestais e peridomésticos no Rio de Janeiro (FARAJI *et al.*, 2014), portanto, há uma grande probabilidade de transporte viral entre esses habitats. Mosquitos dos estados do Ceará e Bahia, onde o VZIK foi encontrado em mamíferos, também devem ser estudados (LEROY *et al.*, 2009; FAVORETTO *et al.*, 2016). Embora um pequeno número de mosquitos tenha resultado positivo no estudo atual, *Hg. janthinomys* é um vetor VFA importante, e poderia transmitir VZIK (NEIBYLSKI & CRAIG, 1994). Esta espécie foi encontrada em uma floresta urbana (Parque Dois Irmãos) em Recife, Pernambuco, uma cidade altamente endêmica para VZIK; por

esse motivo, outros arbovírus (DENV e CHIKV) devem ser estudados de forma semelhante para infecção natural (MARCONDES & ALENCAR., 2010). A descoberta de VZIK em mosquitos criados a partir de ovos obtidos em condições naturais indica a transmissão vertical deste vírus.

O papel da transmissão vertical na manutenção de VFA e VZIK permanece obscura, mas sugere manutenção enzoótica desses vírus em ciclos silvestres. A transmissão vertical em mosquitos vetores já foi relatada de forma natural e experimental. Em 2016, a transmissão vertical do VZIK em larvas de *Ae. aegypti* foi detectada pela primeira vez, ao serem encontradas no campo, sob condições naturais (DA COSTA *et al.*, 2018). Em geral, a transmissão enzoótica de VFA ocorre principalmente em florestas, infectando humanos que entram na floresta para atividades como extração de madeira, pesca e caça. Essa infecção é possível devido não só a presença do vetor, mas também a presença de animais reservatórios, onde primatas e aves são apontados como os mais comuns, mas isso não exclui outros vertebrados como reservatório (ARAÚJO *et al.*, 2019; CATENACCI *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2022; DE ABREU *et al.*, 2019c; KUNO *et al.*, 2017; MONTAGNER *et al.*, 2018). No caso de *Hg. leucocelaenus*, que pode ir além dos ambientes florestais, podem infectar humanos de ambos os sexos e várias idades que vivem perto de florestas; assim, a transmissão não parece estar limitada a pessoas envolvidas no trabalho associado à floresta (LEROY *et al.*, 2009). Durante um surto ocorrido no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) entre 2008 e 2009, *Haemagogus leucocelaenus* infectados com o vírus da febre amarela (VFA) foram encontrados ao nível do solo. (OLIVEIRA *et al.* 2010). Esse resultado corrobora com a visão de que essa espécie pode representar um risco de transmissão de um arbovírus ao ser humano. Uma avaliação da competência vetorial dos *Hg. leucoceleanus*, que foram inoculados por via oral e intratoracica com VZIK, permitiu a detecção da disseminação deste arbovírus em *Hg. leucocelaenus*. No entanto, esta detecção foi observada em taxas muito baixas (FERNANDES *et al.*, 2019).

A ocorrência de VFA em condições naturais demonstra sua possível circulação em áreas de Mata Atlântica do município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro. Isso evidencia a transmissão silvestre ativa do VFA nas reservas naturais aqui estudadas e a abundância do principal mosquito vetor desse vírus no Brasil, indicando a necessidade da vigilância ativa do VFA em comunidades próximas às florestas e a oferta de vacina como medida preventiva para conter a disseminação da enfermidade. Florestas perto de áreas modificadas por humanos onde arbovírus foram encontrados, como florestas urbanas (por exemplo, Floresta da Tijuca no Rio de Janeiro, Buraquinho em João Pessoa e Dois Irmãos em Recife) devem ser priorizadas no desenvolvimento de estudos com essa abordagem. Some-se a isso a importância de se proceder

o monitoramento das espécies de mosquitos adaptados a ambientes urbanos, mais comumente *Ae. aegypti*, por transmitir VFA e VZIK entre humanos, e assim elaborar ações preventivas. Como ambos os vírus podem ser transmitidos por várias espécies de mosquitos, o transbordamento para florestas preservadas com vertebrados e mosquitos amplificadores selvagens deve ser considerado. No entanto, se não forem estudados, tais ciclos silvestres permanecerão ocultos, e baixos níveis de reatividade de anticorpos VZIK ou VFA de primatas perto de áreas urbanas (CAMPOS *et al.*, 2014, CATENACCI *et al.*, 2018, MOREIRA-SOTO *et al.*, 2018) não devem desencorajar estudos adicionais em tais áreas.

Os resultados apresentados aqui corroboram as advertências sobre a transmissão do VZIK de ambientes urbanos para florestais (BUENO *et al.*, 2016), fazendo com que a erradicação do vírus do continente seja altamente improvável e por isso, reforçando a necessidade de controle de mosquitos urbanos e o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Devido às evidências sobre a possível infecção natural e transmissão vertical de VFA e VZIK encontrados em *Hg. leucocelaenus* e *Ae. albopictus* em áreas de floresta em Casimiro de Abreu e em Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro, recomenda-se a vigilância entomológica ativa e constante na região para prevenir a disseminação desses vírus para outras áreas silvestres ou urbanas.

6. CONCLUSÕES

- *Haemagogus leucocelaenus* foi identificado como o táxon dominante na área de estudo do Município de Casimiro de Abreu.
- A estação climática do verão foi identificada como favorável ao aumento na abundância das espécies com importância médica, notadamente *Hg. leucocelaenus*, *Ae. albopictus* e *Ae. terrens*.
- Picos significativos nas abundâncias de ovos ocorreram em novembro de 2018, março, novembro e dezembro de 2019 e janeiro de 2020.
- *Haemagogus leucocelaenus* mostrou uma relação positiva com a temperatura, enquanto *Ae. terrens* correlacionou-se de maneira positiva com temperatura e umidade e *Ae. albopictus* com precipitação.
- *Haemagogus leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* apresentaram predominância de fêmeas, enquanto *Aedes* teve número de machos superior ou comparável ao de fêmeas.
- Em Silva Jardim, a fitotelma da bromélia apresentou a maior diversidade, enquanto folhas caídas tiveram a menor diversidade, porém alta equabilidade.
- O habitat larval bambu demonstrou o maior índice de dominância, com maior abundância de *Culex iridescens*.
- Em relação a abundância e diversidade de culicídeos coletados a armadilha de Shannon e o método TAHP foram os que apresentaram os resultados mais similares, enquanto a CDC demonstrou resultados mais divergentes.
- *Haemagogus janthinomys* foi a espécie com menor abundância, possivelmente devido ao maior número de imersões necessárias para a eclosão dos ovos.
- *Haemagogus leucocelaenus* mostrou maior dominância na maioria das áreas estudadas, indicando sua plasticidade adaptativa.
- Foi constatada uma diferença estatisticamente significativa na abundância de culicídeos entre as trilhas Amarela e Verde na Reserva Ecológica do Rio Guapiaçu. Trilha Amarela: maior abundância de culicídeos e dominância de *Coquillettidia fasciolata*, associada a áreas degradadas e maior presença antrópica. Trilha Verde: menor abundância de culicídeos e dominância de *Ae. argyrothorax* e *Culex* spp.
- Foi constatada a presença de *Hg. leucocelaenus*, *Ae. argyrothorax* e *Sa. chloropterus*, vetores da febre amarela e vírus Ilhéus na área da REGUA, Município de Cachoeiras de Macacu.

- Foram relatadas evidências de infecção natural e transmissão vertical de VFA e ZIKV em *Hg. leucocelaenus* e *Ae. albopictus* nas áreas de mata dos municípios de Casimiro de Abreu e Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro.
- A necessidade de monitoramento de *Hg. leucocelaenus* é destacada, pois a espécie pode transitar facilmente entre a Mata Atlântica e áreas urbanas.
- Desmatamento e mudanças no uso do solo aumentam interações entre fauna selvagem, mosquitos vetores e humanos, elevando o risco de transmissão de patógenos.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALATOOM, A.; PAYNE, D. "An Overview of Arboviruses and Bunyaviruses", **Labmedicine**, v. 40, n. 4, p. 237–240, 2009. DOI: 10.1309/LMPX9OEAOOPBCJH.
- ALENCAR, J., FERREIRA DE MELLO, C., SILVA, S. O. F., et al. "Effects of seasonality on the oviposition activity of potential vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the São João River Basin Environmental Protection Area of the state of Rio de Janeiro, Brazil", **European Zoological Journal**, v. 89, n. 1, p. 1018–1025, 2022. DOI: 10.1080/24750263.2022.2108513.
- ALENCAR, J., DE MELLO, C. F., MARCONDES, C. B., et al. "Natural infection and vertical transmission of zika virus in sylvatic mosquitoes *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenous* from Rio de Janeiro, Brazil", **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 2, 2021. DOI: 10.3390/tropicalmed6020099.
- ALENCAR, J., DE MELLO, C.F., GUIMARÃES, A.E., et al. "Culicidae Community Composition and Temporal Dynamics in Guapiaçu Culicidae Community Composition and Temporal Dynamics in Guapiaçu Ecological Reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil", **PloS One**, n. March 27, p. 16, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0122268. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122268>.
- ALENCAR, J., LOROSA, E. S., DÉGALLIER, N., et al. "Feeding patterns of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil", **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 6, p. 981–985, 2005. DOI: 10.1093/jmedent/42.6.981.
- ALKAN, C., ZAPATA, S., BICHAUD, L., et al. "Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus *Flavivirus*", **Journal of Virology**, v. 89, n. 23, p. 11773–11785, 2015. DOI: 10.1128/JVI.01543-15.Editor.
- ANDRADE, C., DOS SANTOS, L. U. "O Uso De Predadores No Controle Biológico De Mosquitos, Com Destaque Aos *Aedes*.", **Ib.Uinicamp.Br**, 2004. .
- ARAÚJO, P. A., FREITAS, M. O., CHIANG, J. O., et al. "Investigation about the occurrence of transmission cycles of arbovirus in the tropical forest, Amazon region", **Viruses**, v. 11, n. 9, 1 set. 2019. DOI: 10.3390/v11090774.
- ARAUJO, E.C., "Padronização e uso de armadilha luminosa Silva a base de leds (light-emitting diodes) nas capturas de mosquitos anofelinos no estado do Maranhão", **Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA**, 2021.
- ARRIGO, N. C., ADAMS, A. P., WEAVER, S. C. "Evolutionary Patterns of Eastern Equine Encephalitis Virus in North versus South America Suggest Ecological Differences and Taxonomic Revision", **Journal of Virology** v. 84, n. 2, p. 1014–1025, 2010. DOI: 10.1128/JVI.01586-09.
- AUGUSTE, A. J., LIRIA, J., FORRESTER, N. L., et al. "Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010", **Emerg. Infect. Dis.** v. 21, n. 10, 2015.
- AZARI-HAMIDIAN, S., NOROUZI, B., HARBACH, R. E. "A detailed review of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Iran and their medical and veterinary importance", **Acta Tropica**, v. 194, n. December 2018, p. 106–122, 2019. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.03.019.
- AZEVEDO, R. do S. da S., CRUZ, A. C. R., BARROS, V. L. R. de S., et al. "Pathogenesis of the Ilheus virus in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*)", **Revista Pan Amaz Saúde**, v. 1, n. 1, p. 73–80, 2010. DOI: 10.5123/S2176-62232010000100011.
- BÄCK, A. T., LUNDKVIST, A. "Dengue viruses - an overview", **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 1, n. 3, p. 1–21, 2013.

- BALTHAZAR, T.D'ALMEIDA, "Ecologia e vigilância entomológica de mosquitos (Diptera:Culicidae), vetores de arboviruses, no parque estadual dos Tês Picos, Estado do Rio de Janeiro", **Tese (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.** 2018.
- BARRETO, C. G., GONÇALVES, V., TEIXEIRA, L. H. dos S. "Plano de Manejo Reserva Biológica do Tinguá-RJ Reserva Biológica do Tinguá-RJ". **Plano de Manejo, volume 1, encartes 1, 2, 3.** Brasil, Ministério do Meio Ambiente. jun. 2006
- BASTOS, A. Q. "Bionomia de Culicidae e investigação natural por *Flavivirus* em uma paisagem do bioma da Mata Atlântica do Estado do Rio De Janeiro, Brasil". 2021. 143f. **Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ,** 2021.
- BASTOS, A. Q., LEITE, P. J., DE MELLO, C. F., *et al.* "Bionomy of mosquitoes in bamboo internodes in an Atlantic Forest remnant of the state of Rio de Janeiro, Brazil", **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 37, n. 4, p. 208–215, 2021. DOI: 10.2987/21-7044.
- BECK, C., WYCKOFF, R. "Venezuelan equine encephalomyelitis", **Science**, v. 88, p. 530, 1938.
- BELLONE, R.; FAILLOUX, A.B. "The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission." **Front. Microbiol.** 2020, 11, 1–15, doi:10.3389/fmicb.2020.584846.
- BERGREN, N. A., AUGUSTE, A. J., FORRESTER, N. L., *et al.* "Western Equine Encephalitis Virus: Evolutionary Analysis of a Declining Alphavirus Based on Complete Genome Sequences", **Journal of Virol.**, v. 88, n. 16, p. 9260–9267, 2014. DOI: 10.1128/JVI.01463-14.
- BLITVICH, B. J., FIRTH, A. E. "A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector", **Viruses**, v. 9, n. 154, p. 1–25, 2017. DOI: 10.3390/v9060154. .
- BORÉM, R.A.T, SANTOS, G.A., "Caracterização Da Camada Superficial Do Solo Em Ambiente Natural E Alterado De Mata Atlântica", **Sociedade Brasileira de Ecologia, periódicos e impressos digitalizados.** <http://seb-ecologia.org.br/revistas/indexar/anais/viiceb/resumos/212a.pdf>, acessado em 19 de agosto de 2024.
- BOCHORNY, T.; LOBÃO, A.Q.; QUINET, A.; *et al.* "Lista de espécies de plantas vasculares da Reserva Biológica do Tinguá. In: Catálogo de Plantas das Unidades de Conservação do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2023" <https://catalogo-ucs-brasil.jbrj.gov.br> . Acesso em 23 agosto 2024.
- BORGES, L., ZUCHI, N., SERRA, O. P., *et al.* "Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil", **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 57, n. 3, p. 215–220, 2015. .
- BRAACK, L., ALMEIDA, A. P. G. De, CORNEL, A. J., *et al.* "Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors", **Parasites & Vectors**, v. 11, n.29, 2018. DOI: 10.1186/s13071-017-2559-9. .
- BRABB, T., GIACOMO, R. F. Di. **Viral Diseases**. [S.l.], Elsevier Inc., 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-01-2-380920-9.00014-6>.
- BURGUEÑO, A., SPINSANTI, L., DÍAZ, L. A., *et al.* "Seroprevalence of St. Louis Encephalitis Virus and West Nile Virus (*Flavivirus*, *Flaviviridae*) in Horses, Uruguay", **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- CAMARÃO, A. A. R., SWANEPOEL, R., BOINAS, F., *et al.* "Development and analytical validation of a group-specific RT-qPCR assay for the detection of the Simbu serogroup orthobunyaviruses", **Journal of Virological Methods**, v. 271, n. April, p. 113685, 2019. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113685. .

- CAMPOS, Z., JULIANO, R., VELEZ, J., *et al.* "Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002706.
- CARDOSO, B. F., SERRA, O. P., BORGES, L., *et al.* "Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil", **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. September, p. 745–754, 2015. DOI: 10.1590/0074-02760150123.
- CARNAVAL, A. C., HICKERSON, M. J., HADDAD, C. F. B., *et al.* "Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot", **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785–789, 6 fev. 2009. DOI: 10.1126/science.1163583.
- CAROLINA, A., TERZIAN, B., MONDINI, A., *et al.* "Detection of Saint Louis Encephalitis Virus in Dengue-Suspected Cases During a Dengue 3 Outbreak", **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, 2011.
- CASAGRANDE, B. "Biogeografia da saúde: a escolha de armadilhas para a captura de flebotomíneos.", **Revista Geografia em Atos**, v. 3, p. 41-58, 2018. ISSN: 1984-1647.
- CATENACCI, L. S., FERREIRA, M. S., FERNANDES, D., *et al.* "Individual, household and environmental factors associated with arboviruses in rural human populations, Brazil", **Zoonoses and Public Health**, v. 68, n. 3, p. 203–212, 1 maio 2021. DOI: 10.1111/zph.12811.
- CATENACCI, L. S., NUNES-NETO, J., DEEM, S. L., *et al.* "Diversity patterns of hematophagous insects in Atlantic Forest fragments and human-modified areas of southern Bahia, Brazil", **Journal of Vector Ecology**, v. 43, n. 2, p. 293–304, 2018. DOI: 10.1111/jvec.12313. .
- CERETTI-JÚNIOR, W., MEDEIROS-SOUZA, A. R., MULTINI, L. C., *et al.* "Immature mosquitoes in bamboo internodes in municipal Parks, City of São Paulo, Brazil", **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 30, n. 4, p. 268–274, 2014. DOI: 10.2987/14-6403R.1.
- CHANCEY, C., GRINEV, A., VOLKOVA, E., *et al.* "The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus", **BioMed Research International**, v. 2015, n. Figure 2, 2015. DOI: 10.1155/2015/376230.
- CHAVES, L.S.M, Eficácia de três tipos de armadilhas para captura de culicídeos em área de Mata Atlântica no sudeste do Brasil. **Tese (Mestrado em Ciências, Epidemiologia), Universidade de São Paulo, SP, Brasil.** p. 1-95, 2012.
- CHAVES, L. S. M., RODRIGUES DE SÁ, I. L., BERGAMASCHI, D. P., *et al.* "Kerteszia theobald (Diptera: Culicidae) mosquitoes and bromeliads: A landscape ecology approach regarding two species in the Atlantic rainforest", **Acta Tropica**, v. 164, p. 303–313, 2016. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.09.023.
- FRAGA, I., RIBEIRO, F. "Bacias hidrográficas dos rios São João e das Ostras – águas, terras e conservação ambiental", **Consórcio Intermunicipal Lagos São João**, v.1 p.1-192, 2012
- CLAIROUIN, I. M. N. "Estudo dos Culicídeos (Diptera: Culicidae) nos Cemitérios das Ilhas da Madeira e do Porto Santo", 2009, 76 f. **Tese (Mestrado em Parasitologia Médica) – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade de Nova Lisboa, Portugal.** p. 1–63, 2009.
- COIMBRA, T. L. M., SANTOS, R. N., PETRELLA, S., *et al.* "Molecular characterization of two Rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in São Paulo state, Brazil and the development of a one-step RT-PCR assay for diagnosis", **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 50, n. 2, p. 89–94, 2008.
- CONSOLI, R. A. G. B., OLIVEIRA, R. L. de. "Classificação e principais espécies de importância sanitária". 228 p, **Editora FIOCRUZ, SciELO Books** [S.l: s.n.], 1994, ISBN 85-85676-03-5.
- CONSOLI, R. "Febre amarela". **Rev Soc Bras Med Trop** 2003, 2, 275–293.

- CUPP, E. W., HASSAN, H. K., YUE, X. I. N., *et al.* "NIH Public Access", v. 44, n. 1, p. 117–125, 2008.
- DA CRUZ, L.C.T.A., GUIMARÃES, A.G.F., DE SOUZA, E.M., *et al.* "Influence of climatic variables on the *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations in Mato Grosso, Brazil." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine. V. 53, p. 1-6. 2019. DOI: 10.1590/0037-8682-0185-2019
- DA SILVA PESSOA VIEIRA, C. J., STEINER SÃO BERNARDO, C., FERREIRA DA SILVA, D. J., *et al.* "Land-use effects on mosquito biodiversity and potential arbovirus emergence in the Southern Amazon, Brazil", **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 4, p. 1770–1781, 1 jul. 2022. DOI: 10.1111/tbed.14154.
- DE ABREU, F. V. S., DELATORRE, E., DOS SANTOS, A. A. C., *et al.* "Combination of surveillance tools reveals that yellow fever virus can remain in the same atlantic forest area at least for three transmission seasons", **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/0074-02760190076.
- DE ABREU, F. V. S., RIBEIRO, I. P., FERREIRA-DE-BRITO, A., *et al.* "*Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018", **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 218–231, 2019. DOI: 10.1080/22221751.2019.1568180. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>.
- DE CASTRO, F. P., MARTINS, W. F. S., DE LUCENA FILHO, M. L., *et al.* "Ciclos de vida comparados de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba", **Iheringia - Série Zoologia**, v. 103, n. 2, p. 118–123, 2013. DOI: 10.1590/S0073-47212013000200006.
- DIETZ, J. M., HANKERSON, S. J., ALEXANDRE, B. R., *et al.* "Yellow fever in Brazil threatens successful recovery of endangered golden lion tamarins", **Scientific Reports**, p. 1–14, 2019.
- DIALLO, D., SALL, A., BUENRMANN, M., *et al.* "Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southwestern Senegal", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001649.
- DINIZ, D.F.A., DE ALBUQUERQUE, C.M.R., OLIVA, L.O., *et al.* "Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success". **Parasit. Vectors** 2017, 10, 310, doi:10.1186/s13071-017-2235-0.
- DONALISIO, M. R., FREITAS, A. R. R., ZUBEN, A. P. B. V. "Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health", **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017. DOI: 10.1590/S1518-8787.2017051006889.
- DORVILLÉ, L. F. M. "Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in the literature", **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 31, n. 2, p. 68–78, 1996. DOI: 10.1076/snfe.31.2.68.13331.
- EIRAS, A.E. & JEPSON, P.C. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. **Bull. Entomol Res. Farnham Royal**, v.1, p. 151- 160, 1991. DOI:10.1017/s0007485300051221.
- ELLWANGER, J. H., KAMINSKI, V. de L., CHIES, J. A. B. "Rocio virus: an overview", **Revista Peruana de Divulgación Científica em Genética y Biología Molecular**, v. 2, n. July, p. 14–20, 2017.
- EPELBOIN, Y., TALAGA, S., EPELBOIN, L., *et al.* "Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–22, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005933.
- EVANS, A. B., PETERSON, K. E. "Throw out the Map : Neuropathogenesis of the Globally Expanding California Serogroup of Orthobunyaviruses", **Viruses**, p. 1–20, DOI: [10.3390/v11090794](https://doi.org/10.3390/v11090794) 2019.

- FERNANDO, J., SOUZA, W. M. De, PINHEIRO, F. D. P., *et al.* "Review Article Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological , and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus", **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, n. 5, p. 1019–1030, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0672.
- FERREIRA, A.T, "Aspectos bioecológicos de *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) em fragmento florestal urbano do Rio de Janeiro – RJ", **Tese (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ**, 72f, 2017.
- FIGUEIREDO, L.T.M, "Human urban arboviruses can infect wild animals and jump to sylvatica maintenance cycles in South America", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.9, article 259, 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00259.
- FITZPATRICK, D. M., HATTAWAY, L. M., HSUEH, A. N., *et al.* "PCR-Based Bloodmeal Analysis of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in St. George Parish, Grenada", **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 4, p. 1170–1175, 2019. DOI: 10.1093/jme/tjz037.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. São Paulo, Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2002a.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica Vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. 2. ed. São Paulo, Edusp, 2002b.
- FORRESTER, N. L., PALACIOS, G., TESH, R. B., *et al.* "Genome-Scale Phylogeny of the *Alphavirus* Genus Suggests a", **J. Virol.** p. 2729–2738, 2012. DOI: 10.1128/JVI.05591-11.
- FOSTER, W. A., WALKER, E. D. **Mosquitoes (Culicidae)**. [S.I.], Elsevier Inc., 2018.
- GARDNER, C. L., BURKE, C. W., TESFAY, M. Z., *et al.* "Eastern and Venezuelan Equine Encephalitis Viruses Differ in Their Ability to Infect Dendritic Cells and Macrophages: Impact of Altered Cell Tropism on Pathogenesis ", **Journal of Virology** v. 82, n. 21, p. 10634–10646, 2008. DOI: 10.1128/JVI.01323-08.
- FULLER, T.L., CALVET, G., GENARO ESTEVAM, C., *et al.* Behavioral, climatic, and environmental risk factors for Zika and Chikungunya virus infections in Rio de Janeiro, Brazil, 2015-16. **PLoS One**, 2017, 12, e0188002, doi:10.1371/journal.pone.0188002.
- GARDNER, C. L., RYMAN, K. D. "Yellow Fever: A Reemerging Threat", **Clinics in Laboratory Medicine, HHS Public Access**, v. 30, n. 1, p. 237–260, 2015. DOI: 10.1016/j.cll.2010.01.001.
- GEDDES, V. E. V., DE OLIVEIRA, A. S., TANURI, A., *et al.* "MicroRNA and cellular targets profiling reveal miR-217 and miR-576-3p as proviral factors during Oropouche infection", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–25, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006508.
- GIOVANETTI, M., DE MENDONÇA, M.C.L., FONSECA, V., *et al.* Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. **J. Virol.**, 2019, 94, doi:10.1128/JVI.01623-19.
- GO, YUN YOUNG; BALASURIYA, UDENI B. R.; LEE, C. "Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: Transmission and epidemiology of alphaviruses EXPERIMENTAL VACCINE Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses", **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. December, p. 58–77, 2014. DOI: 10.7774/cevr.2014.3.1.58.
- GOULD, E., PETTERSSON, J., HIGGS, S., *et al.* "Emerging arboviruses: Why today?" **One Health**, v. 4, n. April, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1016/j.onehlt.2017.06.001.
- GOUVEIA DE ALMEIDA, A. P. "Os Mosquitos (Diptera, Culicidae) e a Sua Importância Médica em Portugal: Desafios para o Século XXI", **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 6, p. 961–974, 2011. DOI: 10.20344/amp.1419.

- GRECH, M. G., MANZO, L. M., EPELE, L. B., *et al.* "Mosquito (Diptera: Culicidae) larval ecology in natural habitats in the cold temperate Patagonia region of Argentina", **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3459-y.
- GUBLER, D. J. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.
- GUBLER, D. J. "Human Arbovirus Infections Worldwide", **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13–24, 2001.
- GUIMARÃES, A.E., LOPES, C.M., MELLO, R.P., ALENCAR, J. "Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. 1 – Distribuição por habitat." **Cad. De Saúde Pública**, v. 4, n. 19, p. 1107-1116, 2003.
- HAHN, C. S., LUSTRIG, S., STRAUSS, E. G., *et al.* "Western equine encephalitis virus is a recombinant virus", **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, n. August, p. 5997–6001, 1988.
- HANLEY, K. A., MONATH, T. P., WEAVER, S. C., *et al.* "Fever versus Fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus Kathryn", **Infect. Genet. Evol. NIH Public Acces**, v. 2013, p. 292–311, 2014. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.03.008.
- HARBACH, R., "Mosquito Taxonomic Inventory" (<https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/>) acesso em 01 maio 2024, 11:30.
- HARBACH, R. E., KITCHING, I. J. "Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera)", **Systematic Entomology**, v. 23, n. 4, p. 327–370, 1998. DOI: 10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x.
- HARBACH, R. E., WILKERSON, R. C. "ZOOTAXA", **Zootaxa**, v. 5303, n. 1, p. 1–184, 2023. DOI: 10.11646/zootaxa.5303.1.1..
- HEINZ, F. X., STIASNY, K. "The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses : Implications for Infection and Immunoprophylaxis", **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 81, n. 1, p. 1–27, 2017.
- HOLBROOK, M. R. "Historical Perspectives on Flavivirus Research", **Viruses**, p. 1–19, 2017. DOI: 10.3390/v9050097.
- HUHTAMO, E., COOK, S., MOUREAU, G., *et al.* "Novel flaviviruses from mosquitoes: Mosquito-specific evolutionary lineages within the phylogenetic group of mosquito-borne flaviviruses", **Virology**, v. 465, p. 320–329, 2014. DOI: 10.1016/j.virol.2014.07.015.
- (ICTV), I. C. on T. of V. **International Committee on Taxonomy of Viruses**, <https://ictv.global/>. Consultado em 14 de março de 2024, 17:46[S.d.].
- IBGE, "Bacias do Brasil 1:250.000", 2019. <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/vegetacao/15842-bacias.html>, acessado em 21 de agosto de 2024.
- IBGE, "Mapa de vegetação do Brasil 1:250.000", 2021. <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/vegetacao/15842-bacias.html>, acessado em 21 de agosto de 2024.
- ICMBIO, "Tinguá conserva pedaço de Mata Atlântica" 08/09/2015. <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/noticias/destaque/tingua-conserva-pedaco-de-mata-atlantica> Acesso em 20 de agosto de 2024.
- INMET, "Normais Climatológicas (1991-2020) Brasil, 2022. " <https://portal.inmet.gov.br/normais>, acessado em 21 de agosto de 2024.
- JORNAL DA USP NO AR. "Hotspots" são um alerta para degradação ambiental", 7 dez. 2022. <https://jornal.usp.br/radio-usp/hotspots-sao-um-alerta-para-a-degradacao-ambiental/>.
- KEESING, F., HOLT, R. D., OSTFELD, R. S. "Effects of species diversity on disease risk", **Ecology Letters**, v. 9, n. 4, p. 485–498, 2006. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2006.00885.x.

- KENNEY, J. L., COUTO-LIMA, D., CAMPOS, Z. M. S., *et al.* "Ilheus Virus Isolation in the Pantanal, West-Central Brazil", **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 7, n. 7, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002318.
- KHETARPAL, N., KHANNA, I. "Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies", **Journal of Immunology Research**, v. 2016, n. 3, 2016. DOI: 10.1155/2016/6803098.
- KUNO, G., CHANG, G. J. "Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 608–637, 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.4.608.
- KUNO, G., MACKENZIE, J. S., JUNGLEN, S., *et al.* "Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality?" **Viruses**, p. 1–27, 2017. DOI: 10.3390/v9070185.
- LAMBERT, A. J., LANCIOTTI, R. S. "Consensus Amplification and Novel Multiplex Sequencing Method for S Segment Species Identification of 47 Viruses of the *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* and *Nairovirus* Genera of the Family *Bunyaviridae*", **J. Clin. Microbiol.** v. 47, n. 8, p. 2398–2404, 2009. DOI: 10.1128/JCM.00182-09.
- LANCIOTTI, R. S., KERST, A. J., NASCI, R. S., *et al.* "Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4066–4071, 2000.
- LI, S.L., ACOSTA, A.L., HILL, S.C., *et al.* "Mapping environmental suitability of *Haemagogus* and *Sabathes* spp. mosquitoes to understand sylvatic transmission risk of yellow fever virus in Brazil." **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2022, 16, e0010019, doi:10.1371/journal.pntd.0010019.
- LIMA-CAMARA, T. N. "Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil", **Rev. Saúde Pública**, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1590/S1518-8787.2016050006791.
- LING, J., SMURA, T., LUNDSTRÖM, J. O., *et al.* "Introduction and Dispersal of Sindbis Virus from Central Africa to Europe", **Journal of Virology**, v. 93, n. 16, 2019. DOI: 10.1128/jvi.00620-19.
- LONGOSZ, A. F., MEHTA, S. H., KIRK, G. D., *et al.* "Incorrect identification of recent HIV infection in adults in the United States using a limiting-antigen avidity assay.", **AIDS**, v. 28, n. 8, p. 1227–32, 15 maio 2014. DOI: 10.1097/QAD.0000000000000221.
- LOPES, O. de S., SACCHETTA, L. de A., FRANCY, D. B., *et al.* "Emergence of a new arbovirus disease in Brazil", **American Journal of Epidemiology**, v. 113, n. 2, p. 122–125, 1981.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.B. "High risk for Chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas." **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 2017, 11, 1–11, doi:10.1371/journal.pntd.0005698.
- LOZOVEI, A. L. "Microhabitats de Mosquitos (Diptera, Culicidae) em internódios de taquara na Mata Atlântica, Paraná, Brasil", **Lheringia Serie Zoologia**, p. 3–13, 25 maio 2001..
- LUDWIG, A., ZHENG, H., VRBOVA, L., *et al.* "Increased risk of endemic mosquito-borne diseases in Canada due to climate change", **Canada Communicable Disease Report**, v. 45, n. 4, p. 91–97, 2019. DOI: 10.14745/ccdr.v45i04a03. .
- LUNDSTRÖM, J. O., HENSSON, J.C., SCHÄFFER, M.L., *et al.* "Sindbis virus polyarthritis outbreak signalled by virus prevalence in the mosquito vectors", **PLoS Negl. Trop. Dis.**, p. 1–20, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007702.
- MACLACHLAN, N. J. **Fenner's Veterinary Virology**. [S.l: s.n.], 2017.
- MAIA, F. G. M., CHÁVEZ, J. H., DE SOUZA, W. M., *et al.* "Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirão Preto, Brazil: Report of one case", **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 96–97, 2014. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.05.018.

MEDEIROS-SOUSA, A. R., CERETTI-JÚNIOR, W., DE CARVALHO, G. C., *et al.* "Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an urban park: Larval habitats and temporal variation", **Acta Tropica**, v. 150, p. 200–209, 2015. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.08.002. .

MERCIER, A., OBADIA, T., CARRARETTO, D., *et al.* "Impact of temperature on dengue and Chikungunya transmission by the mosquito *Aedes albopictus*", **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-10977-4.

Meteoblue [S.d.] Disponível em:
https://www.meteoblue.com/pt/tempo/historyclimate/climatemodelled/cachoeiras-de-macacu_brasil_3468425 Acesso em: 23 agosto, 2024.

MITCHELL, C. J., FORATTINI, O. P., MILLER, B. R. "Vector Competence experiments with Rocio Virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil", **Rev. Saúde Públ. S. Paulo**, v. 3, n. 20, p. 171–177, 1986.

MLERA, L., MEADE-WHITE, K., SATURDAY, G., *et al.* "Modeling Powassan virus infection in *Peromyscus leucopus*, a natural host", **PLoS Negl. Trop. Dis.** p. 1–18, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005346.

MMA/IBAMA, "Plano de manejo Reserva Biológica do Tinguá – RJ", v.1, p.1-951. 2006
https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/mata-atlantica/lista-de-ucs/rebio-do-tingua/arquivos/copy_of_pm_rebio_tingua.pdf
acesso em 22 de agosto de 2024.

MONTAGNER, F. R. G., SILVA, O. S., JAHNKE, S. M. "Mosquito species occurrence in association with landscape composition in green urban areas", **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 233–239, 1 maio 2018. DOI: 10.1590/1519-6984.04416.

MOREIRA-SOTO, A., DE OLIVEIRA CARNEIRO, I., FISCHER, C., *et al.* "Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil", **mSphere** 2018. DOI: [10.1128/mSphere.00523-17](https://doi.org/10.1128/mSphere.00523-17).

MORRISON, T. E. "Reemergence of chikungunya virus." **Journal of virology**, v. 88, n. 20, p. 11644–7, out. 2014. DOI: 10.1128/JVI.01432-14.

MOTA, C., GERALDES, M.C., DE ALMEIDA, J.C., *et al.* "Características isotópicas (Nd e Sr), geoquímicas e petrográficas da intrusão alcalina do morro de São João: Implicações geodinâmicas e sobre a composição do manto sublitosférico". **Rev. do Inst. De Geociencias, USP**, v.9, n.1, p.85-100, jan. 2009.

MOUREAU, G., COOK, S., LEMEY, P., *et al.* "New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences", **PloS one**, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0117849.

NGUYEN, H. T., DUC, N. B., SHRIVASTAVA, R., *et al.* "HIV drug resistance threshold survey using specimens from voluntary counselling and testing sites in Hanoi, Vietnam", p. 115–121, [S.d.].

MÜLLER, N.F.D., "Atratividade de diferentes armadilhas luminosas para coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) e artrópodes não alvo em Cachoeirinha, RS", **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS**. p. 1-28, 2019.

MÜLLER, G.A., KUWABARA, E.F., DUQUE, J.E., *et al.* "New records species (Diptera: Culicidae) for Santa Catarina and Paraná (Brazil)", **Biota Neotrop.** v. 8, n. 4, p. 211-218, 2008.
NOGUEIRA, L. de S. P. "Avaliação da qualidade da água na RPPN Boa Esperança-Tinguá, RJ", 2015. 1–38 f. **Monografia – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro**, 2015.

NUNES, M. R. T., DE SOUZA, W. M., ACRANI, G. O., *et al.* "Revalidation and genetic characterization of new members of Group C (*Orthobunyavirus* genus, *Peribunyaviridae* family) isolated in the Americas", **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0197294. .

- NUNES, R. T., CASSEB, S. M. M., RODRIGUES, S. G., *et al.* "Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal", **J. Gen. Virol.**, n. 2010, p. 2420–2427, 2018. DOI: 10.1099/vir.0.019117-0.
- OLIVEIRA, S.V., BAIRROS, S., LOPES, J.T.S., "Surveillance of yellow fever in Caçapara do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil: a report on the epizootic of 2008-2009. **Rev. Pan-Amaz Saude**, v.1, n.1, p. 181-186. 2010. DOI: 10.5123/s2176-6223201000100025
- OLIVEIRA, M. A. de, GOMES, C. F. F., PIRES, E. M., *et al.* "Bioindicadores ambientais: Insetos como um instrumento desta avaliação", **Revista Ceres**, v. 61, p. 800–807, 2014. DOI: 10.1590/0034-737X201461000005. .
- ORIOLI, I. M., DOLK, H., LOPEZ-CAMELO, J. S., *et al.* "Prevalence and clinical profile of microcephaly in South America pre-Zika, 2005-14: prevalence and case-control study", **BMC Infectious Diseases**, n. j5018, 2005. DOI: 10.1136/bmjj5018.
- PABBARAJU, K., HO, K. C. Y., WONG, S., *et al.* "Surveillance of Mosquito-Borne Viruses in Alberta Using Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Generic Primers", **Vector-Borne Diseases, Surveillance, Prevention**, v. 46, n. 3, p. 640–648, 2009.
- PARRON, L. M., GARCIA, J. R., OLIVEIRA, E. B. de, *et al.* "Serviços ambientais em sistemas agrícolas e florestais do Bioma Mata Atlântica". Brasília, [s.n.], 2015.
- PASTULA, D. M., JOHNSON, D. K. H., WHITE, J. L., *et al.* "Jamestown Canyon Virus Disease in the United States — 2000 – 2013", **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 2, p. 384–389, 2015. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0196.
- PATEL, P., LANDT, O., KAISER, M., *et al.* "Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses", **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 58, 2013. DOI: 10.1186/1743-422X-10-58. .
- PAULA, M., MOURA, G., BASTOS, M. D. S., *et al.* "Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008", **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 2007–2008, 2012. DOI: 10.1089/vbz.2011.0669.
- PAUVOLID-CORREA, A., TAVARES, F.N., ALENCAR, J., *et al.* "Preliminary investigation of culicidae species in South Pantanal, Brazil and their potential importance in arbovirus transmission", **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 52, n.1, p. 17-20, 2010. doi: 10.1590/S0036-46652010000100004
- PAUVOLID-CORREA, A., CAMPOS, Z., SOARES, R., *et al.* "Neutralizing antibodies for orthobunyaviruses in Pantanal, Brazil", **PLoS Negl. Trop. Dis.** p. 1–11, 2017.
- PECL, G.T, ARAÚJO, M.B., BELL, J.D., *et al.* "Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being", **Science**, v.355, n. 1389, p. 1-9, 2017. DOI: 10.1126/science.aai9214. .
- PERERA-LECOIN, M., MEERTENS, L., CARNEC, X., *et al.* "Flavivirus Entry Receptors: An Update", **Viruses**, v. 6, p. 69–88, 2014. DOI: 10.3390/v6010069.
- PEREIRA, E.S., FERREIRA, R.L.M., HAMADA, N.; LICHTWARDT, R.W. "Trichomycete Fungi (Zygomycota) Associated with mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in Natural and Artificial Habitats in Manaus, AM Brazil." **Neotrop. Entomol.** V. 34 n. 2 p. 325-329, 2005.
- PFEFFER, M., DOBLER, G. "Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration", **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 35, p. 1–15, 2010.
- PINHEIRO, F.P., FREITAS, R.B., DA ROSA, T., *et al.* "An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil", **Am. J. Trop. Med. Hyg.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 30 n. 3, p. 674-681, 1981.
- POWERS, A. M. "Risks to the Americas Associated with the Continued Expansion of Chikungunya Virus.", **The Journal of General Virology**, 19 set. 2014. DOI: 10.1099/vir.0.070136-0.
- REINERT, J. F. "List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera)", **Journal of the European Mosquito Control Association**, v. 27, p. 68–76, 2009.

- RENAULT, D., DEROCLES, S.A.P., HAUBROCK, P., *et al.* "Biological, ecolocgical and trophic features of invasive mosquitoes and other hematophagous arthropods: What makes them successful?". **Biological invasions**, v. 26, p. 33-55, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-023-03158-5>.
- REZENDE, H.R., VIRGENS, T.M., LIBERATO, M.A., *et al.* "Aspectos ecológicos de culicídeos imaturos em larvitrampas de Floresta e ambiente antrópico adjacente no Município de Linhares, Espírito Santo, Brasil", **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, n. 3, p. 385-391, 2011.
- RODRIGUEZ-ROCHE, R., GOULD, E. A. "Understanding the Dengue Viruses and Progress towards Their Control", **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–20, 2013.
- ROEHRIG, J. T. "West Nile Virus in the United States — A Historical Perspective", **Viruses**, v. 5, p. 3088–3108, 2013. DOI: 10.3390/v5123088.
- ROMANELLI, C., COOPER, D., CAMPBELL-LENDRUM, D., *et al.* "Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health, a State of Knowledge Review", **World Health Organization and Secretariat for the Convention on Biological Diversity**, p. 360pp, 2015. DOI: 10.13140/RG.2.1.3679.6565.
- ROMI, R., SEVERINI, F., TOMA, L. "Cold acclimation and overwintering of female *Aedes albopictus* in Roma", **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 1, p. 149–151, 2006. DOI: 10.2987/8756-971X(2006)22[149:CAAOOF]2.0.CO;2..
- SAFRONETZ, D., SLOAN, A., STEIN, D. R., *et al.* "Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays", **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 9, p. 1577–1580, 2017.
- SANTIAGO, F. W., HALSEY, E. S., SILES, C., *et al.* "Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response", **PLoS Negl. Trop. Dis.**, p. 1–14, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004104.
- SANTOS, I.C. da S., BRAGA, C., SOUZA, W.V., *et al.* "The influence of meteorological variables on the oviposition dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in four environmentally distinct areas in northeast Brazil." **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.115, p. 1-10, 2020. DOI: 10.1590/0074-02760200046
- SARAIVA, J. F., MAITRA, A., SOUTO, R. N. P. "Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera, Culicidae) in a fragment of Amazon Cerrado in Macapá, State of Amapá, Brazil", **EntomoBrasilis**, v. 13, p. e901, 2020. DOI: 10.12741/embrasilis.v13.e901.
- SCHEUCH, D.E., SCHÄFER, M., EIDEN, M., *et al.* "Detection of Usutu, Sindibis, and Batai viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in Germany, 2011–2016", **Viruses**, v. 10, p. 389, 2018. DOI: 10.3390/v10070389
- SCHWEITZER, B. K., CHAPMAN, N. M., IWEN, P. C., *et al.* "Overview of the *Flaviviridae* with an Emphasis on the Japanese Encephalitis Group Viruses", **Labmedicine**, v. 40, n. 8, p. 493–499, 2009a. DOI: 10.1309/LM5YWS85NJPCWESW.
- SILVA, J. R., MEDEIROS, L. C. De, PINHO, V., *et al.* "Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil", **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. November, p. 921–923, 2013. DOI: 10.1590/0074-0276130052..
- SILVA, M. A. B., FREITAS, M. M., PENNA, B. M. de C., *et al.* "Plano de manejo, Parque Municipal de Nova Iguaçu". **Prefeitura da Cidade de Nova Iguaçu**, [S.l: s.n.], 2001.
- SILVA, S.O.F., DE MELLO, C.F., ÉRICO GUIMARÃES, A., *et al.* "Occurrence of the Sylvatic Yellow Fever Vector Mosquito *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest Fragment of the Touristic State of Rio de Janeiro, Brazil", **J. Med. Entomol.** 2022, 59, 1891–1897, doi:10.1093/jme/tjac153.
- SILVA, S. O. F., DE MELLO, C. F., FIGUEIRÓ, R., *et al.* "Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil", **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-85752-y.

- SIMMONDS, P., BECHER, P., BUKH, J., *et al.* "ICTV ICTV Virus Taxonomy Profile : *Flaviviridae*", **Journal of General Virology**, n. 98, p. 2–3, 2018. DOI: 10.1099/jgv.0.000672.
- SMITHBURN, K. C., HUGHES, T. P., PAUL, J.H., BURKE, A. W., "A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda", **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. S1-20, n. 40, p. 471-492 1940. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471>
- SOUZA, A. S. de. "Mosquitos (Diptera, Culicidae) das regiões de Pendotiba e Oceânica de Niterói (Rio de Janeiro, Brasil)", **Tese de mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia) UFRJ, Museu Nacional**, 2000.
- SULE, W. F., OLUWAYELU, D. O. "Analysis of *Culex* and *Aedes* mosquitoes in southwestern Nigeria revealed no west nile virus activity", **Pan African Medical Journal**, v. 23, p. 1–10, 2016. DOI: 10.11604/pamj.2016.23.116.7249.
- TANTELY, L. M., RANDRIANAMBINTSOA, F. J., WOOG, F., *et al.* "Horizontal and vertical distribution of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the rainforest of Maromizaha, Madagascar: implications for pathogen transmission to humans and animals", **Austral. Entomology**, v. 58, n. 4, p. 897-906, 2019. DOI: 10.1111/aen.12427
- TAVIL, P. L. "*Haemagogus leucocelaenus* em ambiente urbano", **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 5–6, 1985. .
- TEIXEIRA, M. G., SIQUEIRA JR., J. B., FERREIRA, G. L. C., *et al.* "Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000 – 2010): A Systematic Literature Search and Analysis", **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002520.
- TERZIAN, A. C. B., AUGUSTE, A. J., VEDOVELLO, D., *et al.* "Isolation and Characterization of Mayaro Virus from a Human in Acre, Brazil", **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 2, p. 401–404, 2015. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0417. .
- TUBAKI, R. M., DE MENEZES, R. M. T., VESGUEIRO, F. T., *et al.* "Observations on *Haemagogus janthinomys* Dyar (Diptera: Culicidae) and other mosquito populations within tree holes in a gallery forest in the Northwestern Region of Sao Paulo State, Brazil", **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 664–670, 2010. DOI: 10.1590/S1519-566X2010000400030.
- TUBAKI, R. M., DE MENEZES, R. M. T., DAVID, M.R., *et al.* "Physical attributes of tree holes in the Atlantic Forest edges: evaluating their association with presence and abundance of immature *Haemagogus leucocelaenus*.", **Tropical Medicine Infectious Disease**, v.8, v.7, p. 337, 2023. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070337>
- UNIDADES DE CONSERVAÇÃO NO BRASIL, <https://uc.socioambiental.org/en/arp/3202> acessado em 20 de agosto de 2024.
- VASCONCELOS, H.B., NUNES, M.R.T., CASSEB, L.M.N., *et al.* "Molecular Epidemiology of Oropouche Virus, Brazil", **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 800–806, 2011. DOI: 10.3201/eid1705.101333.
- VANDERLEI, A.M.S., CRUZ, D.L.V., BEZERRA, P.E.S., *et al.* "Análise da diversidade entomológica por meio de diferentes, armadilhas CDC", **Resumos Expandidos do I CONCIBIO, II CONABIO, VI SIMCIBIO, Universidade Católica de Pernambuco**, v. 2, p. 1-11, 2013.
- VENEGAS, E. A., AGUILAR, P. V., CRUZ, C., *et al.* "Ilheus Virus Infection in Human, Bolivia", **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 516–518, 2012.
- VINOGRADOVA, E.B. "Diapause in Aquatic Insects, with Emphasis on Mosquitoes. In *Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use*"; **Springer Netherlands: Dordrecht**, pp. 83–113, 2007.
- VITTOR, A. Y., ARMIEN, B., GONZALEZ, P., *et al.* "Epidemiology of emergent Madariaga Encephalitis in a region with endemic Venezuelan Equine Encephalitis: Initial Host Studies and Human Cross-Sectional Study in", **PLOS Negl. Trop. Dis.**, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004554.

- XIMENES, M.F.F.M., MARCONDES, C.B., SILVA, M.M.M., *et al.* "Atlantic Forest and Caatinga: Two Threatened Tropical Biomes in Brazil and Implications for Public Health", **Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences**, v. 3, n. 5, p. 641–658, 2022. DOI: 10.37871/jbres1491.
- WALTHER, D., SCHEUCH, D. E., KAMPEN, H. "The invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Germany: Local reproduction and overwintering", **Acta Tropica**, v. 166, p. 186–192, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.11.024.
- Weatherspark**. [S.d.]. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com>. Acesso em: 9 jun. 2023.
- WEAVER, S. C., WINEGAR, R., MANGER, I. D., *et al.* "Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence", **NHI Public Access**, v. 94, n. 3, p. 242–257, 2013. DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.04.002.Alphaviruses.
- WALTHER, D., SCHEUCH, D.E., KAMPEN, H. "The invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Germany: local reproduction ans overwintering. **Acta tropica**, v. 166, p. 186-192. ISSN: 0001-706X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.024>.
- WEBSTER, D., DIMITROVA, K., HOLLOWAY, K., *et al.* "California serogroup virus infection associated with encephalitis and cognitive decline, Canada, 2015", **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1423–1424, 2017. DOI: 10.3201/eid2308.170239.
- WILKERSON, R.C., LINTON, Y-M., FONSECA, D.M., *et al.* "Making mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships", **Plos One** v.10, n.7, p. 1-26, 2015. DOI:[10.1371/journal.pone.0133602](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133602)
- YAREN, O., ALTO, B. W., GANGODKAR, P. V, *et al.* "Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya", **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1186/s12879-017-2382-0.
- ZACKS, M. A., PAESSLER, S. "Encephalitic Alphaviruses", **NIH Public Acces**, v. 140, n. 409, 2011. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.08.023.ENCEPHALITIC. .
- ZANLUCA, C., MELO, V. C. A. de, MOSIMANN, A. L. P., *et al.* "First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil", **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ANEXO 1

scientific reports

Ecobiology of *Haemagogus leucocelaenus* arbovirus vector in the golden lion tamarin translocation area of Rio de Janeiro, Brazil

Sergio Lisboa Machado^{1,2}, Cecilia Ferreira de Mello³, Shayenne Olsson Freitas Silva³ & Jerônimo Alencar³

Significant pathogens that have resurfaced in humans originate from transmission from animal to human populations. In the Americas, yellow fever cases in humans are usually associated with spillover from non-human primates via mosquitoes. The present study characterized the prevalence of the yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* in Rio de Janeiro, Brazil. The Atlantic Forest fragment chosen is an area of translocation of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*), where 10 ovitraps were installed to collect mosquito eggs in Fazenda Três Irmãos, at Silva Jardim city, from March 2020 to October 2022. A total of 1514 eggs were collected, of which 1153 were viable; 50% belonged to medically important mosquito species and 24% to the yellow fever vector species, *Hg. leucocelaenus*. The months of December 2020 (n = 252), November 2021 (n = 188), and January 2022 (n = 252) had the highest densities of this vector. *Haemagogus leucocelaenus* was positively correlated with temperature ($r = 0.303$) and humidity ($r = 0.48$), with eggs hatching up to the 15th immersion with higher abundance of females. Implementing mosquito monitoring for arbovirus activity can help protect both the golden lion tamarin and human populations from the threat of arbovirus transmission.

Several diseases that have resurfaced or emerged in humans, such as ebola, sudden acute respiratory syndrome (SARS), influenza, primate malaria, yellow fever, and leptospirosis, originate from the transmission of pathogens from animal to human populations^{1,2}. Yellow fever virus (YFV) is an acute febrile infectious disease transmitted by vector mosquitoes, with two transmission cycles: wild (when transmission occurs in rural or forest areas) and urban (when transmission occurs in cities)^{3,4}. Even with a safe vaccine, YFV continues to cause morbidity and mortality in thousands of people in South America and Africa⁴. The recent introduction of YFV in the Americas makes neotropical non-human primates (NHP) highly susceptible to infection⁵.

The golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*; GLT) is a critically endangered primate found only in the Brazilian Atlantic Forest, mainly in the São João River basin, which is a fragment with limited forest connection to other fragments⁶. Golden lion tamarins are small arboreal primates that are particularly vulnerable to arbovirus infections due to their low genetic diversity and lack of prior exposure to many infectious agents. In addition, the species is susceptible to habitat loss and fragmentation, which can increase the risk of disease transmission⁷⁻⁹. Deforestation due to anthropic activities has reduced the population to a few hundred individuals in isolated forest fragments. Conservation work has resulted in the recovery of some GLT populations; however, YFV out-breaks threaten the conservation and maintenance of this species in nature¹⁰.

The Atlantic Forest fragment chosen for the sampling is an area of translocation of the GLT. Projects to reintroduce the species and establish protection areas, such as in Poço das Antas, Silva Jardim, resulted in an increase in the population of this species. However, significant reductions have recently been observed: population numbers declined from 3700 individuals in 2014 to 2516 in 2018, which is equivalent to a 32% decrease.

¹Laboratory of Molecular Diagnosis and Hematology, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil. ²Graduate Program in Animal Biology, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil. ³Diptera Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro 21040-360, Brazil.  email: jalencar@ioc.fiocruz.br

In May 2018, there was a report of the first death of a wild GLT due to YFV in decades. In response to this event, a new count carried out in the Poço das Antas reserve determined that a significant loss of these tamarins occurred inside the larger forest fragment rather than on its edges¹⁰. In forest areas of the Americas, YFV is transmitted by infected mosquitos belonging to the genus *Haemagogus* Williston, 1896 and *Sabestes* Robineau-Desvoidy, 1827¹¹. *Haemagogus* mosquito species, whose larval habitats are stumps of trees, bromeliads, and bamboo, are diurnal and are frequently found near the treetops. This makes GLTs a blood-meal source option, putting them at risk for YF infection^{12,13}. Regarding blood source preference, *Hg. leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 prefer NHP, although this species and *Hg. janthinomys* Dyar, 1921/*capricornii* Lutz, 1904 are eclectic in their host preference for biting other animals, such as cattle, birds, dogs, rodents, and horses, adapting to modified environments. *Haemagogus janthinomys/capricornii* usually habitually stay in the canopy of trees and bite around noon, while *Hg. leucocelaenus* usually circulates on the forest floor and has a predominant afternoon biting activity^{14–16}.

The population at risk of contracting the disease and becoming ill includes those who are not vaccinated and are subject to bites from infected vector mosquitos in forest areas within the endemic area of YFV¹⁷. Previously, the YF vaccine was offered only to some regions of the country with disease cases. With the expansion of the virus and an increase in the number of areas reporting cases, the Ministry of Health has been gradually expanding the recommended vaccination areas. Although the YF vaccine has been expanded to all states in the Northeast, vaccination is now recommended throughout the country¹⁸.

From November 2016 to 2018, Brazil experienced a significant YF outbreak, considered one of the largest the country had, with 2,058 confirmed cases and 689 human deaths. This outbreak was concentrated mainly in rural areas, particularly in Brazil's southeast and southern regions, where the virus had not been previously detected¹⁶. YFV expansion started in the Amazon region, spreading from the Central-West region, home to a savanna-like biome, to Atlantic Forest fragments of Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), and São Paulo (SP) states¹⁷. Cases have also been reported in urban areas, including on the outskirts of major cities like São Paulo and Rio de Janeiro^{16,19}.

The dispersion of arboviruses over time and space is primarily influenced by their vectors' behavior. *Haemagogus janthinomys/capricornii* and *Hg. leucocelaenus* are considered primary YFV vectors due to their wide distribution, high abundance, and natural infection rates²⁰. Another element influencing the spread of diseases carried by vectors is the climate. A change in climatic factors can directly impact the geographical distribution and incidence of vector-borne diseases^{21–24}. Hence, the current study aims to characterize the prevalence and biodiversity of *Haemagogus* spp., focusing on *Hg. leucocelaenus*.

Results

Seasonal abundance of Culicidae eggs. During the collection period from March 2020 to October 2022, the number of eggs showed significant peaks in December 2020 ($n = 252$), November 2021 ($n = 188$), and January 2022 ($n = 252$)—all comprising summer months of the rainy season. December 2020 had the highest average temperature for the year (22.4°C) as well as a high level of rainfall (4.3 mm) compared to the other months of 2020. January 2022 was also marked by the highest average temperature for the year (22.8°C) (INPE 2023). The lowest abundances were observed in May and August 2021, with the number of eggs equal to zero—the autumn and winter months of the dry season—and these months had low average temperatures and rainfall equal to zero (Fig. 1).

There was a significant difference ($p \leq 0.01$) between the total number of eggs collected in the dry and rainy seasons ($p = 0.0026$), with more eggs collected in the rainy season (87%). The dry period showed the greatest difference between the number of hatched and unhatched eggs (52%), when compared to the rainy season (33%).

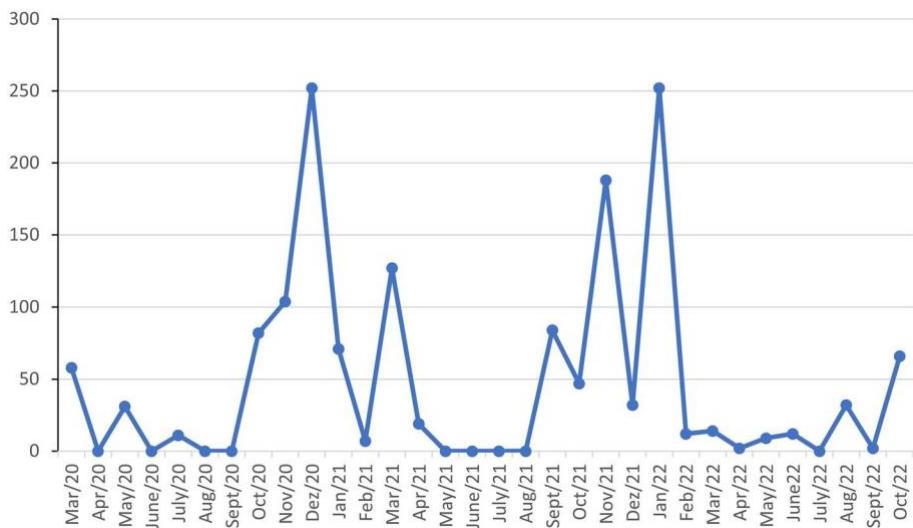


Figure 1. Fluctuation in the number of mosquito eggs collected per month, from March 2020 to October 2022, at Fazenda Três Irmãos, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brazil.

In both seasons the number of unhatched eggs was higher. More hatched eggs were found in the rainy season. Of the total eggs collected, the percentage of hatched eggs in the rainy season was 29%, while in the dry season, it was only 3%. In this case, seasonality seems to have influenced egg hatching. Rainfall likely stimulated the hatching of a larger number of eggs in a shorter time (Fig. 2).

There was a positive and significant correlation ($r = 0.607$) between the number of Culicidae eggs and temperature and a positive but weak correlation between the number of eggs and rainfall ($r = 0.222$) (Fig. 3). There was a positive correlation between *Hg. leucocelaenus* and the environmental variables temperature ($r = 0.303$) and humidity ($r = 0.48$).

Influence of multiple immersions. The highest percentage of *Hg. leucocelaenus* eggs hatched was observed in the 1st immersion (49%), and the second-highest was in the 3rd immersion (17%). Egg hatching of this species was observed until the 15th immersion. Eggs from females hatched until the 13th immersion, while males hatched until the 15th; therefore, the last eggs hatched were from males. In the initial immersions, more males than females were hatched, as follows: 1st immersion ($M = 50\%$; $F = 48\%$), 2nd immersion ($M = 63\%$; $F = 62\%$), 3rd immersion ($M = 82\%$; $F = 78\%$). This probably happened because males need more time after immersion to complete their development since, on the first day after emergence, they undergo a 180-degree rotation of the entire abdominal extremity from segment VIII, including the genitalia^{25,26}.

With regard to *Hg. leucocelaenus*, the species with the highest abundance, the number of females and males was very similar, with 157 females (56%) and 125 males (44%), resulting in a difference of 11% more females. The months with the highest number of females were March, November and December 2020, and March and

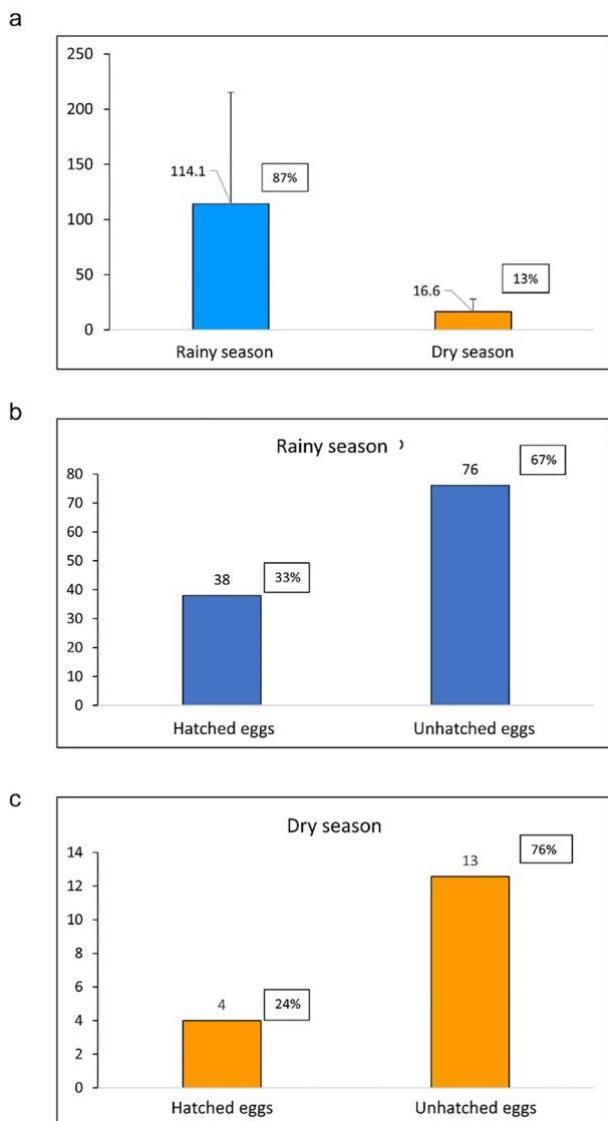


Figure 2. Number of mosquito eggs collected in the dry and rainy seasons (A). Number of hatched and unhatched eggs in the rainy (B) and dry season (C).

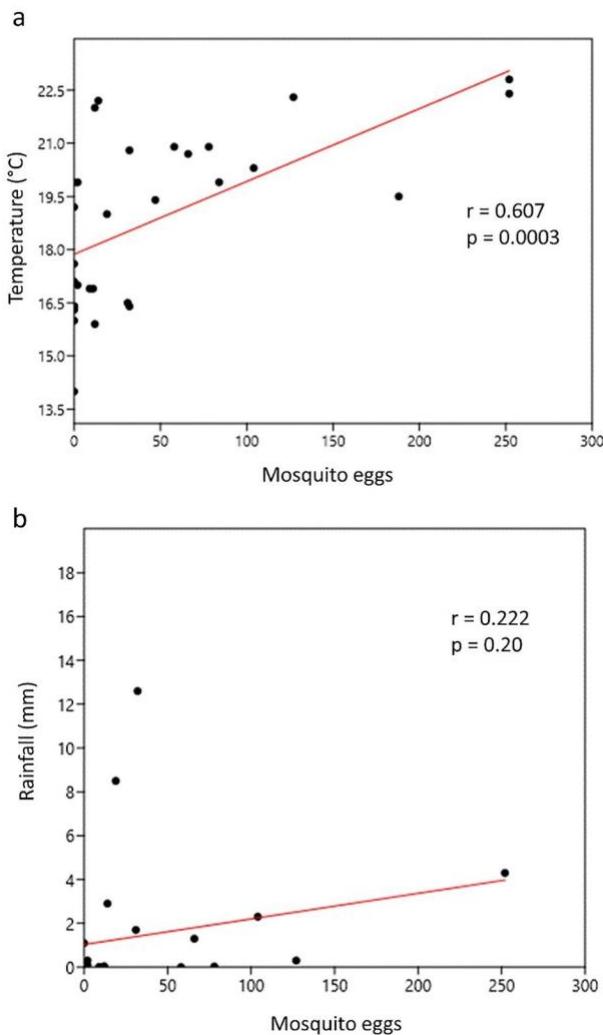


Figure 3. Linear regression between the number of eggs collected and the environmental variables temperature (A) and rainfall (B).

September 2021. The only month with a higher number of males was August 2022. May and October 2020 had an equal number of males and females.

Species that performed oviposition in the same ovitrap. Eggs from *Hg. leucocelaenus* and *Hg. jan-thinomys/capricornii* were found together in three of the 10 ovitraps (5, 6, and 8) in Fazenda Três Irmãos. Most eggs belonged to *Hg. leucocelaenus*, except for trap number 5, which had more *Hg. janthinomys/capricornii* eggs. Eggs of the species *Hg. leucocelaenus* and *Ae. terrens* were also observed in the same ovitrap (3).

Discussion

According to a study that combined vector suitability, the presence of NHP host reservoirs, and population density, Rio de Janeiro is considered one of the risk areas for mapping YFV transmission and spillover in the Southeastern Atlantic Forest Biome²⁷. The presence of wild mosquito vectors in forest areas of Rio de Janeiro was previously observed in other studies^{12,28}. In the present study, the vector with the highest abundance was *Hg. leucocelaenus*. However, *Hg. janthinomys/capricornii* and *Ae. terrens* Walker, 1956, were also present. The occurrence of these species raises concern because *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys/capricornii* have been reported as positive for YFV in Rio de Janeiro^{19,29}.

The rainy season had the highest densities of vector populations, mainly in December 2020, November 2021, and January 2022; these results corroborate those of other studies, which reported high peaks during the rainy season^{28,30}. A positive and significant correlation between the number of Culicidae eggs and temperature was also observed in Casimiro de Abreu, a city located 36.8 km from our study area¹². Similarly, there was a positive correlation between the vector species *Hg. leucocelaenus* and *Ae. terrens* with the environmental variables of temperature and humidity. The species *Haemagogus janthinomys/capricornii* had a positive and statistically significant correlation with rainfall. The dynamics of arbovirus transmission appear to be significantly influenced by environmental conditions. High temperatures have been observed to boost mosquito population sizes, and mosquito density has been strongly linked to the spread of the diseases they carry, such as YF. Climate factors like rainfall appear to precede zika and Chikungunya epidemics^{31,32}.

The different survival mechanisms mosquitoes have developed throughout their life histories account for their evolutionary success in tropical and temperate climates³³. Some species exhibit the strategy of egg dormancy (either diapause or quiescence) as a reproductive tactic, which enables them to endure long periods in environments unsuitable for hatching³⁴. *Haemagogus leucocelaenus* hatched until the 15th immersion, and the need for multiple immersions for egg hatching in this species was also observed by Silva *et al.* 2018, who showed that *Hg. leucocelaenus* demonstrated installment hatching up to the 37th immersion³⁵.

The selection of ovipositing sites by females is the primary factor responsible for the distribution of mosquitoes³⁶. Eggs from epidemiologically important species were found in the same breeding site (ovitrap); they belonged to *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys/capricornii* and *Ae. terrens*. The species that were observed sharing the same ovitrap most frequently were *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys/capricornii*, probably related to the fact that they are co-generic. *Haemagogus leucocelaenus* and *Ae. terrens* were also observed sharing the same breeding site; however, this scenario was less frequent. These observations corroborate Silva *et al.*¹², who observed that these species shared the same breeding site and showed a positive correlation. The co-occurrence of these

vector species may imply an overlapping of the etiological agent they transmit, such as YFV (*Hg. leucocelaenus*) and Chikungunya virus (*Ae. terrens*)^{37,38}.

Understanding the presence, seasonal abundance of sylvatic vectors, and possible contact with reservoirs and humans in fragments of the Atlantic Forest in Rio de Janeiro is of great interest to public health since it can help predict possible areas of YF spillover. Knowledge regarding mosquito vector populations plays a critical role in providing a framework to protect wild primates and humans' health along with the preservation of the ecosystems we share.

Conclusions

Monitoring arbovirus activity in mosquitoes and primates is essential for detecting and responding to potential outbreaks. Therefore, it is also important to consider the broader ecological context of disease transmission, including the role of wildlife and human activities in shaping the risk of disease emergence. Deforestation and changes in land use can increase the frequency of contact between wildlife, mosquitoes, and humans, increasing the risk of disease transmission. Understanding the ecobiology of *Hg. leucocelaenus* and its role as an arbovirus vector in the GLT translocation area is essential for effective conservation and disease management efforts. Implementing mosquito monitoring for arbovirus activity can help protect both the GLT and human populations from the threat of arbovirus transmission.

Materials and methods

Ethics statement. The study was carried out in accordance with scientific license number 44333 provided by the Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICM-Bio), Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO) in Atlantic Forest areas of Rio de Janeiro with the agreement of the properties or the state government where the mosquitoes were captured. All members of the collection team were vaccinated against YFV and aware of the potential risks in the study areas, no animals or humans were used in the development of this study.

Study area. The study was conducted in Fazenda Três Irmãos (22°30'46.9" S; 42°20'13.0" W), Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brazil (Fig. 4). Rio de Janeiro is located in the middle of the Atlantic Forest Biome, representing one of the areas with the greatest diversity of this biome in the country, with unique mountain ranges and coastal plains³⁹. The geomorphological units that make up this state provide a diversity of vegetational landscapes and, consequently, an expressive variety of habitats and species richness, including several endemic ones.

Collection and raising of immature Culicidae. The collection period was between March 2020 and October 2022. One trap was placed at each collection site, and a total of 10 ovitraps were distributed. Each trap had three wooden oviposition paddles that measured 2.5 cm by 14 cm and had textured surfaces to help with oviposition. The paddles were clipped vertically into the traps. In an effort to mimic the microecosystem seen at natural breeding locations, traps were loaded

with 300 ml of fresh water from nearby bodies of water and about 100 g of leaf litter. The ovitraps were affixed to the trees at a height of 2.5 m using nylon ropes and wire. Every 20 days, the traps were checked, and after each inspection, the wooden paddles carrying the eggs were removed and brought to the lab for quantification before being replaced with fresh paddles for subsequent collections. Paddles were collected from the field ovitraps and brought to the Oswaldo Cruz Institute's Diptera Laboratory, where they underwent egg counting and were submerged in transparent trays filled with dechlorinated water. The trays with viable eggs were placed in a controlled experimental environment in a laboratory greenhouse with a thermoperiod controlled at a temperature of $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, relative air humidity of 75–90%, and a 12-h day/12-h night cycle. After three days, the paddles were taken out of the water and allowed to air dry for an additional three days to count the newly hatched larvae. The larvae were given TetraMint fish food (Tetra, Blacksburg, VA) and monitored daily. These conditions allowed us to keep the specimens alive until adulthood for species determination, according to the methodology described by Alencar *et al.*⁴⁰.

Adult mosquitoes from the eggs collected in the field were identified at the species level through direct observation of their morphological characters using a stereo microscope (Zeiss) and dichotomous keys elaborated by Arnell (1973) and Forattini (2002)^{11,41}. After the specific determination, all specimens were incorporated into the Entomological Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz.

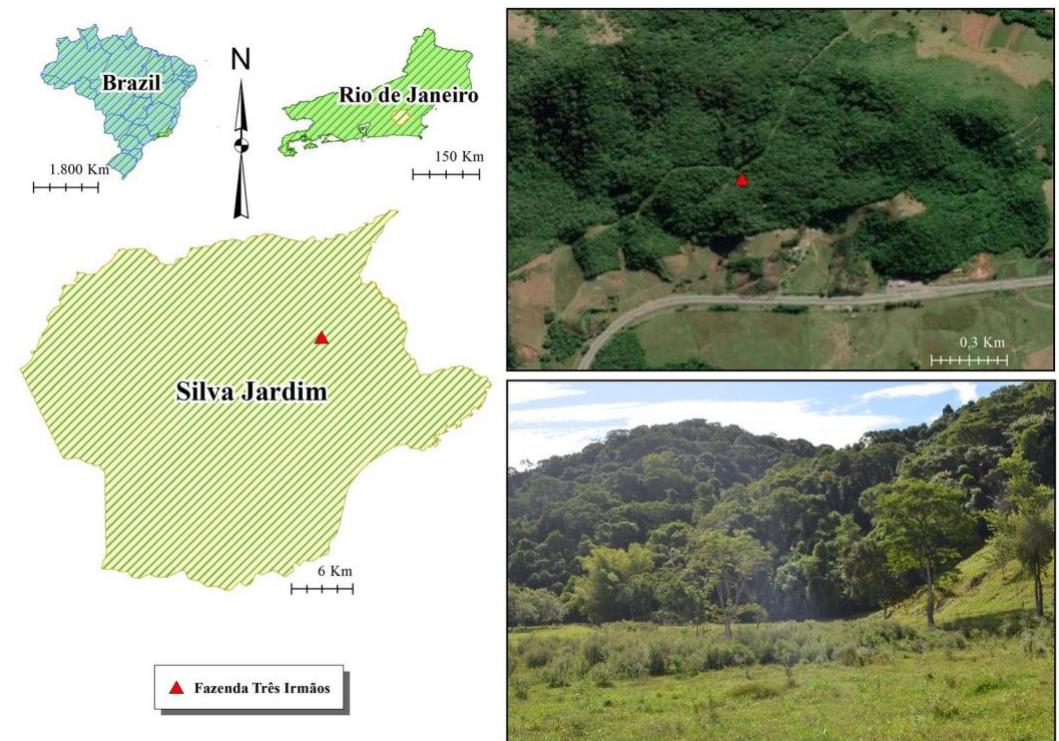


Figure 4. Map of the study site, municipality of Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brazil.

Statistical analysis. The data were tested for normality, and the t-test was used to compare the number of Culicidae eggs collected in the rainy and dry seasons. Correlations between the number of eggs and vector species with climatic and environmental variables were assessed from 2020 to 2022. The meteorological data, including average maximum, minimum, and annual temperatures ($^{\circ}\text{C}$), average relative humidity (%), and precipitation (mm), were retrieved from the Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos [Center for Weather Forecasting and Climate Studies]—CPTEC/INPE (INPE 2023).

Data availability

The data for this study is stored at Fundação Oswaldo Cruz and can be made available by the corresponding author (JA) upon request.

Received: 27 April 2023; Accepted: 27 July 2023

Published online: 12 August 2023

References

1. Woolhouse, M. E. J., Haydon, D. T. & Antia, R. Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 238–244 (2005).
2. Jones, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990–993 (2008).
3. da Costa Vasconcelos, P. F. Febre amarela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**, 275–293 (2003).
4. Silva, N. I. O. *et al.* Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virol. J.* **17**, 1–12 (2020).
5. Hudson, N. P. & Philip, C. B. Infectivity of blood during the course of experimental yellow fever. *J. Exp. Med.* **50**, 583–599

- (1929).
6. Russo, G. Biodiversity: Biodiversity's bright spot. *Nature* **462**, 266–269 (2009).
 7. Duchiade, A. Brazilian Forests Fall Silent as Yellow Fever Decimates Threatened Monkeys. <https://www.scientificamerican.com/article/brazilian-forests-fall-silent-as-yellow-fever-decimates-threatened-monkeys/> (2018).
 8. Estrada, A. *et al.* Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Sci. Adv.* <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600946> (2017).
 9. Ruiz-Miranda, C. R. *et al.* Estimating population sizes to evaluate progress in conservation of endangered golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *PLoS ONE* **14**, e0216664 (2019).
 10. Dietz, J. M. *et al.* Yellow fever in Brazil threatens successful recovery of endangered golden lion tamarins. *Sci. Rep.* **9**, 12926 (2019).
 11. Arnett, J. H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **10**, 1–174 (1973).
 12. Silva, S. O. F., de Mello, C. F., Érico Guimarães, A., José Leite, P. & Alencar, J. Occurrence of the sylvatic yellow fever vector mosquito *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment of the touristic State of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Entomol.* **59**, 1891–1897 (2022).
 13. Tátila-Ferreira, A., Maia, D. de A., Abreu, F. V. S. de, Rodrigues, W. C. & Alencar, J. Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), a vector of wild yellow fever in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **59**, (2017).
 14. Couto-Lima, D. *et al.* Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & shan- non) (Diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the atlantic forest, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **115**, 1–13 (2020).
 15. Alencar, J. *et al.* Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Entomol.* **52**, 783–788 (2015).
 16. Possas, C. *et al.* Yellow fever outbreak in Brazil: The puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, 1–12 (2018).
 17. da Costa Vasconcelos, P. F. Febre amarela no Brasil: Reflexões e hipóteses sobre a emergência em áreas previamente livres. *Rev. Saude Pública* **44**, 1144–1149 (2010).
 18. MS. Ministério da Saúde alerta para a necessidade de ampliar a cobertura vacinal. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/apresentacoes/2018/febre-amarela-pdf> (2018).
 19. de Abreu, F. V. S. *et al.* *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes Infect.* **8**, 218–231 (2019).
 20. de Abreu, F. V. S. *et al.* Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076> (2019).
 21. CDC. Diseases Carried by Vectors. (2020) <https://www.cdc.gov/climateandhealth/effects/vectors.htm>.
 22. Alencar, J., de Mello, C. F., Silva, S. O. F., Guimarães, A. E. & Müller, G. A. Effects of seasonality on the oviposition activity of potential vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the São João River Basin environmental protection area of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Eur. Zool. J.* **89**, 1018–1025 (2022).
 23. Alencar, J. *et al.* Distribution of *Haemagogus* and *Sabettus* species in relation to forest cover and climatic factors in the Chapada Dos Guimarães National Park, State of Mato Grosso, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **34**, 85–92 (2018).
 24. Alencar, J. *et al.* Circadian and seasonal preferences for hematophagy among *Haemagogus capricornii*, *Hg. janthinomys*, and *Hg. leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *J. Vector Ecol.* **33**, 389–392 (2008).
 25. Christophers, S. R. *Aedes aegypti* (L.). *The Yellow Fever Mosquito—Its Life History, Bionomics and Structure* (Cambridge University Press, 1960).
 26. Forattini, O. P. *Entomologia médica. Culicinae: Culex, Aedes e Psorophora / Mosquito Taxonomic Inventory*. (1965).
 27. Li, S. L. *et al.* Mapping environmental suitability of *Haemagogus* and *Sabettus* spp. mosquitoes to understand sylvatic transmission risk of yellow fever virus in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **16**, e0010019 (2022).
 28. Alencar, J. *et al.* Oviposition activity of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) during the rainy and dry seasons, in areas with yellow fever virus circulation in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* **16**, e0261283 (2021).
 29. Alencar, J. *et al.* Natural infection and vertical transmission of zika virus in sylvatic mosquitoes *aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* from Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Med. Infect. Dis.* **6**, 99 (2021).
 30. Freitas-Silva, S., de Mello, C., Machado, S., Leite, P. & Alencar, J. Interaction of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) and other mosquito vectors in a forested area, Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Med. Infect. Dis.* **7**, 94 (2022).
 31. Fuller, T. L. *et al.* Behavioral, climatic, and environmental risk factors for Zika and Chikungunya virus infections in Rio de Janeiro, Brazil, 2015–16. *PLoS ONE* **12**, e0188002 (2017).
 32. Bellone, R. & Failloux, A.-B. The role of temperature in shaping mosquito-borne viruses transmission. *Front. Microbiol.* **11**, 1–15 (2020).
 33. Diniz, D. F. A., de Albuquerque, C. M. R., Oliva, L. O., de Melo-Santos, M. A. V. & Ayres, C. F. J. Diapause and quiescence: Dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasit. Vectors* **10**, 310 (2017).
 34. Vinogradova, E. B. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. In *Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use* (eds Alekseev, V. R. *et al.*) 83–113 (Springer Netherlands, 2007). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5680-2_5.
 35. Silva, S. O. F. *et al.* Evaluation of multiple immersion effects on eggs from *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) under experimental conditions. *J. Med. Entomol.* **55**, 1093–1097 (2018).
 36. Consoli, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Febre amarela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2**, 275–293 (2003).
 37. Giovanetti, M. *et al.* Yellow fever virus reemergence and spread in southeast Brazil, 2016–2019. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.02008-19> (2019).
 38. Lourenço-de-Oliveira, R. & Failloux, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–11 (2017).
 39. Coelho, M. A. N. *et al.* Flora do estado do Rio de Janeiro: Avanços no conhecimento da diversidade. *Rodriguésia* **68**, 1–11 (2017).
 40. Alencar, J. *et al.* Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* **41**, 18–26 (2016).
 41. Forattini, O. P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia* (Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2002).

Acknowledgements

We thank the Associação Mico-Leão Dourado for the support in field logistics.

Author contributions

S.L.M., C.F.M., S.O.F.S. and J.A.; wrote the main manuscript text and S.O.F.S., formal analysis., C.F.M., J.A. performed experiments. All authors reviewed the manuscript.

Funding

This work was carried out with the support of CNPq and FAPERJ. (JA—Jeronimo Alencar) was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ; grant number E-26/200.956/2002/2022), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant number 303286/2021-0 and 150966/2023-7).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39629-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or

format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

ANEXO 2



**Tropical Medicine and
Infectious Disease**



Article

Natural Infection and Vertical Transmission of Zika Virus in Sylvatic Mosquitoes *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* from Rio de Janeiro, Brazil

Jeronimo Alencar ^{1,*}, Cecilia Ferreira de Mello ^{1,2}, Carlos Brisola Marcondes ³, Anthony Érico Guimarães ¹, Helena Keiko Toma ⁴, Amanda Queiroz Bastos ^{1,2}, Shayenne Olsson Freitas Silva ^{1,5} and Sergio Lisboa Machado ^{4,*}



Abstract: Zika virus (ZIKV) was recently introduced into the Western Hemisphere, where it is suspected to be transmitted mainly by *Aedes aegypti* in urban environments. ZIKV represents a public health problem as it has been implicated in congenital microcephaly in South America since 2015. Reports of ZIKV transmission in forested areas of Africa raises the possibility of its dispersal to non-human-modified environments in South America, where it is now endemic. The current study aimed to detect arboviruses in mosquitoes collected from areas with low human interference in Rio de Janeiro, Brazil. Using a sensitive pan-flavivirus RT-PCR, designed to detect the NS5 region, pools of *Ae. albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus*, were positive for both ZIKV and yellow fever(YFV). Virus RNA was detected in pools of adult males and females reared from field-collected eggs. Findings presented here suggest natural vertical transmission and infection of ZIKV in *Hg. leucocelaenus* and *Ae. albopictus* in Brazil.

Keywords: Rio de Janeiro; *Haemagogus leucocelaenus*; *Aedes albopictus*; Zika virus; yellow fever virus

¹ Laboratório Diptera, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos 21040-360, Brazil; cecilia.mello@ioc.fiocruz.br (C.F.d.M.); anthony@ioc.fiocruz.br (A.É.G.); amanike2@hotmail.com (A.Q.B.); shayenneolsson@gmail.com (S.O.F.S.)

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil

³ Departamento de Imunologia e Parasitologia de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil; cbrisolamarcondes@gmail.com

⁴ Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil; hktoma@globo.com

⁵ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos 21040-360, Brazil

* Correspondence: jalencar@ioc.fiocruz.br (J.A.); machadosl@globo.com (S.L.M.)



Citation: Alencar, J.; Ferreira de Mello, C.; Brisola Marcondes, C.; Érico Guimarães, A.; Toma, H.K.; Queiroz Bastos, A.; Olsson Freitas Silva, S.; Lisboa Machado, S. Natural Infection and Vertical Transmission of Zika Virus in Sylvatic Mosquitoes *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* from Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2021**, *6*, 99. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020099>

Academic Editor: Rosa GálvezReceived: 24 February 2021

Accepted: 24 March 2021

Published: 11 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The family *Flaviviridae* contains four genera, including *Flavivirus*, a genus that contains over 50 viruses, with 13 being already reported in Brazil. Among the most important flaviviruses circulating in Brazil are yellow fever (YF), dengue (DENV), Zika (ZIKV) and West Nile viruses.

Yellow fever has been a major health problem since the first epidemic occurred in Recife in 1685 [1]. This disease was essentially eliminated from urban areas by the early 20th century; however, in the 1920s, sylvatic transmission was detected in Colombian forest areas. Sylvatic transmission among non-human primates by forest mosquitoes was first identified and verified in Brazil in the Chanaan Valley, located in the state of Espírito Santo, southeast Brazil [2].

ZIKV, first identified in a forest in Uganda, has recently spread to Asia and the Pacific islands, and later to the Americas, where it caused explosive outbreaks in Brazil. ZIKV detection in the Western Hemisphere has caused serious concern owing to its association with fetal microcephaly [3–5]. Although mostly transmitted in urban environments by *Aedes aegypti* and possibly *Aedes albopictus*, it has been detected in many other species of mosquito [6]. The first autochthonous case of ZIKV infection in Brazil was diagnosed in May 2015 [7]. Its circulation has since been confirmed in all 26 states and federal districts of the country [8]. The importance of non-human primates for the maintenance of ZIKV in South America remains unknown. However, a few reports in Brazil suggest that non-human primates have been exposed to ZIKV [9–12].

There is a current outbreak of sylvatic yellow fever in Brazil that probably started at the end of 2016. The first cases were reported in the state of Minas Gerais, but YFV has since spread to the states of Espírito Santo, São Paulo and Rio de Janeiro, with recent cases appearing in the southern states of Paraná and Santa Catarina. According to a WHO report, as of April 2017, YFV (observed as either epizootic or human cases of yellow fever) continues to expand its distribution toward the Atlantic coast of Brazil to areas not previously considered to be at risk of transmission [13].

The main genera of mosquitoes transmitting sylvatic YFV are *Haemagogus* and *Sabathes*. In southeast Brazil during the present epidemic, *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* have been implicated as the important vectors [14]. *Haemagogus* are sylvatic mosquitoes with diurnal activity; they are mostly acrodendrophilic and mainly found in densely

forested areas [15]. *Haemagogus leucocelaenus* is the species most frequently found in Brazil, and it is considered a primary vector for sylvatic YFV in southeastern Brazil. A study conducted in the northeast region of Brazil detected DENV-1 by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in *Hg. leucocelaenus* from Coribe, state of Bahia, suggesting the exposure of a sylvatic mosquito species to an arbovirus maintained in endemic urban transmission cycles in Brazil. These findings highlight the importance of arbovirus surveillance at the human–animal interface in Brazil [16,17].

In Africa, some studies have shown evidence of ZIKV exposure different orders of mammals, including non-human primates, birds and reptiles [18,19]. In Brazil, exposure of non-human vertebrates to ZIKV has been reported in different regions of the country. Capuchin monkeys and marmosets captured between June 2015 and February 2016, tested positive by real-time RT-PCR in the northeast region of the country [12]. More recently, neutralizing antibodies for ZIKV were detected in various domestic species, including goose, cattle, chicken, horse, dog and sheep, and also in a captive white-cheeked spider monkey from Mato Grosso and Mato Grosso do Sul states, Central-West Region, Brazil [9]. ZIKV RNA was also detected in carcasses of non-human primates during an epizootic outbreak of yellow fever in the southeast region. Positive animals were from the states of São Paulo and Minas Gerais [20].

Despite some evidence of exposure of non-human vertebrates to ZIKV in Brazil, evidence of ZIKV in sylvatic vector populations is scarce. Recently, an investigation into ZIKV in roughly 23,000 mosquitoes of 62 species from Central-West Region of Brazil found no positive results [9].

Ovitraps are important tools that make it possible to determine the presence of species of mosquito vectors of etiological agents through the eggs deposited in it [21,22].

Thus, the main objective of the present study was to detect ZIKV in vector populations in preserved forested areas located near active human transmission areas of the state of Rio de Janeiro.

2. Results

A total of 8086 mosquito eggs were obtained between September 2018 and March 2019. Of these, 3662 (55.1%) adults emerged, and 924 distributed in 70 pools were tested for flaviviruses.

Pools were separated by species, sex and ovitrap. Each pool had three to 33 mosquitoes. Six pools from two species were positive for flavivirus by RT-PCR and submitted to nucleotide sequencing. The minimum infection rate was not established due to the number of insects collected being lower than 1000.

When compared to known sequences in NCBI Blast, three pools were identified as YFV and three as ZIKV. When comparing the obtained sequences with those deposited in GenBank, they exhibited 94–98% similarity to ZIKV and YFV (Table 1). Nucleotide sequences from the NS5 segment of flaviviruses obtained in the present study were deposited in

GenBank with the accession numbers MK972825, MK972826, MK972827, MK972828 and MK972829. We also sequenced our positive controls before sequencing our samples (data not shown). The sequences of the positive controls and positive samples were aligned using Geneious V10.2.4 software, resulting in the mean of 23.6% of identical sites and 82.3% of pairwise homology.

Table 1. Detection of yellow fever virus and Zika virus in *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* in primary forests in the Brazilian state of Rio de Janeiro, Brazil.

Po ol ID *	Mosquito Species	S ex	Total Mosquitos	Month/Y ear Collected	Geographic Coordinate s	Trap Identificat ion	Pan- Flavivi rus PCR Result	Seque nce Match
43	<i>Ae. albopictus</i>	♀	32	Jan/19	22°33'01.3" S 42°00'52.7" W	TMPRNH -32 *	Positive	Zika virus
45	<i>Ae. albopictus</i>	♂	6	Jan/19	22°31'40.1" S 42°02'58.6" W	Tinguá	Positive	Zika virus
54	<i>Hg. leucocelae nus</i>	♀	9	Oct/2018	22°35'11.98 "S 43°24'34.12 "W	TMF-3	Positive	Zika virus
62	<i>Ae. albopictus</i>	♀	2	Oct/2018	22°31'44.9" S 42°02'56.8" W	TMF-2	Positive	Yellow Fever Virus
64	<i>Hg. leucocelae nus</i>	♂	3	Sep/2018	22°31'49.5" S 42°02'56.3" W	TMF-7	Positive	Yellow Fever Virus
65	<i>Hg. leucocelae nus</i>	♂	5	Oct/2018	22°31'49.5" S 42°02'56.3" W	TMF-7	Positive	Yellow Fever Virus

* Pool ID, identification number for the processed mosquito pool. TMF, Três Montes Farm, sites 2, 3 and 7; TMPRNH, Três Morros Private Reserve of Natural Heritage, site 32; and Tinguá, Sítio Boa Esperança, Nova Iguaçu.

3. Discussion

The NS5 region of flaviviruses belongs to the last part of the open reading frame (ORF), encoding the largest and highly conserved protein. NS5 region was targeted in this study because it is a conserved region that has been used previously for flavivirus detection [7,23–26]. Through sequencing, we identified ZIKV and YFV RNA in two sylvatic mosquito species (Table 1). Sylvatic YFV is usually found in *Ae. albopictus*, *Haemagogus leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* [27–32] and circulates in forests within non-human primates as amplifying hosts. This is one of the first detections of ZIKV RNA in wild mosquitoes present in forest environments of the Americas. *Haemagogus leucocelaenus* and *Ae. albopictus* are adapted to both sylvatic and urban environments and are considered epidemiologically important mosquitoes involved in the arbovirus transmission cycle. *Aedes albopictus* has already been reported as a natural ZIKV vector in several countries [26,33–35]. The presence of ZIKV RNA in *Hg. leucocelaenus*, an

acrodendrofilic species, suggests a sylvatic maintenance cycle of ZIKV in Brazil. Laboratory studies have demonstrated the ability of *Ae. albopictus* to transmit ZIKV. Furthermore, the finding of YFV RNA in *Ae. albopic-tus* mosquitoes in this area suggests the risk of spillover from forest to human-modified environments [36,37].

Haemagogus leucocelaenus can feed on a wide range of vertebrates. Birds can be a common blood source for this species. However, these mosquitoes can also feed on several mammalian species present in forest environments, as shown in studies conducted in the Rio de Janeiro and Goiás states, Brazil [38]. *Aedes albopictus* feeds mostly on mammals, and, although it prefers human blood, it is widely distributed in the absence of humans [39,40]. *Aedes albopictus* was also found to be a vector for two other arboviruses, CHIKV and DENV, elsewhere [41]. In addition, through laboratory tests of co-infection and super-infection, the possibility of simultaneous transmission of these two viruses to humans has been demonstrated [42]. Our results indicated a possible sylvatic cycle for ZIKV in South America. *Aedes albopictus* inhabits both forested and peridomestic environments in Rio de Janeiro [43]; therefore, there is a high likelihood of viral transport between these habitats. Mosquitoes in the states of Ceará and Bahia, where ZIKV has been found in mammals, should also be studied [12,44]. Although a small number of mosquitoes tested negative in the current study, *Hg. janthinomysis* is an important YFV vector in the canopy and could possibly transmit ZIKV [45]. This species was found in an urban forest (Parque Dois Irmãos) in Recife, Pernambuco, Brazil, a city highly endemic to ZIKV; for this reason, other arboviruses (DENV and CHIKV) should similarly be studied for natural infection [46].

The finding of ZIKV in mosquitoes reared from eggs obtained under natural conditions indicates vertical transmission of this virus. The role of vertical transmission in the maintenance of both YFV and ZIKV remains unclear, but suggests enzootic maintenance of these viruses in sylvatic cycles. Vertical transmission in vector mosquitoes has already been reported both naturally and experimentally. In 2016, the vertical transmission of the Zika virus in *Ae. aegypti* larvae was detected for the first time, found in the field under natural conditions [47]. In general, YFV enzootic transmission occurs mainly in forests, infecting humans entering the forest for activities such as logging, fishing and hunting. In the case of *Hg. leucocelaenus*, which can range beyond forest environments, humans of both sexes and various ages living near forests have been infected; thus, transmission does not appear to be limited to people engaged in forest-associated work [44].

YFV-infected *Hg. leucocelaenus* were found at ground level during an outbreak in Rio Grande do Sul state (Brazil) between 2008 and 2009 [48]. This supports our view that these mosquitoes can be a risk for the transmission of an arbovirus to human beings. An evaluation of the vector competence of *Hg. leucoceleanus* challenged orally and inoculated intrathoracically with ZIKV allowed the detection of the spread of this arbovirus in *Hg. leucocelaenus*. However, this detection was observed at very low rates [45].

The occurrence of YFV in natural conditions demonstrates its possibly circulating in Atlantic forest areas of the municipality of Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state.

Evidence of active sylvatic YFV transmission in the nature reserves studied here and the abundance of the main mosquito vector for this virus in Brazil indicates the need for active YFV surveillance in communities adjacent to forests. Forests near human-modified areas where arboviruses have been found, such as urban forests (e.g., Tijuca in Rio de Janeiro, Buraquinho in João Pessoa and Dois Irmãos in Recife) should be prioritized.

Mosquitoes adapted to urban environments, most commonly *Ae. aegypti*, transmit YFV

and ZIKV between humans. Because both viruses can be transmitted by several mosquito species, spillback to preserved forests with wild amplifying vertebrates and mosquitoes should be considered. However, if not studied, such sylvatic cycles will remain hidden, and low levels of ZIKV or YFV antibody reactivity of primates near urban areas [9,11] should not discourage additional studies in such areas.

4. Materials and Methods

4.1. Ethics Statement

All research was performed in accordance with scientific license number 44333 provided by the Ministry of Environment (MMA), Chico Mendes Institute of Biodiversity Conservation (ICMBio), Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO). Mosquitoes were collected with the consent and cooperation of property owners, householders, and local authorities. All members of the collection team were vaccinated against YFV and aware of the potential risks in the areas under study.

4.2. Study Areas

Sampling sites were selected from forested areas near human transmission regions in the state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. Atlantic Forest fragments in the municipalities of Casimiro de Abreu and Nova Iguaçu were selected for their susceptibility to arbovirus transmission (Figure 1). The region was affected by a recent severe yellow fever outbreak in 2016–2018 [17].

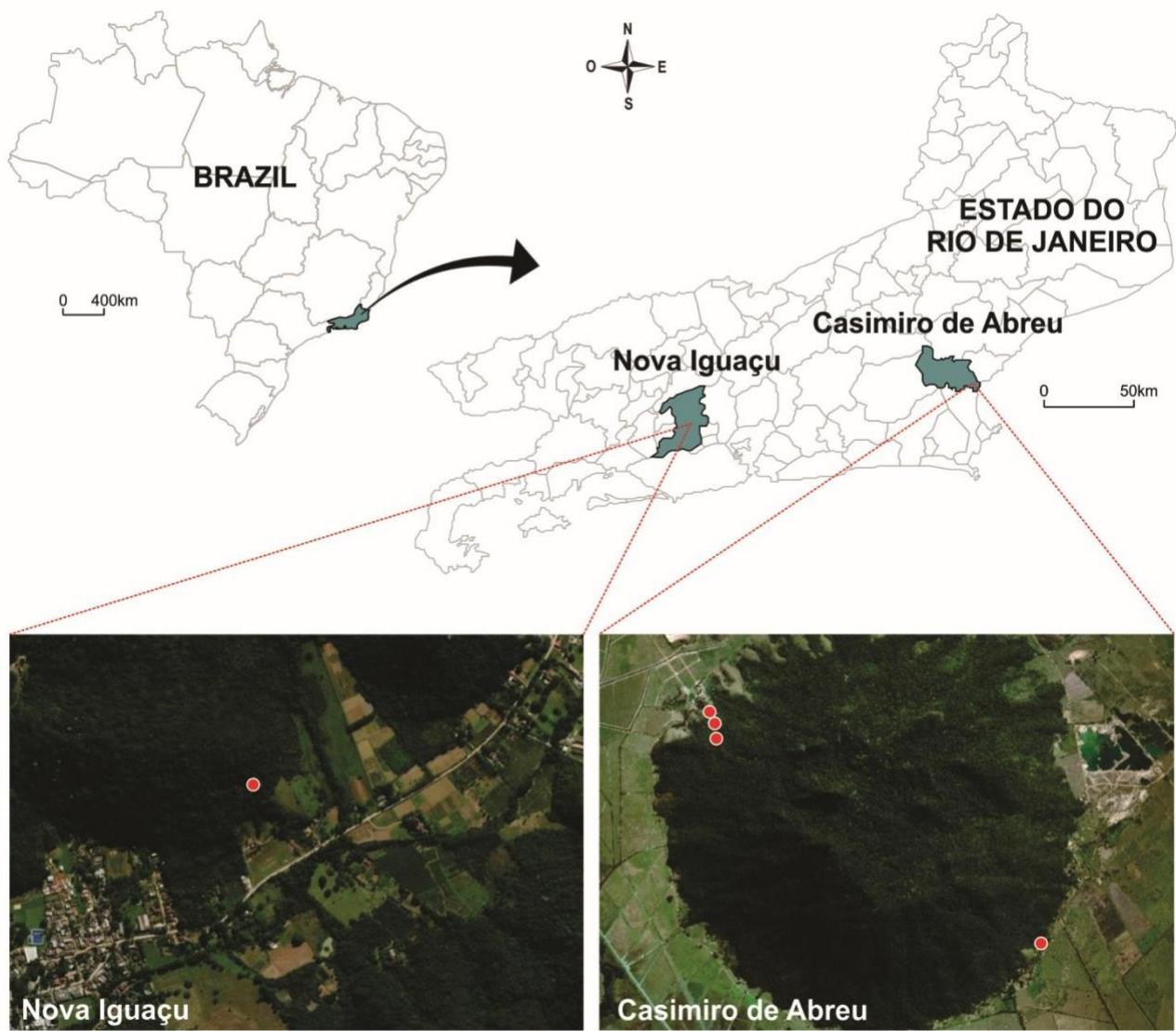


Figure 1. Map of the mosquito collection sites for this study. Red: Sampling sites where yellow fever (YFV) and Zika virus (ZIKV) positive mosquitoes were collected in primary forests in the Brazilian, municipalities of Nova Iguaçu and Casimiro de Abreu, state of Rio de Janeiro, Brazil. Maps were prepared in ArcGIS PRO (URL: <https://pro.arcgis.com/en/pro-app/>). Accessed: 6 May 2019) and edited in CorelDRAW Graphics Suite X7.

The municipalities of Casimiro de Abreu and Nova Iguaçu are, respectively, 140 and 30 km distant from the city of Rio de Janeiro. The main land cover in the region is Atlantic forest vegetation, with dense ombrophilous sub-mountain forests in moderate and advanced stages of regeneration. The region, located in the hydrographic basin of São João River, is situated in the intertropical zone (at low latitudes) and its climate is predominantly humid tropical [49]. The region is highly influenced by the Atlantic Ocean, and presents an average temperature of 26.8 °C, relative humidity of 56% and 1200

mm of precipitation annually. The highest levels of rainfall occur from October to March.

4.3. Mosquito Sampling

Mosquito eggs were collected from ovitraps placed in three sampling sites from September 2018 to March 2019. The sites were located in the Três Montes Farm (A) and Três Morros Private Reserve of Natural Heritage (B), both in the Casimiro de Abreu, and Sítio Boa Esperança (C) in Nova Iguacu.

Fifteen ovitraps were set in each sampling site. In Casimiro de Abreu, the distance between traps was approximately 300 m, and that between traps in the Nova Iguacu was 1000 m. The distance between Nova Iguacu and Casimiro de Abreu was approximately 137 km.

Monitoring was performed using oviposition traps consisting of a 1L-capacity black container without a lid that resembled a plant vase, which contained four wooden oviposition paddles (Eucatex plates) measuring 2.5 cm × 14 cm, vertically held inside the trap by a clip. Natural water and remains of leaves and animals found on the forest soil were added into the trap to generate an ecosystem similar to the natural one [50–52].

The paddles in the traps were examined in the laboratory for eggs every two weeks for 14 weeks during the seven months of research. In the laboratory, egg-positive paddles were immersed in white trays filled with dechlorinated water at 29 °C to allow the eggs to hatch. After three days, the paddles were removed from the water, left to air dry for another three days, and the hatched larvae were enumerated and reared as previously

described [53]. Adults were identified to species level by morphological characters using dichotomous keys [15,54]. Specimens were grouped by species, trap and date of collection and stored at −80 °C prior to RNA extraction [55].

4.4. RNA Extraction

Males and females were separated and prepared in pools of 3–33 mosquitoes for maceration. Viral RNA was extracted from each pool under BSL2 laboratory conditions following the manufacturer's instructions, using an MN Nucleo Spin RNA kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, ref. 740955.250, Quezon City, Phillipines) and cDNA was immediately synthetized using a Hi-capacity RNA-to-DNA kit (Applied Biosystem, ref. 4388950, Foster city, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified using a

Denovix DS-11+b Quantifier (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) and maintained at –20 °C until it was tested for flaviviruses.

4.5. PCR for Flaviviruses

For flavivirus detection, a conventional RT-PCR protocol using primers designed to amplify a ~260 nucleotides sequence of NS5 region was used, as previously described [56]. To control our amplification, we prepared one tube for each positive and negative control. As positive controls, we used cDNA obtained from Yellow Fever 17D, Zika virus and West Nile virus RNA, and as negative controls, we used cDNA from the Chikungunya virus (CHKV), mosquitoes that were not infected with any arbovirus and water.

The reaction mixture comprised 1 PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol Pan-Flavi Forward primer (5'-TAC AAC ATG ATG GGG AAR AGA GAR AA-3'), 10 pmol Pan-Flavi Reverse primer (5'-GCW GAT GAC ACM GCN GGC TGG GAC AC-3'), 1.0 U of DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue, Waltham, MA 02451, USA),

1.5 mM MgCl₂, 1 Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 0.8%, Nonidet P40) and

0.2 mM dNTPs in a 25 µL reaction volume. The cycling conditions were 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and a final extension at 72 °C for 5 min.

PCR products were visualized after electrophoresis on 1.5% agarose gels in 1 TBE (Trizma, boric acid, EDTA) buffer under UV light (260 nm) after ethidium bromide staining. The expected amplified fragments ranged 200–300 bp in size and were purified using a Cellco PCR purification kit (Cellco Biotec do Brasil Ltda, cat. # DPK-106L, São Carlos, SP, Brazil).

4.6. Nucleotide Sequencing

Sequencing was performed by Fiocruz nucleotide sequencing center, using an ABI 3730DNA Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), as previously described [26]. Approximately 10–40 ng of purified PCR product was sequenced on an ABI 3730 DNA Sequencer following the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing protocol. The sequences were then analyzed using Geneious R10 (Biomatters, v.10.2.6), and resulting contigs were

compared with reference sequences using NCBI Blast (Basic Local Alignment Search Tool, at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> accessed on 27 August 2020)

5. Conclusions

Results presented here corroborate the warnings rearing the transmission of ZIKV from urban to forest environments [19], making eradication of the virus from the continent highly improbable and reinforcing the need for the control of urban mosquitoes and the development of an effective vaccine. Owing to the evidence regarding the possible natural infection and vertical transmission of YFV and ZIKV found in *Hg. leucocelaenus* and *Ae. albopictus* in forested areas at Casimiro de Abreu and in Nova Iguaçú, Rio de Janeiro state, Brazil, active and constant entomological surveillance in the region is recommended to prevent the spread of these viruses to other sylvatic or urban areas.

Author Contributions: J.A. produced the idea, contributed to the drafting, performed a critical review of the content and performed sample collections in the field. C.F.d.M., C.B.M. and A.É.G. reviewed the content and performed sample collections in the field. A.Q.B. performed sample collections in the field, S.O.F.S. assisted and participated in the extraction of RNA and RT-PCR in the laboratory and participated in the review of the manuscript, H.K.T. and S.L.M. conceived and designed the experiments and wrote and constructed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ; grant number E-26/202.658/2018; E-26/010.101076/2018), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; 301707/2017-0) and the Mico-Leão-Dourado Association.

Institutional Review Board Statement: All research was performed in accordance with scientific license number 44333 provided by Ministry of Environment of Brazil (MMA), Chico Mendes Institute of Biodiversity Conservation (ICMBio), Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Farms Reunidas Agropecuarias Três Montes and Farm Três Morros for their cooperativity and receptivity during the study period.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

YFV: yellow fever virus; DENV: dengue virus; ZIKV: zika virus; CHIKV: chikungunya virus; PCR: polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction; MMA: Ministry of the Environment; ICMBio: Chico

Mendes Institute of Biodiversity and Conservation; SISBIO: Biodiversity Information and Authorization System; cDNA: complementary DNA; TBE: trizma, boric acid; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; UV: ultraviolet.

References

1. Franco, O. História da Febre Amarela no Brasil. *Minist. Saúde Dep. Nac. Endem. Rurais.* **1969**, *1*, 1–8.
2. Soper, F.L.; Penna, H.; Cardoso, E.; Serafim, J., Jr.; Frobisher, M., Jr.; Pinheiro, J. Yellow fever without *Aedes aegypti*. Study of a rural epidemic in the Valle do Chanaan, Espírito Santo, Brazil, 1932. *Am. J. Epidemiol.* **1933**, *18*, 555–587. [[CrossRef](#)]
3. Schuler-Faccini, L.; Ribeiro, E.M.; Feitosa, I.M.L.; Horovitz, D.D.G.; Cavalcanti, D.P.; Pessoa, A.; Doriqui, M.J.R.; Neri, J.I.; de Pina Neto, J.M.; Wanderley, H.Y.C.; et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly—Brazil, 2015. *Mmwr. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 59–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Calvet, G.; Aguiar, R.S.; Melo, A.S.O.; Sampaio, S.A.; de Filippis, I.; Fabri, A.; Araujo, E.S.M.; de Sequeira, P.C.; de Mendonça, M.C.L.; de Oliveira, L.; et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 653–660. [[CrossRef](#)]
5. Mlakar, J.; Korva, M.; Tul, N.; Popović, M.; Poljšak-Prijatelj, M.; Mraz, J.; Kolenc, M.; Resman Rus, K.; Vesnaver Vipotnik, T.; Fabjan Vodušek, V.; et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 951–958. [[CrossRef](#)]
6. Epelboin, Y.; Talaga, S.; Epelboin, L.; Dusfour, I. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, 1–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Campos, G.S.; Bandeira, A.C.; Sardi, S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1885–1886. [[CrossRef](#)]
8. Brasil, M.d.S. *Boletim Epidemiológico 13: Monitoramento dos Casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas pelo Aedes (Dengue, Chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019*; 2019; Volume 50, pp. 1–18. Available online: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf> (accessed on 8 February 2021).
9. Pauvolid-Corrêa, A.; Campos, Z.; Juliano, R.; Velez, J.; Nogueira, R.M.R.; Komar, N. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*. [[CrossRef](#)]
10. Catenacci, L.S.; Nunes-Neto, J.; Deem, S.L.; Palmer, J.L.; Travassos-da Rosa, E.S.; Tello, J.S. Diversity patterns of hematophagous insects in Atlantic forest fragments and human-modified areas of southern Bahia, Brazil. *J. Vector Ecol.* **2018**, *43*, 293–304. [[CrossRef](#)]
11. Moreira-Soto, A.; Carneiro, I.d.O.; Fischer, C.; Feldmann, M.; Kümmeler, B.M.; Silva, N.S.; Santos, U.G.; Souza, B.F.d.C.D.; Liborio, F.d.A.; Valença-Montenegro, M.M.; et al. Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil. *mSphere* **2018**, *3*, 1–10. [[CrossRef](#)]
12. Favoretto, S.; Araújo, D.; Oliveira, D.; Duarte, N.; Mesquita, F.; Zanotto, P.; Durigon, E. First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: A possible new reservoir. *bioRxiv* **2016**. [[CrossRef](#)]
13. WHO. Yellow Fever—Brazil. Available online: <http://www.who.int/csr/don/11-february-2019-yellow-fever-brazil/en/> (accessed on 8 February 2021).
14. De Abreu, F.V.S.; Ribeiro, I.P.; Ferreira-De-Brito, A.; Dos Santos, A.A.C.; De Miranda, R.M.; Bonelly, I.D.S.; Neves, M.S.A.S.; Bersot, M.I.; Dos Santos, T.P.; Gomes, M.Q.; et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 218–231. [[CrossRef](#)]
15. Marcondes, C.; Alencar, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev. Biomed.* **2010**, *21*, 221–238.
16. Cardoso, J.d.C.; Corseuil, E.; Barata, J.M.S. Culicinae (Diptera, Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* **2005**, *49*, 275–287. [[CrossRef](#)]
17. SES. *Informe Epidemiológico 001/2018: Monitoramento das Emergências em Saúde Pública (Febre Amarela)* 04 de Janeiro de 2018; pp. 1–6. Available online: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=%2Bp77vqe5mOs%3D> (accessed on 8 February 2021).
18. Johnson, B.K.; Chanas, A.C.; Shockley, P.; Squires, E.J.; Gardner, P.; Wallace, C.; Simpson, D.I.H.;

- Bowen, E.T.W.; Platt, G.S.; Way, H.; *et al.* Arbovirus isolations from, and serological studies on, wild and domestic vertebrates from Kano Plain, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1977**, *71*, 512–517. [[CrossRef](#)]
19. Bueno, M.G.; Martinez, N.; Abdalla, L.; Duarte dos Santos, C.N.; Chame, M. Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Terzian, A.C.B.; Zini, N.; Sacchetto, L.; Rocha, R.F.; Parra, M.C.P.; Del Sarto, J.L.; Dias, A.C.F.; Coutinho, F.; Rayra, J.; da Silva, R.A.; *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ciota, A.T.; Bialosuknia, S.M.; Ehrbar, D.J.; Kramer, L.D. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* Mosquitoes. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 880–882. [[CrossRef](#)]
22. Costa-da-Silva, A.L.; Ioshino, R.S.; de Araújo, H.R.C.; Kojin, B.B.; de Andrade Zanotto, P.M.; Oliveira, D.B.L.; Melo, S.R.; Durigon, E.L.; Capurro, M.L. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171951. [[CrossRef](#)]
23. Baleotti, F.G.; Moreli, M.L.; Figueiredo, L.T.M. Brazilian Flavivirus Phylogeny Based on NS5. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 379–382. [[CrossRef](#)]
24. Pauvolid-Corrêa, A.; Kenney, J.L.; Couto-Lima, D.; Campos, Z.M.S.; Schatzmayr, H.G.; Nogueira, R.M.R.; Brault, A.C.; Komar, N. Ilheus Virus Isolation in the Pantanal, West-Central Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2318. [[CrossRef](#)]
25. Terzian, A.C.; Auguste, A.J.; Vedovello, D.; Ferreira, M.U.; da Silva-Nunes, M.; Sperança, M.A.; Suzuki, R.B.; Juncansen, C.; Araújo, J.P., Jr.; Weaver, S.C.; *et al.* Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *92*, 401–404. [[CrossRef](#)]
26. Ferreira-de-Brito, A.; Ribeiro, I.P.; de Miranda, R.M.; Fernandes, R.S.; Campos, S.S.; da Silva, K.A.B.; de Castro, M.G.; Bonaldo, M.C.; Brasil, P.; Lourenço-de-Oliveira, R. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 655–658. [[CrossRef](#)]
27. Mitchell, C.J.; Miller, B.R.; Gubler, D.J. Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **1987**, *3*, 460–465. [[PubMed](#)]
28. Miller, B.R.; Mitchell, C.J.; Ballinger, M.E. Replication, tissue tropisms and transmission of yellow fever virus in *Aedes albopictus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1989**, *83*, 252–255. [[CrossRef](#)]
29. Chang, G.J.; Cropp, B.C.; Kinney, R.M.; Trent, D.W.; Gubler, D.J. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *J. Virol.* **1995**, *69*, 5773–5780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Figueiredo, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 1643–1649. [[CrossRef](#)]
31. Johnson, B.W.; Chambers, T.V.; Crabtree, M.B.; Filippis, A.M.B.; Vilarinhos, P.T.R.; Resende, M.C.; Macoris, M.d.L.G.; Miller, B.R. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 611–613. [[CrossRef](#)]
32. Lourenço de Oliveira, R.; Vazeille, M.; de Filippis, A.M.B.; Failloux, A.B. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *69*, 105–114. [[CrossRef](#)]
33. Grard, G.; Caron, M.; Mombo, I.M.; Nkoghe, D.; Mboui Ondo, S.; Jiolle, D.; Fontenille, D.; Paupy, C.; Leroy, E.M. Zika Virus in Gabon (Central Africa)—2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–6. [[CrossRef](#)]
34. Di Luca, M.; Severini, F.; Toma, L.; Boccolini, D.; Romi, R.; Remoli, M.E.; Sabbatucci, M.; Rizzo, C.; Venturi, G.; Rezza, G.; *et al.* Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill.* **2016**, *21*, 30223. [[CrossRef](#)]
35. Du, S.; Liu, Y.; Liu, J.; Zhao, J.; Champagne, C.; Tong, L.; Zhang, R.; Zhang, F.; Qin, C.F.; Ma, P.; *et al.* *Aedes* mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)]
36. Chouin-Carneiro, T.; Vega-Rua, A.; Vazeille, M.; Yebakima, A.; Girod, R.; Goindin, D.; Dupont-Rouze, M.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Failloux, A.B. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)]
37. Liu, Z.; Zhang, Z.; Lai, Z.; Zhou, T.; Jia, Z.; Gu, J.; Wu, K.; Chen, X.G. Temperature Increase Enhances *Aedes albopictus* Competence to Transmit Dengue Virus. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Alencar, J.; Marcondes, C.B.; Serra-Freire, N.M.; Lorosa, E.S.; Pacheco, J.B.; Guimarães, A.É. Feeding patterns of *Haemagogus capricornii* and *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in two Brazilian states (Rio de Janeiro and Goiás). *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 873–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
-
- 39(2023)13:13 Santos, B.M.C.; Coelho, F.C.; Armstrong, M.; Saraceni, V.; Lemos, C. Zika: An ongoing threat to women and infants. *Cad. Saúde Pública* **2018**, *34*, e00038218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Richards, S.L.; Ponnusamy, L.; Unnasch, T.R.; Hassan, H.K.; Apperson, C.S. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 543–551. [CrossRef] [PubMed]
41. Faraji, A.; Egizi, A.; Fonseca, D.M.; Unlu, I.; Crepeau, T.; Healy, S.P.; Gaugler, R. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3037. [CrossRef] [PubMed]
42. Leroy, E.M.; Nkoghe, D.; Ollomo, B.; Nze-Nkogue, C.; Becquart, P.; Grard, G.; Pourrut, X.; Charrel, R.; Moureau, G.; Ndjoyi-Mbiguino, A.; et al. Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 591–593. [CrossRef]
43. Niebylski, M.L.; Craig, G.B., Jr. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **1994**, *10*, 339–343.
44. Silva, N.I.O.; Sacchetto, L.; de Rezende, I.M.; Trindade, G.S.; LaBeaud, A.D.; de Thoisy, B.; Drumond, B.P. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virol. J.* **2020**, *17*, 1–12. [CrossRef]
45. Fernandes, R.S.; Bersot, M.I.; Castro, M.G.; Telleria, E.L.; Ferreira-de-Brito, A.; Raphael, L.M.; Bonaldo, M.C.; Lourenço-de-Oliveira, R. Low vector competence in sylvatic mosquitoes limits Zika virus to initiate a enzootic cycle in South America. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–7. [CrossRef]
46. Maciel-de-Freitas, R.; Neto, R.B.; Gonçalves, J.M.; Codeço, C.T.; Lourenço-De-Oliveira, R. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 1112–1120. [CrossRef] [PubMed]
47. Da Costa, C.F.; Da Silva, A.V.; Nascimento, V.A.D.; De Souza, V.C.; Monteiro, D.C.D.S.; Terrazas, W.C.M.; Dos Passos, R.A.; Nascimento, S.; Lima, J.B.P.; Naveca, F.G. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
48. Cardoso, J.D.C.; De Almeida, M.A.B.; Dos Santos, E.; Da Fonseca, D.F.; Sallum, M.A.M.; Noll, C.A.; Monteiro, H.A.D.O.; Cruz, A.C.R.; Carvalho, V.L.; Pinto, E.V.; et al. Yellow Fever Virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* Mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1918–1924. [CrossRef]
49. Instituto Nacional de Meteorologia—INMET. Available online: <https://portal.inmet.gov.br/> (accessed on 8 February 2021).
50. Silver, J.B. *Mosquito Ecology. Field Sampling Methods*, 3rd ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2008; ISBN 1402066651.
51. Alencar, J.; De Almeida, H.M.; Marcondes, C.B.; Guimarães, A.É. Effect of multiple immersions on eggs and development of immature forms of *Haemagogus janthinomys* from south-eastern Brazil (Diptera: Culicidae). *Entomol. News* **2008**, *119*, 239–244. [CrossRef]
52. Alencar, J.; de Mello, C.F.; Gil-Santana, H.R.; Guimarães, A.É.; de Almeida, S.A.; Gleiser, R.M. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* **2016**, *41*, 18–26. [CrossRef]
53. Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L.D. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil—Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciéncia e Tecnologia em Saúde Para a População Brasileira*; FIOCRUZ: Rio de Janeiro, Brazil, 1994; ISBN 85-85676-03-5
54. Reinert, J.F. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *J. Eur. Mosq. Control. Assoc.* **2009**, *27*, 68–76.
55. Patel, P.; Landt, O.; Kaiser, M.; Faye, O.; Koppe, T.; Lass, U.; Sall, A.A.; Niedrig, M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virol. J.* **2013**, *10*, 58. [CrossRef] [PubMed]
56. Otto, T.D.; Vasconcellos, E.A.; Gomes, L.H.F.; Moreira, A.S.; Degrave, W.M.; Mendonça-Lima, L.; Alves-Ferreira, M. ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet. Mol. Res.* **2008**, *7*, 861–871. [CrossRef] [PubMed]
57. Faraji, A.; Egizi, A.; Fonseca, D.M.; Unlu, I.; Crepeau, T.; Healy, S.P.; Gaugler, R. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3037. [CrossRef] [PubMed]
58. Leroy, E.M.; Nkoghe, D.; Ollomo, B.; Nze-Nkogue, C.; Becquart, P.; Grard, G.; Pourrut, X.; Charrel, R.; Moureau, G.; Ndjoyi-Mbiguino, A.; et al. Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 591–593. [CrossRef]
59. Niebylski, M.L.; Craig, G.B., Jr. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **1994**, *10*, 339–343.

62. Silva, N.I.O.; Sacchetto, L.; de Rezende, I.M.; Trindade, G.S.; LaBeaud, A.D.; de Thoisy, B.; Drumond, B.P. Recent sylvatic yellowfever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virol. J.* **2020**, *17*, 1–12. [[CrossRef](#)]
- 129 i3. Fernandes, R.S.; Bersot, M.I.; Castro, M.G.; Telleria, E.L.; Ferreira-de-Brito, A.; Raphael, L.M.; Bonaldo, M.C.; Lorenço-de-Oliveira, R. Low vector competence in sylvatic mosquitoes limits Zika virus to initiate na enzootic cycle in South America. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–7. [[CrossRef](#)]
64. Maciel-de-Freitas, R.; Neto, R.B.; Gonçalves, J.M.; Codeço, C.T.; Lourenço-De-Oliveira, R. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 1112–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Da Costa, C.F.; Da Silva, A.V.; Nascimento, V.A.D.; De Souza, V.C.; Monteiro, D.C.D.S.; Terrazas, W.C.M.; Dos Passos, R.A.; Nascimento, S.; Lima, J.B.P.; Naveca, F.G. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Cardoso, J.D.C.; De Almeida, M.A.B.; Dos Santos, E.; Da Fonseca, D.F.; Sallum, M.A.M.; Noll, C.A.; Monteiro, H.A.D.O.; Cruz, A.C.R.; Carvalho, V.L.; Pinto, E.V.; et al. Yellow Fever Virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* Mosquitoes, SouthernBrazil, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1918–1924. [[CrossRef](#)]
67. Instituto Nacional de Meteorologia—INMET. Available online: <https://portal.inmet.gov.br/> (accessed on 8 February 2021).
68. Silver, J.B. *Mosquito Ecology. Field Sampling Methods*, 3rd ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2008; ISBN 1402066651.
69. Alencar, J.; De Almeida, H.M.; Marcondes, C.B.; Guimarães, A.É. Effect of multiple immersions on eggs and development of immature forms of *Haemagogus janthinomys* from south-eastern Brazil (Diptera: Culicidae). *Entomol. News* **2008**, *119*, 239–244. [[CrossRef](#)]
70. Alencar, J.; de Mello, C.F.; Gil-Santana, H.R.; Guimarães, A.É.; de Almeida, S.A.; Gleiser, R.M. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* **2016**, *41*, 18–26. [[CrossRef](#)]
71. Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L.D. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil—Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciéncia e Tecnologia em Saúde Para a População Brasileira*; FIOCRUZ: Rio de Janeiro, Brazil, 1994; ISBN 85-85676-03-5
72. Reinert, J.F. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *J. Eur. Mosq. Control. Assoc.* **2009**, *27*, 68–76.
73. Patel, P.; Landt, O.; Kaiser, M.; Faye, O.; Koppe, T.; Lass, U.; Sall, A.A.; Niedrig, M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virol. J.* **2013**, *10*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Otto, T.D.; Vasconcellos, E.A.; Gomes, L.H.F.; Moreira, A.S.; Degrave, W.M.; Mendonça-Lima, L.; Alves-Ferreira, M. ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet. Mol. Res.* **2008**, *7*, 861–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]