Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Estudo da fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae)
com simultânea investigação de infecção natural por
Flavivirus em duas Unidades de Conservação da Mata
Atlântica, Estado de São Paulo**

Karolina Morales Barrio Nuevo

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Área de Concentração: Epidemiologia

**Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo
Marrelli**

São Paulo

2019

**Estudo da fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae) com
simultânea investigação de infecção natural por *Flavivirus*
em duas Unidades de Conservação da Mata Atlântica,
Estado de São Paulo**

Karolína Morales Barrio Nuevo

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

Versão original

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

*É com muita satisfação que dedico essa dissertação
àqueles que mais acreditaram em mim e fizeram o possível para
que eu trilhasse o mais lindo dos caminhos.*

Aos meus pais, Karin e Gerson

*Nada é mais real que aprender maneira simples de viver
Tudo é tão normal se a gente não se cansa nunca de aprender
Sempre olhar como se fosse a primeira vez
Se espantar como criança a perguntar por quês
Vamos flutuar em um balão que sobrevoa o amanhecer
Vamos navegar entre navios no horizonte a se perder
Nos lembrar que tudo tem sua razão de ser
E afinal eu quero mesmo é estar com você
Sombras do céu já vem
O anoitecer também com seus milhões de estrelas
Que iluminarão mais uma vez
Com a palidez da sua luz a imensidão que a gente vê*

Almir Sater

Agradecimentos

Agradeço a Deus que me deu saúde, forças, paciência e sabedoria para realização desta pesquisa, que cuidou dos mínimos detalhes do começo ao fim do mestrado e que me proporcionou as melhores companhias para seguir ao meu lado.

Agradeço a agência de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por custear a minha bolsa de mestrado. Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento do projeto Biota – FAPESP nº 2014/50444-5 e colaboração com o Projeto regular FAPESP nº 2014/109194, que custearam as coletas de campo, materiais e todos os insumos necessários.

Agradeço ao professor Dr. Mauro Toledo Marrelli por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de alunos e poder fazer tanto o mestrado quanto o Aprimoramento Profissional – PAP em seu laboratório e, principalmente, pela sua orientação em ambos. Agradeço as experiências em cursos e encontros científicos que ele me permitiu ter.

Agradeço os membros da banca Dr. Delsio Natal, Dr. Paulo Eduardo Brandão e Dr. Luis Filipe Mucci por aceitarem participar da minha defesa de mestrado. Agradeço também as contribuições durante a pré-banca.

Agradeço a todos os meus companheiros do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP/USP) Antônio R. Medeiros de Sousa, Gabriela Carvalho, Amanada Camargo, Eduardo Evangelista, Daniel Pagotto, Rafael Christe, Ramon Wike, Ana Letícia Souza, Laura Multini e Laura pela amizade, conversas e boas risadas e compartilhamento de conhecimento. Da mesma forma agradeço meus colegas do outro laboratório LESP/USP, do qual mantive um vínculo muito próximo, Ronan Coelho, Bruno Nakazato, Cecília Lavitschka, Filipe Pancetti, Pâmela Andrade, Marta Ribeiro, Thais Azevedo, Victor Ferreira de Lima e Thaís Souza.

Um agradecimento especial ao Dr. Antônio R. Medeiros de Sousa por tudo que me ensinou, pela sua paciência e boa vontade de sempre e, principalmente, pela sua imensa contribuição na realização deste trabalho, entre ideias e análises me ajudou a fazer acontecer.

Agradeço o Me. Aristides Fernandes pela identificação dos mosquitos utilizados nesta pesquisa, sua boa vontade em me ensinar sobre eles, sobre coletas e sobre a vida.

Agradeço ao Dr. Walter Certti Júnior pela correção do texto e pelas suas pertinentes contribuições e sugestões para este trabalho. Agradeço nossas conversas e seus ensinamentos.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) pelos ensinamentos que me foram passados por meio do infindável conhecimento que possuem. Um agradecimento especial aos professores Dra. Tamara N. de Lima Camara, Dra. Eunice A. B. Galati, Dr. Walter Ceretti-Júnior, Dr. Délsio Natal, Dra. Maria Anice M. Sallum, Dr. Adriano Pinter, Me. Aristides Fernandes, Dr. Paulo R. Urbinatti e Dra. Márcia B. de Paula pelas excelentes aulas ministradas e por contribuírem enormemente para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal para toda a vida. Da mesma forma, agradeço os professores e pesquisadores científicos Dra. Sirlei Daffre e Dra. Andrea C. Fogaça do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Dr. Lincoln S. Rocha do Instituto Butantan e Dr. Paulo E. Brandão da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Agradeço a oportunidade que as professoras Dra. Tamara e Dra. Eunice me deram ao me aceitar como aluna/monitora do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino – PAE na disciplina “Entomologia Aplicada à Saúde Pública, da Graduação em Saúde Pública da FSP/USP. Tenho muito respeito e admiração por ambas. À Dra. Tamara um agradecimento especial pela sua amizade e pelas nossas conversas, você é uma inspiração para mim.

Agradeço a Olívia Gavioli pela sua amizade e companhia, além das nossas trocas de ideias e experiências, longas conversas, risadas e desabafos.

Também agradeço a todos os pesquisadores e técnicos da SUCEN, Instituto Florestal e Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo pelo auxílio nas coletas de campo durante a vigência do projeto.

Meus mais sinceros agradecimentos à toda equipe de pesquisadores do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) pela colaboração para realização de parte da minha pesquisa no IAL, por terem me acolhido com muito carinho e por toda ajuda sempre que precisei. Agradeço ao Dr. Renato Pereira de Souza por me acolher no IAL e pela oportunidade que me deu de utilizar os laboratórios do núcleo para realizar parte dos meus experimentos.

Um agradecimento mais que especial à pesquisadora científica Iray Maria Rocco por me ensinar a técnica de isolamento viral e teste de imunofluorescência, pela sua paciência e confiança em mim. Também gostaria de agradecer pelos ensinamentos de vida, sempre com ótimas conversas e boas risadas. Obrigada pela sua amizade e por ter me acolhido em seu laboratório.

Agradeço de coração à Dra. Mariana Sequetin Cunha pela sua grande amizade, pela sua colaboração para realização da RT-qPCR, por me ensinar a técnica, por me acompanhar em todas as etapas, pelas boas conversas, risadas e, principalmente, pela sua paciência.

Agradeço todo apoio que a pesquisadora científica Antónia (Tó) me deu, sempre me incentivando, muito obrigada Tó pelos seus conselhos. Agradeço as aprimorandas Laís Sampaio e Paloma Facioli pela amizade que tivemos e por todas as boas conversas no café.

Do núcleo de doenças entéricas do Centro de Virologia agradeço imensamente a Dra. Adriana Luchs, primeiro por ter realizado o sequenciamento das amostras virais positivas investigadas neste trabalho e, segundo, pela sua grande amizade, paciência e preocupação com a minha pesquisa e comigo. Obrigada por tudo.

Agradeço também os meus queridos professores mestres e doutores do curso de graduação em Ciências Biológicas Cristiane Furlaneto, Nina Furnari, Fábio Mesquita, Mariane Biz, Mariana Garcia, Patrícia Moura, Luciana Mantzouranis, Ednilse Leme, Marcelo Pisetta, Luiz Nali, Ana Claudia Camargo, Fátima Buturi e Ivan Sanches que foram marcantes na minha vida acadêmica e me incentivaram a fazer o mestrado, obrigada pelo trabalho e dedicação de vocês.

Agradeço aos meus queridos amigos e ex companheiros de graduação Fábio, Liliane, Thaís, Weverton e Victor pelo incentivo, apoio, força e consolo que sempre me deram para chegar até aqui. Se tenho sucesso vocês fazem parte dele. Vocês moram no meu coração. Vocês me proporcionaram as melhores aventuras. Obrigada meus amigos.

Agradeço aos meus pais, Karin e Gerson, meus irmãos Matheus e Arthur e meus avós Rosely, Maria Helena e José por todo o esforço que sempre fizeram para que eu me formasse na graduação e meu mestrado fosse cumprido, agradeço, também, pela paciência e compreensão que tiveram, por todo apoio que me deram e por terem acreditado no meu potencial. Tudo que sou hoje devo a vocês. Agradeço meu companheirinho de escrita que ficou, pacientemente, o tempo todo ao meu lado enquanto estudava e escrevia. Marley, amo você.

Agradeço a você Victor, meu amor, por trilhar o mais belo dos caminhos comigo, o da ciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pelas palavras de consolo e incentivo quando penso que não dá mais, pelo abraço apertado que renova minhas esperanças e por olhar para a mesma direção que eu olho.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram e permitiram que esta dissertação se concretizasse.

RESUMO

Os *Flavivirus* são transmitidos por mosquitos (Diptera: Culicidae) que se refugiam em remanescentes de Mata Atlântica. Essas áreas verdes correspondem às Unidades de Conservação e parques urbanos, que estão espalhados pela região metropolitana de São Paulo. Este estudo foi realizado com o intuito de conhecer as espécies de culicídeos que circulam na Área de Proteção Ambiental (APA) Capivari-Monos, na zona Sul do município de São Paulo, e no Parque Estadual da Cantareira (PEC), na zona Norte do mesmo município, e de investigar infecção natural por *Flavivirus* na fauna de culicídeos amostrada. Também foi proposto relacionar a variedade, a quantidade e identidade dos *Flavivirus* detectados com os padrões de riqueza, abundância e diversidade das assembleias de mosquitos. Foram realizadas 14 coletas, mensalmente, em quatro pontos de coleta na APA e três no PEC, todos com diferentes níveis de intervenção antrópica, no período de março de 2016 a abril de 2017. Armadilhas automáticas luminosas tipo CDC (com atração de CO₂ e ácido láctico) foram instaladas na copa das árvores e no nível do solo. O esforço amostral foi equivalente para os todos os pontos, sendo que foram instaladas duas armadilhas em cada ponto (uma na copa e outra no solo), com 18 horas de coleta, permitindo amostragem de culicídeos de hábitos diurnos, crepusculares e noturnos. Os espécimes foram transportados com vida para o Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, criopreservados a temperatura -70°C, identificados morfológicamente e agrupados em *pools* (com até 10 indivíduos). Os *pools* foram submetidos à técnica de isolamento viral em cultura de células (C6/36), seguida do teste de imunofluorescência indireta. Os *pools* positivos foram submetidos à reação de RT-qPCR e, posteriormente, sequenciados. Duas árvores de similaridade foram construídas para confirmação dos *Flavivirus*. No total, 1216 exemplares de culicídeos foram amostrados (13 gêneros), cuja riqueza foi de 42 táxons. A APA registrou a maior abundância (878 espécimes) e maior riqueza (37 táxons). A Cachoeira foi o ponto de coleta na APA que amostrou a maior riqueza e abundância, contudo, com a mais baixa diversidade. Entretanto, a Borracharia obteve alta riqueza, baixa abundância e a maior diversidade. O PEC amostrou 338 indivíduos e a riqueza foi de 23 táxons. Dentre os pontos do PEC, a Trilha do Pinheirinho amostrou a maior riqueza e abundância. *An. (Ker.) cruzii*, *Cx. (Cux.)* sp, *Cx. (Mel.) vaxus*, *Li. durhami*, *Wy. (Prl.) confusa* e *Wy. (Pho.) theobaldi* foram detectadas com infecção natural por *Flavivirus*. O sequenciamento revelou infecção por ZIKV em *An. (Ker.) cruzii*, *Li. durhami* e *Wy. (Prl.) confusa*, e infecção por DENV-2 em *Cx. (Cux.)* sp e *Cx. (Mel.) vaxus*. Concluiu-se que a riqueza, abundância e diversidade estão relacionadas entre si e, juntas, influenciaram na detecção de espécies de culicídeos naturalmente infectadas por *Flavivirus*, sendo que estes foram detectados em espécies provenientes de pontos de coleta cuja riqueza e abundância foram altas, e a diversidade baixa. A quantidade e a variedade dos *Flavivirus* também foram influenciadas por esses três fatores, para ocorrer na natureza. Não foi possível correlacionar a identidade dos *Flavivirus* com os três fatores uma vez que as espécies detectadas com infecção natural por esses vírus não são apontadas como potenciais vetoras. Além disso, a abundância e a diversidade pareceram ter uma relação inversa entre si.

Palavras-chaves: APA Capivari-Monos, Parque Estadual da Cantareira, *Flavivirus*, ZIKV, DENV-2

ABSTRACT

Flaviviruses are transmitted by mosquitoes (Diptera: Culicidae) that take refuge in remnants of the Atlantic Forest. These green areas correspond to Conservation Units and urban parks which are spread throughout the metropolitan region of São Paulo. This study was carried out in order to identify the Culicidae fauna that circulate in Capivari-Monos Environmental Protection Area (APA), located in the South area of the city of São Paulo, and in Cantareira State Park (PEC), North area of the same municipality and to investigate natural *Flaviviruses* infection in this sampled Culicidae fauna. It was also proposed to relate the variety, quantity and identity of the *Flaviviruses* detected with patterns of richness, abundance and diversity of mosquito assemblages. Fourteen collections were carried out monthly at four collection sites in the APA and three in the PEC, all sites with different levels of anthropogenic intervention, during March 2016 to April 2017. CDC automatic traps (with attraction of CO₂ and lactic acid) were installed in the canopy and on ground. The sampling effort was equivalent for all the points, and two traps were installed at each point (one in the canopy and the other on ground), with 18 hours of sampling, allowing sampling culicidae of daytime, morning and evening twilight, and nightly habits. The specimens were carried alive to the Public Health Laboratory of the School of Public Health of the University of São Paulo, were cryopreserved at a -70°C temperature, identified morphologically and grouped in pools (with up to 10 individuals). The pools were submitted to the virus isolation technique in cell culture tissue (C6 / 36), followed by the indirect immunofluorescence test. The positive pools were submitted to the RT-qPCR reaction and, subsequently, sequenced. Two similarity trees were made only to confirm *Flaviviruses* infection. In total, 1216 specimens of culicidae were sampled (13 genera), and the richness was 42 taxa. In addition to APA recorded the highest abundance (878 specimens) and also highest richness (37 taxa). Cachoeira was the collection site in APA that showed the greatest richness and abundance as well, however, with the lowest diversity. In addition, Borracharia obtained high richness, low abundance and highest diversity. PEC sampled 338 specimens and the richness was 23 taxa. Among the collection sites of the PEC, Pinheirinho Trail showed the highest richness and also abundance. *An. (Ker.) cruzii*, *Cx. (Cux.)* sp, *Cx. (Mel.) vaxus*, *Li. durhami*, *Wy. (Prl.) confusa* and *Wy. (Pho.) theobaldi* were detected with natural *Flaviviruses* infection. The sequencing analyzes revealed ZIKV infection in *An. (Ker.) cruzii*, *Li. durhami* and *Wy. (Prl.) confusa*, and DENV-2 infection in *Cx. (Cux.)* sp and *Cx. (Mel.) vaxus*. It has concluded that the richness, abundance and also diversity are related to each other and, together, influenced the detection of species of culicidae naturally infected by *Flaviviruses*, which were detected in species from collection sites whose richness and abundance were high. About quantity and variety of *Flaviviruses*, these were also influenced by the three factors on nature. It was not possible to correlate the identity of the *Flaviviruses* with the three factors since the species detected with natural infection by these viruses are not indicated as potential vectors. Moreover, abundance and diversity appeared to have an inverse relation.

Key-words: APA Capivari-Monos, Cantareira State Park, *Flaviviruses*, ZIK, DENV-2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ARTRÓPODES.....	18
1.1.1 Culicídeos.....	19
1.2 ARBOVÍRUS.....	24
1.2.1 Família Flaviviridae.....	25
1.2.1.1 <i>Flavivirus</i>	25
1.2.2 Família Togaviridae.....	28
1.2.2.1 <i>Alphavirus</i>	28
1.2.3 Família Bunyaviridae.....	29
1.2.3.1 <i>Orthobunyavirus</i>	29
1.3 PRINCIPAIS ARBOVIROSES TRANSMITIDAS POR CULICÍDEOS.....	30
1.3.1 Febre Amarela.....	31
1.3.2 Dengue.....	32
1.3.3 Zika.....	35
1.3.4 Febre do Nilo do Oeste.....	37
1.3.5 Encefalite de Saint Louis.....	38
1.3.6 Febre do Chikungunya.....	39
1.3.7 Febre do Mayaro.....	41
1.3.8 Oropouche.....	42
1.4 MATA ATLÂNTICA.....	43
1.4.1 Unidades de Conservação na Metrópole Paulistana.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 OBJETIVO GERAL.....	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 ÁREAS DE ESTUDO.....	47
3.1.1 Caracterização das Áreas de Estudo.....	48
3.1.2 Técnica de Coleta e Identificação dos Espécimes.....	55
3.1.3 Análise dos Dados de Abundância, Riqueza e Diversidade.....	56
3.2 IDENTIFICAÇÃO DE <i>FLAVIVIRUS</i>	57
3.2.1 Técnica de Isolamento Viral e Teste de Imunofluorescência Indireta.....	57

3.2.1.1 Preparo de Mosquitos.....	57
3.2.1.2 Inoculação das Amostras de Mosquitos em Cultura de Células C6/36.....	58
3.2.1.3 Teste Imunofluorescência Indireta.....	59
3.3 Extração de Ácido Nucleico Viral.....	62
3.3.1 Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia Pela Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR).....	62
3.4 ENSAIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	63
3.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	63
3.5.1 Purificação e Precipitação do Produto da Reação de Sequenciamento.....	64
3.5.2 Análise das Sequências e Similaridade.....	64
4. RESULTADOS.....	67
4.1 ABUNDÂNCIA, RIQUEZA E DIVERSIDADE DE CULICÍDEOS.....	67
4.2 DETECÇÃO DE <i>FLAVIVIRUS</i> EM MOSQUITOS.....	74
4.2.1 <i>Flavivirus</i> Detectados a Partir do Isolamento Viral em Células C6/36 Seguido do Teste de Imunofluorescência Indireta.....	74
4.2.2 PCR em Tempo Real do Gene NS5 de <i>Flavivirus</i>	75
4.2.3 Sequenciamento Genômico das Amostras Positivas para <i>Flavivirus</i>	76
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÃO.....	102
7. REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	114
Anexo 1.....	114
Anexo 2.....	115
APÊNDICES.....	116
Apêndice 1.....	116
Apêndice 2.....	118
Apêndice 3.....	119
Apêndice 4.....	120
Apêndice 5.....	121
Apêndice 6.....	122
Apêndice 7.....	123
Apêndice 8.....	124

Apêndice 9.....	125
Apêndice 10.....	126
Apêndice 11.....	127
Apêndice 12.....	128
Apêndice 13.....	129
Apêndice 14.....	130

CURRÍCULO LATTES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de biológico de culicídeos. Ovo: são de formas variáveis, depositados em formas de jangadas, (*Culex* sp) ou individualmente (*Aedes* e *Anopheles*). Larva: nadam livremente e passam por quatro fases (L1, L2, L3 e L4). Pupa: Nadam livremente e não se alimentam, apenas armazenam a energia contida da forma larval. Adultos: São pequenos, delgados e variam bastante sua coloração.....20
- Figura 2.** Ciclo de transmissão silvestre (esquerda) e ciclo de transmissão urbana (direita) do vírus Chikungunya em mosquitos vetores e hospedeiros vertebrados humanos e não humanos. Fonte: FERNANDÉZ e NAVARRO, 2015. Modificado.....21
- Figura 3.** Esquema das etapas necessárias para a infecção por vírus do gênero *Flavivirus* e transmissão por um mosquito. Fonte: GUBLER et al., 2007. Modificado.....22
- Figura 4.** Representação morfológica (A) e genômica (B) do vírus da dengue (*Flavivirus*). A = Reconstrução crio-eletrônica tridimensional da partícula viral imatura (esquerda) e madura (direita) com resolução, cujos triângulos delineiam um formato icosaédrico, com eixos de simetria 2, 3 e 5 vezes. B = Esquema da organização dos genomas dos *Flavivirus*, cujas proteínas virais estão representadas. NCR = região Não Codificante. Fonte: SIMMONDS, et al.; ICTV, 2017. Modificado.....26
- Figura 5.** Representação esquemática do ciclo de vida do vírus. Em 1 observa-se a ligação entre as proteínas virais e receptores de superfície da célula do hospedeiro seguida de endocitose. Em 2 ocorre a tradução da poliproteína. Em 3 o material genético viral é produzido.....27
- Figura 6.** Mapa do Brasil com realce do estado de São Paulo (esquerda) e o município de São Paulo em maior destaque (direita). A localidade de cada ponto de coleta está marcada com pontos vermelhos no mapa.....47
- Figura 7.** Mapa do município de São Paulo de acordo com a urbanização (cinza), cobertura vegetal/capoeiras e matas (verde) e reservatórios d'água (azul) com limite do Parque Estadual da Cantareira (contorno preto) APA Capivari-Monos (contorno laranja) e locais de estudo (retângulo vermelho). Fontes: Área urbanizada: Atlas Ambiental do MPS; cobertura vegetal: SIFESP-IF/SMA (2002).....48
- Figura 8.** Tamanho da Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos com relação ao tamanho do município de São Paulo (direita). Localização da APA Capivari-Monos os municípios mostrando os municípios que fazem fronteira e, também, a fronteira com o Parque Estadual da Serra do Mar. Fonte: PMSP, 2007.....50
- Figura 9.** Localização de Parque Estadual da Cantareira nos municípios de Caieiras, Mairiporã, Guarulhos e São Paulo, cuja maior parte se encontra no município de São Paulo. Fonte: SÃO PAULO, 2009 (Instituto Florestal (IF), 2004; IBGE, 2005. Projeção: UTM Fuso 23° Datum SAD 69. Org. Cartogr.: Everton Talpo – março (2009).....51
- Figura 10.** Pontos de coletas de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde estão localizados a Borracharia e o Sítio Águas de Siloé, respectivamente, na APA Capivari-Monos, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.....52
- Figura 11.** Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Cachoeira na APA Capivari-Monos, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.....53
- Figura 12.** Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizado o Embura, no bairro Jardim Embura, próximo à Rua Catharina Guilger Reimberg e às residências, na APA Capivari-Monos, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2018.....53

Figura 13. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Administração no Núcleo Pedra Grande, no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.....	54
Figura 14. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Trilha da Bica (Rua Frutuoso Viana), no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.....	54
Figura 15. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Trilha do Pinheirinho no Parque Estadual da Cantareira, município de Mairiporã. Fonte: Google Earth, 2015.....	55
Figura 16. Técnicas de coleta utilizadas no estudo. A= Armadilha do tipo CDC instalada na copa de uma árvore. B= CDC instalada no nível do solo, ambas na APA Capivari-Monos. Imagens: Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP).....	56
Figura 17. Preparo de mosquitos. A= Pool de mosquito recém-tirado da temperatura -70°C; B, C e D= Maceração de mosquitos; E= Albumina bovina adicionada; F= Retirada de tecidos fragmentados; G= Armazenamento dos tecidos fragmentados em flaconete; H= Centrifugação dos flaconetes; I= Sobrenadantes recolhidos para armazenamento a temperatura -70°C em tubos criogênicos.....	58
Figura 18. Inoculação das amostras de mosquitos em cultura de células C6/36. A= Tubos criogênicos com amostras originais; B= Tubos semeados com células C6/36; C= meio de crescimento (L-15) desprezado; D e E= Tampa de rosca substituída pela rolha de silicone nº 3; F e G= Inoculação das amostras nos tubos de células C/36; H= Tubos de células C6/36 inoculados incubados na estufa a temperatura 28°C; I= Meio Leibovitz (L-15).....	59
Figura 19. Técnica de isolamento viral seguido do teste de imunofluorescência indireta. A= Lâmina; B= Tubos de células armazenados por 9 dias em estufa (28°C) centrifugados; C= Armazenamento do fluido dos tubos de células recém centrifugados; D= Fluido de células armazenado a temperatura -70°C; E= Homogeneização das células sedimentadas no tubo de células recém centrifugados com Meio L-15; F= Amostra homogeneizada pingada (em duplicata) nos orifícios das lâminas; G= Anti-flavívirus pingado em cada orifício das lâminas; H= Câmara úmida em estufa a temperatura 37°C; I= Anti-camundongo pingado em cada orifício das lâminas.....	61
Figura 20. Amostra de <i>Flavivirus</i> isolada de mosquitos (Diptera: Culicidae), oriundos da APA Capivari-Monos, município de São Paulo, em células C6/36.....	61
Figura 21. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados na APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.....	68
Figura 22. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo e de Mairiporã, no período de março de 2016 a abril de 2017.....	69
Figura 23. Representação da quantidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados nas duas Unidades de Conservação (APA= Capivari-Monos e PEC= Parque Estadual da Cantareira), no período de março de 2016 a abril de 2017. Estão marcadas em negrito as espécies coletadas em maior abundância.....	70
Figura 24. Riqueza de táxons de mosquitos (Diptera: Culicidae) observada em cada ponto de coleta da APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.....	71

- Figura 25.** Riqueza de táxons de mosquitos (Diptera: Culicidae) observada em cada ponto de coleta do Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo e de Mairiporã, no período de março de 2016 a abril de 2017.....72
- Figura 26.** Riqueza de táxons de mosquitos (Diptera: Culicidae) observada cada uma das Unidade de Conservação (APA Capivari-Monos e Parque Estadual da Cantareira), estado de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.....72
- Figura 27.** Curvas sigmóides de amplificação geradas a partir da técnica RT-qPCR que amplifica fragmento do gene NS5 de *Flavivirus*. O limiar (linha reta na cor azul) e as curvas que o ultrapassam (amarela, roxa, azul, verde clara, verde escura, azul clara e azul escura) podem ser observados.....76
- Figura 28.** Árvore de similaridade do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene NS5 de DENV-2 das cepas Flavi_143_DENV2 e Flavi_168_DENV2 geradas com o software MEGA 6.0. Sequências de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. As espécies e o número de aceso de cada cepa estão indicados. As informações do isolamento viral de cada cepa estão descritas no quadro 4. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....79
- Figura 29.** Árvore de similaridade do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene NS5 de ZIKV das cepas Flavi 148, Flavi 150 e Flavi 157 geradas com o software MEGA 6.0. Sequências de ZIKV de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. As espécies e o número de aceso de cada cepa estão indicados. As informações do isolamento viral de cada cepa estão descritas no quadro 4. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....80

LISTAS DE QUADROS

- Quadro 1.** Sequência e posição de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores codificantes da região NS5, descritos por Patel et al., 2013, usados neste estudo.....63
- Quadro 2.** Descrição das informações das sequências analisadas e alinhadas para a construção das árvores de similaridade como o país de isolamento, *Flavivirus* isolado, ano, material isolado, sequência genômica e respectivos números de acesso no *Genbank*.....65
- Quadro 3.** Gêneros e subgêneros de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira. Aqueles coletados apenas em uma das áreas de estudo estão marcados em cinza e os que não estão marcados correspondem aos coletados em ambas as áreas de estudo.....71
- Quadro 4.** Descrição dos *pools* de mosquitos oriundos da APA Capivari-Monos com resultados positivos para o gênero *Flavivirus* por meio da técnica de isolamento viral seguido do teste de Imunofluorescência Indireta, cujas informações aparecem de acordo com o código da amostra, data de coleta, ponto de coleta, táxon dos mosquitos, sexo, número de mosquitos por *pool*, estrato e resultado obtido no isolamento viral seguido de imunofluorescência indireta.....75
- Quadro 5.** Resultados da PCR em tempo real do gene NS5 de *Flavivirus* com descrição dos *pools* de mosquitos (Diptera: Culicidae) (amostra, mosquitos e quantidade de exemplares por *pool*) e seus respectivos Ct e Tm. Em negrito estão os *pools* positivos para *Flavivirus*.....76
- Quadro 6.** Características dos *pools* dos quais foram detectadas sequências de RNA viral, segundo amostra, data de coleta, ponto de coleta, táxon, sexo, quantidade de exemplares por *pool*, estrato, RNA viral detectado no sequenciamento e número de acesso no *Genbank*.....77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados referentes à abundância de espécimes, à riqueza de táxons, à quantidade de gêneros e subgêneros, ao sexo, ao estrato (copa e solo) e ao número de *pools* analisados, respectivamente, de mosquitos coletados na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo e Mairiporã, no período de março de 2016 a abril de 2017.....67
- Tabela 2.** Resultado da diversidade de táxons de mosquitos coletados nos quatro pontos de coleta da APA Capivari-Monos (Borracharia, Cachoeira, Embura e Siloé) calculada através do Índice de Shannon.....74

LISTA DE SIGLAS

aa – Aminoácidos

AG80V - Rio Negro vírus

APA – Área de Proteção Ambiental

AURAV – Aura vírus

BEB - Bebaru vírus

BFV - vírus da Febre da Floresta de Barmah

BLAST – Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSQV – Bussuquara vírus

CABV - Cabassou vírus

CACV – Caciporé vírus

CHIKV – Chikungunya vírus

CSB – Cabine de Segurança Biológica

Ct – Threshold Cycle

DC – Depois de Cristo

DENV – vírus da dengue

DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 – Diferentes sorotipos do vírus dengue

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EEEV - vírus da Encefalite Equina do Leste (Oriental)

EUA – Estados Unidos da América

EVEVE - Everglades vírus

FMV - Forte Morgan vírus

GETV - Getah vírus

HJV - Highlands - Terras Altas J vírus

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IGPV – vírus do Iguape

ILHV – vírus Ilhéus

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

JEV - Encefalite Japonesa

Kb - Kilobases

KYZV - Kyzylagach vírus

L1, L2, L3 e L4 – Estágio larvais dos culicídeos

MAYV – vírus Mayaro

MIDV - Middelburg vírus

MUCV - Mucambo vírus

NCBI – Centro Nacional de Informação para Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)

NDUV - Ndumu vírus

NM – Nanômetro

NRC – Regiões não codificantes
NS – Proteínas não estruturais
Nt – Nucleotídeos
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONNV - O'nyong-nyong vírus
ORF - Sequência aberta de leitura (Open Reading Frame)
OROV – vírus do Oropouche
PAHO – Organização Pan-americana de Saúde (Pan American Health Organization)
PAST – Programa de Estatística Paleontológica (*Paleontological Statistics Program*)
Pb – Pares de bases
PBS – Solução tampão (*Phosphate Buffered Saline*)
PEC – Parque Estadual da Cantareira
PIXV - Pixuna vírus
PNH – Primatas não humanos
PrM – Proteína de membrana precursora da M
RER – Retículo endoplasmático rugoso
RNA – Ácido Ribonucleico
ROCV – vírus do Rocio
RRV - vírus da Febre de Ross River
RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa
RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa em Tempo Real
RVF – vírus da Febre do Vale do Rift
SBF – Soro Bovino Fetal
SE – Semana Epidemiológica
SESV - vírus Southern Elephant Seal
SFV - Floresta de Semliki
SINV - vírus da Febre do Sindbis
SLEV - Encefalite de Saint Louis virus
SNUC - Sistema Nacional de Unidades de Conservação
Tm – Temperatura de *Melting*
UC – Unidades de Conservação
UNAV - Una vírus
VEEV - Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
WEEV - Encefalite Equina do Oeste (Ocidental)
WHAV - vírus da Whataroa
WHO – World Health Organization
WNV - Febre do Oeste do Nilo
YFV – vírus da Febre Amarela
ZIKV – Zika vírus

1. INTRODUÇÃO

Mais de 700 mil mortes todos os anos são causadas por patógenos veiculados por artrópodes vetores no mundo, representando 17% de todas as doenças infecciosas (WHO, 2017, 2018). São diversas doenças com quadros clínicos febris, hemorrágicos, neurológicos, artrálgicos e, até mesmo com encefalites e meningites, causados pela emergência e reemergência de arbovírus como Bussuquara (BSQV), Cacipore (CACV), Chikungunya (CHIKV), Dengue e seus quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), Encefalite Equina do Leste (Oriental) (EEEV), Encefalite Equina do Oeste (Ocidental) (WEEV), Encefalite de Saint Louis (SLEV), Encefalite Japonesa (JEV), Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Febre Amarela (YFV), Febre do Oeste do Nilo (WNV), Febre do Vale do Rift (RVF), Iguaçu (IGPV), Ilheus (ILHV), Mayaro (MAYV), Oropouche (OROV), Rocio (ROCV), Zika (ZIKV), dentre outros que acometem a população mundial (WHO 2018; KUNO e CHANG, 2005; GUBLER et al., 2007; DIALLO et al., 2014; LOPES et al., 2014; LIMA-CAMARA, 2016; DONALISIO et al., 2017).

De todos os artrópodes vetores os mosquitos se destacam, liderando a lista dos animais que mais matam no mundo (HARBACH, 2008; WHO, 2018). Possuem competência e capacidade vetorial de transmitir os mais variados agentes etiológicos que acometem vertebrados humanos e não humanos (HARDY et al., 1983; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; VEGA-RÚA et al., 2014; DODSON et al., 2018), causando infecções com consequências graves de alto impacto na saúde pública e na economia mundial (AAGAARD-HANSEN, 2010; TEICH et al., 2017). Os arbovírus têm a capacidade de se manter em ciclos de transmissão silvestre, periurbano e urbano e, no caso desses dois últimos, circulam entre vetores altamente antropofílicos como, por exemplo, mosquitos dos gêneros *Aedes* Meigen, *Anopheles* Meigen e *Culex* Linnaeus, principalmente, e o homem (WEAVER e REISEN, 2010; VEGA-RÚA et al., 2014 LIMA-CAMARA et al., 2016).

1.1 ARTRÓPODES

O filo Arthropoda contém cerca de 1 milhão de espécies, cuja diversidade é a maior do reino animal (FORATTINI, 1996; HICKMAN et al., 2004; MAZZAROLO, 2009). Possuem extensa distribuição espacial e de habitats, com hábitos alimentares, sistemas morfológicos e fisiológicos muito variados, bem como complexos padrões de comportamento e adaptabilidade às mudanças ambientais, tornando-os bastante ecléticos e o grupo mais bem-sucedido devido

às suas estruturas características e especializadas (HICKMAN et al., 2004; MAZZAROLO, 2009). Estes aspectos permitem bastante agilidade na busca de alimentos, evita a predação e, conseqüentemente, resultam na adaptação a praticamente todos os tipos de ambientes e numerosas relações com os seres vivos (FORATTINI, 1996; HICKMAN et al., 2004).

Pelo fato de os artrópodes possuírem acesso aos mais variados nichos e se relacionarem de diversas maneiras com os seres vivos proporcionam muitos benefícios. Contudo, apesar das numerosas vantagens que apresentam, há, por outro lado, os que propiciam imensas desvantagens causando impactos negativos na saúde (HICKMAN et al., 2004) e na economia mundial (HICKMAN et al., 2004). Isso porque muitas espécies são responsáveis por agravos de importância médica visto que desempenham papel de vetor e transmitem agentes etiológicos (bactérias, protozoários, vermes e vírus) causadores de doenças aos animais humanos e não humanos (PAHO/WHO, 2001, 2003; KUNO e CHANG, 2005; BRASIL, 2004b, 2010b). Dentre os artrópodes de importância epidemiológica, os mosquitos são um dos mais estudados por estarem no topo da lista dos animais que mais matam no mundo (FORATTINI, 1965; 1996, 2002; HARBACH, 2007, 2008; WHO, 2018).

1.1.1. Culicídeos

A família Culicidae (MEIGEN, 1818), pertencente à Ordem Diptera, possui elevada diversidade taxonômica com pouco mais de 3.550 espécies de mosquitos descritas e validadas, de acordo com HARBACH (2018). Estão classificadas em duas subfamílias, Anophelinae que possui três gêneros e Culicinae que possui 11 tribos, que agregam 110 gêneros (HARBACH, 2007, 2008). Ocorrem em regiões temperadas, tropicais, subtropicais e até no Círculo Polar Ártico (HARBACH, 2008). São conhecidos popularmente como pernilongos, carapanãs e muriçocas, dependendo da região do Brasil (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BRASIL, 2017; MORAIS e NATAL, 2017).

Muitas espécies vivem e desenvolvem suas atividades, tais como reprodução, alimentação e oviposição no nível do solo enquanto que outras os fazem na copa das árvores (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2007, 2008). Podem ser de hábitos diurno, crepuscular ou noturno (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; HARBACH, 2008; SANTOS-NETO e LOZOVEI, 2008). Os culicídeos têm o ciclo biológico holometábolo, na qual a fase imatura é aquática (ovo, larva L1, L2, L3 e L4 e pupa), os ovos têm formatos variáveis e são depositados em formas de jangadas (*Culex*

sp) ou individualmente (*Aedes* e *Anopheles*) (FORATTINI, 2002; SÃO PAULO, 2018) (Figura 1). As larvas se alimentam de microrganismos e partículas suspensas na água e as pupas não se alimentam (HARBACH, 2008; URBINATTI et al., 2001) (Figura 1). Na fase adulta são terrestres e alados (Figura 1) (LANE, 1953; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; URBINATTI et al., 2001; FORATTINI, 2002). Os adultos dessa família possuem o corpo nitidamente dividido entre cabeça, tórax e abdômem, são fáceis de reconhecer pela forma característica de seu corpo que é delgado, com pernas longas, uma longa probóscide e presença de escamas na maior parte do corpo (HARBACH, 2008).

Figura 1. Ciclo de biológico de culicídeos. Ovo: são de formas variáveis, depositados em formas de jangadas, (*Culex sp*) ou individualmente (*Aedes* e *Anopheles*). Larva: nadam livremente e passam por quatro fases (L1, L2, L3 e L4). Pupa: Nadam livremente e não se alimentam, apenas armazenam a energia contida da forma larval. Adultos: São pequenos, delgados e variam sua coloração.

Tanto os machos quanto as fêmeas adultas se alimentam de líquidos vegetais em geral. Entretanto, as fêmeas de culicídeos também são hematófagas e se alimentam de sangue de vertebrados, esses, por sua vez, servem como fonte comum de alimentação aos mosquitos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; HARBACH, 2008; CARVALHO et al., 2014). A hematofagia é crucial para a maturação de seus ovos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; CARVALHO et al., 2014). Uma exceção ao hábito hematofágico são as fêmeas do gênero *Toxorhynchites*, da tribo Toxorhynchitini (Diptera: Culicidae) (STEFFAN e EVENHUIS, 1981).

A hematofagia tem chamado atenção da Saúde Pública desde o século XIX, quando as primeiras hipóteses dos mosquitos como vetores de agentes etiológicos causadores de doenças infecciosas foram levantadas, visto que até este período os mosquitos eram estudados de forma superficial apenas por entomologistas (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994;

FORATTINI, 2002; SILVA e ANGERAMI, 2008). Muitos desses agentes etiológicos têm ciclos de vida que envolvem mosquitos vetores (FORATTINI, 1965, 1996, 2002; HARBACH, 2008; MORAIS e NATAL, 2017). Dessa forma, no caso dos arbovírus, uma vez que estão presentes no mesmo ambiente que o vetor e o hospedeiro vertebrado, por meio do hábito hematofágico, os vírus podem se manter em circulação através do ciclo silvestre, em áreas florestadas e rurais, e ciclo urbano, em áreas urbanas e periurbanas (Figura 2) (FORATTINI, 1996, 2002; SIMMONDS et al., 2017). Com relação à busca de alimento, pode ocorrer a distribuição vertical dos mosquitos entre a copa das árvores e o nível do solo, o que vai depender de cada espécie e da localização do hospedeiro (CARVALHO et al., 2014, 2017).

A transmissão viral se inicia através da picada do mosquito em um hospedeiro suscetível, cujo padrão a ser seguido no ciclo silvestre é mosquito-vertebrado-mosquito, no qual o vertebrado é a fonte alimentar natural do mosquito que, em geral, são mamíferos, répteis, aves e anfíbios, além de ser o reservatório do patógeno (FORATTINI, 1996, 2002; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; CARVALHO et al., 2014). Entretanto, pode acontecer de o homem adentrar na mata e ocorrer o repasto sanguíneo através da interação mosquito-homem-mosquito, onde o homem é hospedeiro acidental (Figura 2) (FORATTINI, 1996, 2002; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; CARVALHO et al., 2014). Não obstante, os mosquitos antropofílicos são responsáveis pelo ciclo de transmissão urbano e realizam o repasto sanguíneo no homem ou em animais domésticos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; SILVA e ANGERAMI, 2008).

Figura 2. Ciclo de transmissão silvestre (esquerda) e ciclo de transmissão urbana (direita) do vírus Chikungunya em mosquitos vetores e hospedeiros vertebrados humanos e não humanos. Fonte: FERNANDÉZ e NAVARRO, 2015. Modificado.

A fêmea é estimulada a realizar o repasto sanguíneo para maturação de seus ovos, que levam em torno de três a quatro dias, podendo repeti-lo algumas vezes durante sua vida, pois a necessidade de sangue é constante na vida do vetor (FORATTINI, 1996, 2002; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; CARVALHO et al., 2014,). Quando um repasto sanguíneo é realizado com posterior oviposição, a fêmea completou um ciclo gonotrófico (ciclo fisiológico de maturação dos ovos para oviposição) (KLOWDEN et al., 1994; KUNO e CHANG, 2005). Todavia, pode acontecer de a fêmea realizar mais de um repasto sanguíneo para ovipor, fato chamado de discordância gonotrófica que é bastante significativa na transmissão de patógenos (KLOWDEN et al., 1994; CARVALHO et al., 2014).

A fêmea torna-se infectada após realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado (DODSON e RASGON, 2017), que esta entra em contato com o vírus circulante na corrente sanguínea do hospedeiro. Dessa maneira, quando o sangue chega ao intestino da fêmea as células intestinais serão as primeiras a serem infectadas e, então, se o vírus conseguir ultrapassar a barreira intestinal (STRAND, 2018) o patógeno inicia múltiplas replicações e segue infectando células e tecidos mesenteronais, até chegar nas glândulas salivares e ser liberado pelas células epiteliais das glândulas salivares no próximo repasto sanguíneo (Figura 3) e , então, começa um novo ciclo no hospedeiro suscetível, onde ocorre a replicação viral com posterior disseminação pela corrente sanguínea e, então, esse hospedeiro estará apto para transmitir o vírus a um outro mosquito que realize o repasto sanguíneo (KUNO e CHANG, 2005; GUBLER et al., 2007).

Figura 3. Esquema das etapas necessárias para a infecção por vírus do gênero *Flavivirus* no mosquito e posterior transmissão por via oral. Fonte: GUBLER et al., 2007.Modificado.

O período extrínseco de incubação é compreendido como sendo o tempo que o vírus leva para contaminar as glândulas salivares do vetor a partir do momento da infecção que leva de 8 a 14 dias, em geral (KUNO e CHANG, 2005; TJADEN et al., 2013). Após esse período, a fêmea permanece infectada por toda sua vida (6 a 8 semanas), podendo, então, transmitir o vírus ao hospedeiro vertebrado através da hematofagia (FUNASA, 2002; KUNO e CHANG, 2005), embora esse tempo de vida dependa das condições em que o mosquito se encontra, laboratorial ou na natureza (KUNO e CHANG, 2005).

Existem diferentes formas de transmissão viral entre os mosquitos e os hospedeiros vertebrados, elas podem acontecer de forma natural ou artificial. A transmissão horizontal natural é a mais comum e ocorre durante o repasto sanguíneo de uma fêmea infectada ao hospedeiro vertebrado (WEAVER e REISEN, 2010). Já a transmissão vertical ocorre quando a fêmea infectada passa o vírus para sua prole (WEAVER e REISEN, 2010). FERREIRA-DE-LIMA e LIMA-CAMARA (2018) demonstraram que existem poucos registros de transmissão vertical natural ao redor do mundo e argumentam a necessidade de mais estudos sobre o assunto devido à sua importância epidemiológica. Ainda há outra forma de transmissão horizontal que pode ser venérea, aquela em que o macho, infectado verticalmente, transmite o vírus diretamente para uma fêmea não infectada (WEAVER e REISEN, 2010).

Algumas espécies de mosquitos possuem hábitos acrodendrófilos, cuja tendência é de habitarem a copa das árvores e, dessa forma, coabitam com primata não humanos e aves no mesmo habitat (BRASIL, 2004b; KUNO e CHANG, 2005). O homem, quando adentra à mata, pode atrair o mosquito, que por sua vez desce até o nível do solo, ou mesmo já se encontra no nível do solo, e realiza o repasto sanguíneo (MORAIS e NATAL, 2017). Os mosquitos podem ter comportamento alimentar endofágico, quando se alimenta dentro de residências e estabelecimentos, ou exofágico, quando se alimenta fora desses locais, e, ainda, concomitantemente, podem ter comportamento endofílico, permanecendo dentro desses locais, ou exofílico, permanecendo fora (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Além do risco de infecção que o ser humano corre por estar no mesmo ambiente em que os mosquitos, esses últimos são fator de incômodo dentro e fora de residências e estabelecimentos, e esse fato pode piorar em situação de infestação excessiva e/ou quando a população humana se encontra próximo aos criadouros (MORAIS e NATAL, 2017; DAMBACH, 2018). Além disso, as picadas causam coceiras e até mesmo alergias (MORAIS

e NATAL, 2017). Uma vez que a relação entre patógeno, vetor e hospedeiro foi desvendada inúmeros estudos começaram de forma intensa no mundo todo (LANE, 1953; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002), os quais muitos estão relacionados com as arboviroses emergentes e reemergentes (GUBLER, 2001; KUNO e CHANG, 2005; WEAVER e REISEN, 2010; LIMA-CAMARA, 2016; DONALISIO et al., 2017; DAMBACH et al., 2018).

1.2. ARBOVÍRUS

Os arbovírus, de “*Arthropod Borne Virus*” são vírus transmitidos por artrópodes (GUBLER, 2001; LINDENBACH et al., 2007), têm distribuição mundial, estão em quase todos os ecossistemas onde os artrópodes estão presentes (GUBLER, 2001; SILVA e ANGERAMI, 2008). Possuem particularidades compartilhadas entre si, sem necessariamente ter relação filogenética, de modo que podem ser transmitidos aos vertebrados por artrópodes vetores hematófagos, sendo dependentes das inter-relações existentes entre eles e os hospedeiros invertebrados (vetor) e vertebrados (HARDY et al., 1983; KUHN, 2007; LINDENBACH et al., 2007). Essa inter-relação ocorre devido às frequentes mutações que esses vírus sofrem e à sua plasticidade genética (COFFEY et al., 2013). Não obstante, os vírus que mais acometem o ser humano são aqueles transmitidos pelos mosquitos, dos quais os gêneros *Aedes* e *Culex* são os mais relevantes neste quesito (WEAVER e REISEN, 2010).

Vírus como Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV), Febre Amarela (silvestre e urbana) e, principalmente, o da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) podem utilizar o ser humano como hospedeiro de amplificação e, eventualmente, causar epidemias urbanas (MACNAMARA, 1954; MARCHETTE et al., 1969; MCCRAE e KIRYA, 1982; LANCIOTTI et al., 2008; ZANLUCA et al., 2015; ZHANG et al., 2017). O vírus da dengue, por exemplo, tem exclusivamente o homem como hospedeiro reservatório de amplificação (WEAVER e REISEN, 2010). Os vírus pertencentes aos gêneros *Orthobunyavirus*, *Flavivirus* e *Alphavirus*, pertencentes às famílias Bunyaviridae, Flaviviridae e Togaviridae, respectivamente (KUNO e CHANG, 2005; GUBLER et al., 2007; KUHN, 2007; SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, 2007) têm grande importância epidemiológica e estão entre as viroses de alto impacto na saúde pública (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; GUBLER, 2001; SILVA e ANGERAMI, 2008).

São responsáveis por milhares de mortes durante diversos surtos e epidemias ao longo dos anos, ao redor do mundo, cujas regiões mais afetadas são, principalmente, as áreas tropicais e subtropicais, onde a maioria da população humana vive em países em desenvolvimento e, muitas vezes, se encontram em condições precárias (WHO, 1985; SILVA e ANGERAMI, 2008; WHO, 2017, 2018; PAHO/WHO, 2018). Os indivíduos infectados por arbovírus ficam bastante debilitados, tendo que se afastar de suas atividades temporariamente, fato que compromete a renda familiar, e pode até ir a óbito (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; GUBLER, 2001; TEICH et al., 2017).

1.2.1. Família Flaviviridae

Constituída de pequenos vírus encapsulados com genomas de RNA de fita positiva que varia de 9 a 13 kb (SIMMONDS et al., 2017) como os dos gêneros *Flavivirus*, *Hapecivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (LINDENBACH et al., 2017; SIMMONDS et al., 2017).

1.2.1.1 *Flavivirus*

O gênero se divide em quatro grupos: vírus de vertebrados, vírus específicos de insetos, vírus transmitidos por carrapatos e vírus transmitidos por mosquitos (GAUNT et al., 2001; KUNO e CHANG, 2005). Segundo o 9º Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus das siglas em inglês ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) (SIMMONDS et al., 2017), esse gênero é composto por mais de 50 espécies de arbovírus. A maioria dos *Flavivirus*, causadores de arboviroses, se mantém na natureza em ciclo enzoóticos por mosquitos vetores que têm aves e mamíferos como hospedeiros primários habituais (SIMMONDS et al., 2017). Os vírus de maior relevância para a saúde pública deste gênero, transmitidos por mosquitos, são: BSQV; CACV; DENV (sorotipos 1, 2, 3 e 4); IGPV; ILHV; JEV; ROCV; SLEV; WNV; YFV e ZIKV (GUBLER, 2001; GUBLER et al., 2007; SIMMONDS et al., 2017).

São vírus esféricos, envelopados e com formato icosaédrico, medindo 40-60 nanômetros (nm) de diâmetro (Figura 4A). O material genético, composto por RNA de fita simples, não segmentado, linear, de polaridade positiva e contendo em torno de 11 kilobases (kb), possuem uma única *Open Reading Frame* (ORF) que é uma sequência aberta composta por 10 genes que codificam três proteínas estruturais e sete não estruturais (BURKE e MONATH, 2001; FONSECA e FIGUEIREDO, 2005; LINDENBACH et al., 2007). As proteínas estruturais são:

proteína de membrana PrM (precursora da M), proteína E (do envelope) e proteína C (do capsídeo), que fazem parte da estrutura física do vírus, pois estão presentes no envelope lipídico que envolve o nucleocapsídeo proteico e desempenham importantes funções como ligação, penetração, fusão, empacotamento do genoma viral, além de serem alvos para anticorpos neutralizantes sintetizados pelo hospedeiro (BURKE e MONATH, 2001; LINDENBACH et al., 2007).

As proteínas não estruturais são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 4B), sintetizadas no interior da célula infectada desempenhando diferentes funções no ciclo replicativo, pois são responsáveis pela regulação e expressão viral, e é importante salientar que a proteína NS5 desempenha um papel fundamental na cópia e na reprodução dos vírus (BURKE e MONATH, 2001; LINDENBACH et al., 2007). A ORF é flanqueada pela extremidade 5' e 3', que contém cerca de 100 nucleotídeos (nt) e de 400 a 700 nt, respectivamente, e são regiões não codificantes (NCR), (BURKE e MONATH, 2001; FONSECA e FIGUEIREDO, 2005; LINDENBACH et al., 2007).

Figura 4. Representação morfológica (A) e genômica (B) do vírus da dengue (*Flavivirus*). A = Reconstrução crioeletrônica tridimensional da partícula viral imatura (esquerda) e madura (direita) com resolução, cujos triângulos delineiam um formato icosaédrico, com eixos de simetria 2, 3 e 5 vezes. B = Esquema da organização dos genomas dos *Flavivirus*, cujas proteínas virais estão representadas. NCR = região Não Codificante. Fonte: SIMMONDS, et al.; ICTV, 2017. Modificado.

O vírus é endocitado por vesículas que atuam sob ação de clatrininas (Figura 5-1) (LOZACH et al., 2005) e, assim, vai para o citoplasma, cuja queda do pH endossomal estimula a conformação estrutural da proteína E que provoca a fusão entre o envelope viral e membranas celulares que liberam o nucleocapsídeo. Após a decapsidação, o genoma (RNA) se encontra livre no citoplasma dando, então, início à tradução da poliproteína (com mais de 3.000 aminoácidos) (Figura 5-2) que é enviada para o retículo endoplasmático rugoso (RER). A poliproteína é clivada sob ação combinada de proteases tanto virais quanto do hospedeiro e, assim, com ação da RNA polimerase (NS5/NS3) ocorre a replicação, dando origem às proteínas virais (Figura 5-3). As proteínas NS1, prM e E vão no sentido lúmen do RER mantendo-se associadas à membrana e, concomitantemente, as outras proteínas não estruturais e a proteína C são liberadas no citoplasma celular (BURKE e MONATH, 2001; LINDENBACH et al., 2017). Tão logo a proteína C reconhece o genoma viral replicado pela RNA polimerase (NS5/NS3) já se forma uma proteína chamada ribonucleoproteína, que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas associadas ao RER. Em seguida, a partícula viral se forma por brotamento para dentro do lúmen do RER produzindo seu envelope (Figura 5-4) (BURKE e MONATH, 2001; LINDENBACH et al., 2017).

Figura 5. Representação esquemática do ciclo de vida do vírus. Em 1 observa-se a ligação entre as proteínas virais e receptores de superfície da célula do hospedeiro seguida de endocitose. Em 2 ocorre a tradução da poliproteína. Em 3 o material genético viral é produzido. Em 4 ocorre o envelopamento do genoma. Em 5 as partículas virais, aptas a infectar novas células, são liberadas. Fonte: SIMMONDS, et al., ICTV, 2017. Modificado.

Tão logo a proteína C reconhece o genoma viral replicado pela RNA polimerase (NS5/NS3) já se forma uma proteína chamada ribonucleoproteína, que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas associadas ao RER. Em seguida, a partícula viral se forma por brotamento para dentro do lúmen do RER produzindo seu envelope (Figura 5-4). Dessa forma, a partícula viral é levada em direção ao complexo de Golgi para que aconteça o processo de maturação que consiste na clivagem da proteína prM, formando a proteína M no envelope. Esse processo de maturação é finalizado quando se dá a separação da glicoproteína E do envelope para que a progênie seja liberada por exocitose (Figura 5-5). O ciclo de replicação chega ao final quando há síntese de novas partículas virais e o nucleocapsídeo é envelopado. Após um período de 3 horas de infecção as cópias de RNA viral podem ser identificadas (BURKE e MONATH, 2001; LINDENBACH et al., 2017).

1.2.2 Família Togaviridae

São vírus esféricos, de RNA envolvido por fitas simples positiva (KUHN, 2007). Composto por dois gêneros, *Alphavirus* com cerca de 40 espécies que causam doenças em animais humanos e não humanos, veiculados principalmente por vetores artrópodes e o *Rubivirus* com uma única espécie (vírus da rubéola) (KUHN, 2007).

1.2.2.1 *Alphavirus*

O gênero é dividido entre os vírus que causam erupções cutâneas e artrites (encontrados principalmente no velho mundo) e os que causam encefalites (encontrados principalmente no novo mundo) (KUHN, 2007). Vírus esféricos e envelopado, com, aproximadamente, 70 nm, de fita simples de RNA, polaridade positiva com 11,8 kb (KUHN, 2007). São 28 espécies de vírus incluídas neste gênero: Aura vírus (AURAV); vírus da Febre da Floresta de Barmah (BFV); Bebaru vírus (BEB); Cabassou vírus (CABV); CHIKV; EEEV; WEEV; VEEV; Everglades vírus (EVEV); Forte Morgan vírus (FMV); Getah vírus (GETV); Highlands - Terras Altas J vírus (HJV); Kyzylagach vírus (KYZV); vírus da Febre do Mayaro (MAYV); Middelburg vírus (MIDV); Mucambo vírus (MUCV); Ndumu vírus (NDUV); O'nyong-nyong vírus (ONNV); Pixuna vírus (PIXV); Rio Negro vírus (AG80V); vírus da Febre de Ross River (RRV); Salmonídeos vírus; Floresta de Semliki (SFV); vírus da Febre do Sindbis (SINV); vírus Southern Elephant Seal (SESV); Trocara vírus ; Una vírus (UNAV); vírus da Whataroa

(WHAV), sendo que o CHIKV, MAYV, EEEV, VEEV e WEEV são os mais relevantes (GRIFFIN, 2007; KUHN, 2007).

Os *alphavirus* já foram identificados em todos os continentes, inclusive na Antártica (GRIFFIN, 2007). O ciclo envolve, principalmente, mosquitos vetores e hospedeiros vertebrados que são reservatórios como aves e mamíferos, mas outros artrópodes hematófagos como piolhos e ácaros também podem veiculá-los (GRIFFIN, 2007; KUHN, 2007). É importante ressaltar que mamíferos de grande porte ou mesmo o ser humano são apenas hospedeiros acidentais, todavia apresentam significância na manutenção de epidemias (KUHN, 2007).

1.2.3 Família Bunyaviridae

Esses vírus recebem esse nome devido ao vírus *Bunyamwera* isolado de um paciente na Uganda, em meados do século XX (SILVA e ANGERAMI, 2008). São incompatíveis com os vírus já pré-estabelecidos nas famílias Togaviridae e Flaviviridae (SCHMALJOHN e NICHOL, 2001). A família foi bem estabelecida em 1975 e é composta por quatro gêneros de vírus que infectam os animais humanos e não humanos (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus*), na qual os *Orthobunyavirus* são importantes arbovírus do ponto de vista da saúde pública, na qual muitos desses são veiculados culicídeos (SCHMALJOHN e NICHOL, 2001). Esses vírus foram isolados em mosquitos do gênero *Aedes* em 1943 na Uganda e, ao longo do tempo, outros vírus foram descobertos e classificados dentro desta família (SCHMALJOHN e NICHOL, 2001).

1.2.3.1 *Orthobunyavirus*

Gênero que contém mais de 150 vírus, sendo a grande maioria transmitida por mosquitos, ainda são pouco estudados quando comparados aos *Flavivirus* e *Alphavirus* (SCHMALJOHN e NICHOL, 2001). Possuem ciclos de replicação em uma gama de hospedeiros vertebrados e, em geral, são veiculados pelos mosquitos do gênero *Aedes* (SCHMALJOHN e NICHOL, 2001). São esférico e envelopados, de 80 a 120 nm,

Após o descobrimento da família, muitos *Orthobunyavirus* foram associados a casos de doença febril na maior parte da África subsaariana e entre os anos de 1950 e 1960 vários foram isolados na América do Sul e Central. Alguns vírus mais significativos, devido aos surtos que

causaram ou ainda causam, porém de forma esporádica, são: vírus do Rift Valley, comum na África; Oropouche, comum nas Américas; vírus Cache Valley, isolado de mosquito em Utah, nos EUA, em 1956, ainda circula pelo país e, muito provavelmente, por outras regiões das Américas; vírus da lebre raquete de neve, isolado em uma lebre de mesmo nome que o vírus, em 1959, em Montana, sabe-se que esse vírus está disseminado pelo Alasca, Norte dos EUA e Canadá; vírus Akabane, isolado no Japão também em 1959, causa mal formação fetais em bovinos na Austrália, Coréia e Israel e África; vírus La Crosse, isolado do cérebro de uma criança que faleceu de encefalite, em 1960; e vírus Jamestown Canyon, isolado em mosquitos no Colorado em 1961 (SCHMALJOHN e NICHOL, 2001).

1.3 PRINCIPAIS ARBOVIROSES TRANSMITIDAS POR CULICÍDEOS

As arboviroses representam um grande desafio para a Saúde Pública (GUZMAN et al, 2013; LIMA-CAMARA, 2016; DONALISIO et al., 2017). Isso porque a maioria delas têm alto potencial de dispersão e se adaptam às novas áreas e hospedeiros (vertebrados e invertebrados) causando grandes epidemias que resultam em graves quadros clínicos (SILVA e ANGERAMI, 2008; DONALISIO et al., 2017) e prejuízos econômicos (CANALI et al., 2017; TEICH et al., 2017). Além disso, afetam diretamente e intensamente a qualidade de vida das pessoas (DONALISIO et al., 2017). No geral, as manifestações dos sintomas das arboviroses vão de febre leve e indefinida até síndromes febris articulares, hemorrágicas e neurológicas (DONALISIO et al., 2017). Normalmente, os quadros mais graves não são detectados em pequenos surtos ou casos isolados, mas sim em grandes epidemias, podendo apresentar aspectos irreversíveis na morbidade e mortalidade (KUNO e REISEN, 2005; DONALISIO et al., 2017).

No Brasil, até poucos anos atrás, somente arboviroses como dengue, febre amarela, Febre do Mayaro e Febre Oropouche tinham relevância em saúde pública, causando epidemias e surtos que perduram até os dias de hoje (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SILVA e ANGERAMI, 2008). Além disso, vale destacar o surto que o vírus do Rocio causou foi bastante relevante, na década de 1970 (LOPES et al., 1978). Entretanto, após a descoberta de arboviroses como Chikungunya e Zika, causadoras de epidemias e surtos recentes, ganharam atenção da Saúde Pública mundialmente (KUNO e CHANG, 2005; VAZEILLE et al., 2007; LANCIOTTI et al., 2008; ZANLUCA et al., 2015; LIMA-CAMARA et al., 2016; DONALISIO et al., 2017). Outras arboviroses, ao longo dos anos, vêm chamando atenção da Saúde Pública em determinadas regiões do planeta, como por exemplo, arboviroses causadas pelo vírus da

Encefalite Equina do Leste (Oriental) (EEEV) (WEAVER e REISEN, 2010; LOPES et al., 2014) e do Oeste (Ocidental) (WEEV) (WEAVER e REISEN, 2010), vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) (ROCCO et al., 2005; LOPES et al., 2014) e, também, o vírus Oeste do Nilo (WNV) (WEAVER e REISEN, 2010; LOPES et al., 2014).

1.3.1 Febre Amarela

Doença infecciosa febril aguda (BRASIL, 2017a) causada por um *Flavivirus* (GUBLER et al., 2007; LINDENBACH et al., 2007) considerada endêmica da região Amazônica (BRASIL, 2018c). Foi introduzida nas Américas por meio do tráfico de escravos vindos da África e pode ser considerada a doença ícone da história da saúde pública brasileira devido aos impactos que as das epidemias urbanas causaram (SILVA e ANGERAMI, 2008). A febre amarela provavelmente foi introduzida, no século XVII, primeiramente no Caribe e Sul dos EUA, afetando toda colônia europeia e, durante os séculos seguintes, ocorreram epidemias em praticamente todo o continente americano, desde o Norte dos EUA até a metade da Argentina (SILVA e ANGERAMI, 2008). No entanto, a primeira epidemia no Brasil, com as mesmas características da febre amarela, certamente ocorreu em Pernambuco, em 1685 que, provavelmente, veio da região do Golfo do México e, posteriormente alcançou Salvador, capital do Brasil na época (SILVA e ANGERAMI, 2008).

As maiores epidemias registradas no Brasil ocorreram durante o período colonial, em 1850, no Rio de Janeiro, pois surtos ao longo dos séculos XVII até XIX eram raros (SILVA e ANGERAMI, 2008). Após sucessivas epidemias, no início do século XX, os renomados pesquisadores científicos Emílio Ribas e Oswaldo Cruz, juntamente com forças políticas brasileiras e com apoio americano da Fundação Rockefeller, realizaram a Campanha de Combate à Febre Amarela (urbana), a qual previa o controle ou eliminação do vetor, o *Aedes aegypti* (oriundo da África). Esse mosquito cosmopolita, encontrado em regiões tropicais e subtropicais (BRASIL, 2007), já bem estabelecido em várias cidades brasileiras no início do século XX, é responsável pelo ciclo de transmissão urbano, na América (FORATTINI, 2002; SILVA e ANGERAMI, 2008). A campanha obteve sucesso, o vetor foi considerado erradicado e a febre amarela urbana foi controlada e eliminada do país, cujo último caso ocorreu em 1942, em Sena Madureira, no Acre (SILVA e ANGERAMI, 2008; BRASIL, 2017a). Em 2014/2015 houve expansão da epidemia de febre amarela silvestre do Norte do Brasil para as regiões leste e sul, onde em 2016 afetou o Centro-Oeste e, mais tarde, em 2017, afetou os estados do Sudeste, onde

foram 1.376 casos humanos registrados com 438 óbitos, além de 864 epizootias (BRASIL, 2018c), sendo a mais recente e a maior em décadas (FARIA et al., 2018).

Os mosquitos dos gêneros *Sabethes* e *Haemagogus* são os transmissores da febre amarela silvestre na América Latina, vetores que mantêm o vírus em circulação através do ciclo enzoótico em áreas de mata fechada, tendo primatas não humanos (PNH) como hospedeiros do mosquito e reservatórios do patógeno, principalmente os dos gêneros *Alouatta* ssp e *Callithrix* ssp. *Haemagogus leucocelaenus* é o principal vetor no Brasil (MUCCI et al., 2016). Entretanto, na África o vírus pode ser transmitido no ambiente silvestre por mosquitos do gênero *Aedes* (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; BRASIL, 2017a). O *Ae. aegypti* foi reintroduzido no Brasil na década de 1970 e se espalhou com bastante facilidade por todo o país, abrindo as portas para novos surtos e epidemias de febre amarela urbana (FORATTINI, 2002; SILVA e ANGERAMI, 2008).

Os sintomas surgem de 3-6 dias após a infecção, cujo início da febre é repentino, com calafrios, cefaleia, náuseas e vômitos, adinamia (BRASIL, 2017a). As formas clínicas de cerca de 90% dos casos se apresentam de forma benigna evoluindo para a cura, porém, 10% -15% dos casos manifestam quadros graves (SILVA e ANGERAMI, 2008) com febre alta, icterícia, hemorragia e, em alguns casos, choque e insuficiência de vários órgãos e dessas, cerca de 50% vão a óbito (BRASIL, 2017a). A melhor forma de prevenção é por meio de vacinação, existente há muitos anos no Brasil e no mundo (DONALISIO et al., 2017; BRASIL, 2017c). Até a Semana Epidemiológica (SE) 45, que compreende o período de julho/2018 a junho/2019, atualizado pela última vez em novembro de 2018, 1.079 epizootias em PNH foram notificadas, das quais 13 foram confirmadas e 259 estão em investigação (BRASIL, 2018a). Com relação aos casos humanos, foram notificados 271 casos, dentre eles um óbito foi confirmado no estado de São Paulo e ainda estão em investigação 120 casos (BRASIL, 2018c).

1.3.2 Dengue

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus* (GUBLER et al., 2007; LINDENBACH et al., 2007). Depois da febre amarela, a dengue foi a arbovirose que mais chamou atenção da Saúde Pública (SILVA e ANGERAMI, 2008). Doença de origem africana com quatro sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, descobertos a partir da década de 1940 (GUBLER, 1998). Vale ressaltar que a infecção por cada um desses sorotipos confere imunidade permanente contra futuras infecções pelo mesmo sorotipo, e não

contra os demais (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; GUBLER, 1998; SILVA e ANGERAMI, 2008; LOPES et al., 2014). Trata-se de uma doença bastante antiga, pois em uma enciclopédia médica da Dinastia Jin da China (265-420 d.C) há registros de uma doença com sintomas clínicos muito parecidos com os que a dengue apresenta (GUBLER, 1998). Embora seja relativamente uma doença benigna, a co-circulação dos sorotipos do vírus dengue podem ocorrer casos graves e aumentar o número de óbitos (SILVA e ANGERAMI, 2008).

Há relatos do século XVIII de surtos dessa doença na África, América do Norte, Ásia, Caribe e Golfo do México (GUBLER, 1998; SILVA e ANGERAMI, 2008). Epidemias ocorreram no final do século XVIII na Indonésia, Egito e cidades dos EUA e sua disseminação foi facilitada por meio do comércio e das grandes navegações da época (GUBLER, 2001; LINDENBACH et al., 2007). Acredita-se que, muito provavelmente, a dengue exista no Brasil desde o período colonial (MONDINI et al., 2007b; SILVA e ANGERAMI, 2008). Há relatos de ao menos uma epidemia no Paraná, Rio Grande do Sul em 1917 (MONDINI et al., 2007b) e Niterói, no Rio de Janeiro, em 1923 (SILVA e ANGERAMI, 2008), porém sem comprovação laboratorial (IOC/FIOCRUZ, 2018). Os sorotipos 3 e 4 foram isolados pela primeira vez em 1956, nas Filipinas (LINDEBACH et al., 2007). O *Ae. aegypti* é incriminado como principal vetor dessa doença na maior parte do mundo, inclusive no Brasil (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; LIMA-CAMARA et al., 2006; LIMA-CAMARA, 2016). Após a Campanha de Combate à Febre Amarela (urbana) comentada anteriormente, as ocorrências de casos de dengue desapareceram neste período no Brasil (SILVA e ANGERAMI, 2008). Com a reintrodução do *Ae. aegypti* no Brasil no início da década de 1970, a possibilidade de reintrodução da doença era relativamente alta (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; MONDINI et al., 2007b; SILVA e ANGERAMI, 2008).

Foi então que, em 1981, houve uma epidemia de dengue dos sorotipos 1 e 4 restrita em Roraima, provavelmente provenientes da Venezuela (SILVA e ANGERAMI, 2008) e, em 1982 foram comprovados laboratorialmente (IOC/FIOCRUZ, 2018). Em 1986, o DENV-1 foi isolado no Rio de Janeiro por meio de epidemias e se disseminou para várias regiões do país, a partir daí ocorreram surtos consecutivos com poucos casos graves e óbitos de norte a sul no Brasil, cuja circulação era exclusivamente do sorotipo 1 (SILVA e ANGERAMI, 2008). No entanto, também no Rio de Janeiro, no início da década de 1990, houve a introdução do sorotipo 2, com confirmação do primeiro caso de dengue hemorrágico por esse sorotipo (IOC/FIOCRUZ, 2018) e, então, em 1998 mais de 500 mil casos de dengue foram registrados (SILVA e ANGERAMI, 2008). O DENV-3 foi isolado no município de Nova Iguaçu, Rio de

Janeiro, em 2001 (IOC/FIOCRUZ, 2018). O ano de 2007 foi marcado pelo número bastante significativo de casos confirmados e óbitos, sendo mais de 500 mil casos (SILVA e ANGERAMI, 2008). Em 2010 o DENV-4 foi isolado em Roraima e Amazonas de casos detectados, no início de 2011 foi isolado no Pará e, mais tarde, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) detectou os primeiros casos no Rio de Janeiro (IOC/FIOCRUZ, 2018).

Atualmente, pelo menos 2,5 bilhões de pessoas, ao redor do mundo, vivem em risco de contrair a dengue, com 96 milhões de casos estimados por ano (WHO, 2017) com cerca de 15 mil óbitos (SILVA e ANGERAMI, 2008, WHO, 2017). Os fatores responsáveis pelo ressurgimento da dengue estão relacionados ao crescimento descontrolado e desorganizado das cidades, bem como o aumento do número de pessoas e, consequentemente, aumento do número de criadouros artificiais espalhados pela cidade (GUBLER, 1998; LIMA-CAMARA et al., 2006), alterações climáticas (ASAD e CARPENTER, 2018), introdução de novos genótipos, carência de saneamento básico e baixo nível socioeconômico (SILVA e ANGERAMI, 2008). Estes fatores, juntos, proporcionam condições ótimas para o estabelecimento do vírus nas cidades por meio de ciclos de transmissão urbana, os quais envolvem o homem e mosquitos antropofílicos como o *Ae. aegypti* (GUBLER, 1998; LINDENBACH et al., 2007; SILVA e ANGERAMI, 2008). O impacto econômico que essa doença causa é bastante significativo (GUBLER, 1998), aumentando cada vez mais o número de países com relatos de casos autóctones de dengue, cuja incidência mundial aumentou nesses últimos 30 anos (WHO, 2018).

Os quatro sorotipos do vírus não circulavam concomitantemente nas mesmas áreas, ainda que pudessem ser encontrados simultaneamente no mesmo continente (SILVA e ANGERAMI, 2008). A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou sintomática (BRASIL, 2016). Nessa última, ocorre uma doença sistêmica com amplo espectro clínico, que varia de formas oligossintomáticas até formas graves, que podem evoluir para óbito. Podem ocorrer três fases clínicas: febril, crítica e de recuperação. A febril (2-7 dias) com febre alta de início abrupto, cefaleia, adinamia, artralgias, dor reorbitária e exantema, estando esse último presente em 50% dos casos. Anorexia, náuseas, vômitos e até diarreia, que são menos comuns, também podem ocorrer (BRASIL, 2016; PAHO, 2018). A maioria dos pacientes se recuperam gradativamente após a fase febril, porém, alguns podem evoluir para a fase crítica da doença, cujo início se dá com a desfeverência da febre e aparecimento dos sinais de alarme (dor abdominal intensa, vômitos persistentes, sangramento de mucosa). As formas graves se manifestam com o choque causado pelo extravasamento de plasma, hemorragias grave e sinais de disfunção orgânica dos órgãos (BRASIL, 2016). Há uma vacina contra a dengue disponível

apenas na rede privada, a qual é usada em três doses com intervalo de um ano, podendo ser aplicada apenas em pessoas que já tiveram pelo menos uma infecção (BRASIL, 2017b).

Até a Semana Epidemiológica (SE) 52, que compreende o período de 31/12/2017 a 29/12/2018) de 2018 foram registrados 265.934 casos prováveis de dengue no Brasil, destes, 174.724 foram confirmados, sendo que a região Centro-Oeste apresentou os maiores números de casos prováveis (102.284), seguida pela região Nordeste (67.256 casos prováveis), Sudeste (75.421 casos prováveis), Norte (18.293 casos prováveis) e Sul (2.680 casos prováveis) (BRASIL, 2019). Foram 321 casos de dengue grave, 3.616 casos de dengue com sinais de alarme e 155 óbitos confirmados até a SE 52, no Brasil (BRASIL, 2019).

1.3.3 Zika

Doença aguda causada por um vírus da Zika (ZIKV) (BRASIL, 2019), do gênero *Flavivirus*, cuja principal forma de transmissão é através da picada do mosquito vetor (LIMA-CAMARA, 2016). Entretanto, a infecção por ZIKV pode ser adquirida por outros meios como perinatal (BESNERD et al., 2014), sexual (MUSSO et al., 2015), e transmissão vertical (FOY et al., 2011). Também existem sinais de partículas virais na urina por mais de 10 dias após o início da doença (GOURINAT et al., 2015).

Em 1947, durante uma investigação de febre amarela na floresta Zika, Uganda, o soro de um macaco *Rhesus* 766 febril (animal sentinela no Programa da Fundação Rockefeller voltada para pesquisas de Febre Amarela Silvestre) foi inoculado em camundongos, 10 dias após a inoculação foi isolado o ZIKV no cérebro desses camundongos. Foi a primeira vez que o ZIKV foi isolado (DICK et al., 1952). Em 1948, nesta mesma floresta, o ZIKV foi isolado em mosquitos da espécie *Aedes africanus* (MACNAMARA, 1954), entretanto, apesar de ser uma espécie abundante e ter ocorrido o isolamento de ZIKV nessa espécie, DICK et al. (1952) perceberam que esses mosquitos não se dirigiam aos macacos *Rhesus* 766 presos nas gaiolas e, então, ficaram na dúvida se *Aedes africanus* era realmente a espécie vetora da transmissão enzoótica (HAYES, 2009). Quase dez anos depois, em 1956, foi relatada a transmissão de ZIKV pelo *Ae. aegypti* por meio de alimentação artificial realizada em camundongos e em um macaco em laboratório (BOORMAN e PORTERFIELD, 1954). De 1951 a 1981 foi constatado que o vírus circulava somente na África e na Ásia (HAYES, 2009), durante esses 30 anos foram relatados por sorologia humana a infecção por ZIKV em outras partes da África e em países da Ásia (ROBIN et al., 1975; SALUZZO et al., 1981). Em 1968 e de 1971 a 1975, por meio de

um estudo, houve isolamentos virais de humanos na Nigéria, além da detecção de anticorpos neutralizante para o ZIKV em 40% das pessoas que participaram do estudo (MOORE et al., 1975; FAGBAMI, 1977).

Em 2007, ocorreu uma grande epidemia de Zika que acometeu grande parte da ilha de Yap, na Micronésia, no oceano Pacífico (HAYES, 2009). Durante essa epidemia, a espécie predominante foi *Aedes hensilii*, contudo não houve isolamento de ZIKV nesses mosquitos (HAYES, 2009). No final de 2013 o vírus atingiu a população da Polinésia Francesa, também localizada no oceano Pacífico, causando uma grande epidemia (BESNARD et al., 2014). Zhang et al. (2017), estimaram, através de um modelo epidêmico estocástico global, que a primeira introdução do ZIKV no Brasil ocorreu entre o mês de agosto de 2013 e abril de 2014 (ZHANG et al., 2017). O primeiro registro autóctone de Zika nas Américas foi feito em 2015 no nordeste do Brasil, quando pacientes com sintomas muito parecidos com os da dengue e da Chikungunya foram encaminhados para testes diagnóstico molecular e sorológico e, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), os resultados, confirmados pelo sequenciamento de DNA, revelaram que sete, dos oito pacientes, estavam infectados com ZIKV (ZANLUCA et al., 2015). Outros países em toda América Latina também relataram casos autóctones de ZIKV (Bolívia, Cuba, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, Haiti, México, Nicarágua, Paraguai, Peru e Venezuela) (ZHANG et al., 2017).

Estudos apontam que os mosquitos *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus* (oriundo da Ásia) têm sido implicados na transmissão de ZIKV. No Brasil, o principal vetor de ZIKV é o *Ae. aegypti* (LIMA-CAMARA, 2016), no entanto o *Ae. albopictus* é um vetor potencial nos países das Américas, bem como no Brasil (FERREIRA-DE-LIMA e LIMA-CAMARA, 2018). No Senegal, 13 espécies de mosquitos (machos e fêmeas) dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Mansonia*, foram detectadas com infecção natural por ZIKV e há grandes chances de serem potenciais vetoras do vírus (DIALLO et al., 2014). O ZIKV também foi isolado de *Ae. aegypti* na Malásia (MARCHETTE et al., 1969) e em outras espécies como *Aedes africanus*, *Aedes apicoargenteus*, *Aedes furcifer*, *Aedes luteocephalus*, e *Aedes vitattus* (MARCHETTE et al., 1969; MCCRAE e KIRYA, 1982).

Como poucos casos de Zika eram conhecidos até 2013, quando ocorreu a epidemia na Polinésia Francesa, a doença era considerada benigna, com sintomas leves, apesar de autolimitada. Entretanto, recentemente, alguns problemas adversos foram relacionados à infecção pelo ZIKV como microcefalia em recém-nascidos, chamada de Síndrome do Zika Congênito, óbitos de feto, encefalites e doenças neurológicas em adultos e Síndrome de

Guillain-Barré (OEHLER et al., 2014; DONALISIO et al., 2017). Até a Semana Epidemiológica (SE) 52, que compreende o período de 31/12/2017 a 29/12/2018) de 2018 foram registrados 8.680 casos prováveis de Zika no Brasil, destes, 3.984 foram confirmados, sendo que a região Sudeste apresentou os maiores números de casos prováveis (3.149), seguida pela região Nordeste (2.425 casos prováveis), Centro-Oeste (1.733 casos prováveis), Norte (1.326 casos prováveis) e Sul (47 casos prováveis) (BRASIL, 2019). Foram cinco óbitos por vírus Zika, Alagoas, Paraíba (2), São Paulo e Goiás, confirmados até a SE 52, no Brasil (BRASIL, 2019). Foram registrados 1.097 casos prováveis de gestantes com Zika, os quais 449 foram confirmados (BRASIL, 2019).

1.3.4 Febre do Nilo do Oeste

O vírus causador da febre do Nilo do Oeste (WNV) é um *Flavivirus* (LINDENBACH et al., 2007) isolado pela primeira vez no distrito de Wset Nile, na Uganda, em 1937. Alguns anos depois, houve surtos dessa doença em outros países africanos, bem como no Oriente Médio, Ásia e Europa, onde ficou restrita por um tempo (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). O WNV emergiu nas Américas em 1999 (MURRAY, et al., 2010; BRASIL, 2004a) através dos EUA, onde ocorreu um surto de encefalite em humanos e aves locais, concomitantemente (MURRAY, et al., 2010, 2011). O vírus foi considerado endêmico nos Estados Unidos (EUA) devido à rapidez de sua expansão pelo país (MURRAY, et al., 2010), pois de 1999 até 2005, foram registrados mais de 19 mil casos dessa arbovirose, desses, pouco mais de 8 mil casos foram neuroinvasivos com 771 óbitos (KRAMER et al., 2007), em 2009, 720 casos foram registrados, dos quais 32 óbitos (MEASON e PATERSON, 2014).

Desde sua entrada nas Américas, o vírus atingiu o Canadá e o México e, nos anos subsequentes, os países das Américas Central e do Sul (BRASIL, 2018a). Os indícios da circulação do WNV no Brasil apareceram em 2009, no Pantanal sul mato-grossense, quando o vírus foi isolado em cavalos (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). A emergência dessa arbovirose no Brasil foi relacionada às aves migratórias (LOPES et al., 2014). Em 2014, PAUVOLID-CORRÊA et al., (2014) detectaram mais cavalos infectados com WNV. O primeiro caso de humano infectado com o WNV ocorreu no Piauí (LIMA-CAMARA, 2016; BRASIL, 2018a). Em abril de 2018, foram confirmadas epizootias de equídeos no Espírito Santo apresentando manifestações neurológicas (BRASIL, 2018a).

O ciclo do WNV é sustentado na natureza por mosquitos e pelas aves, hospedeiros reservatórios, entretanto, pode acometer, acidentalmente, o ser humano e outros mamíferos, principalmente os equinos (BRASIL, 2004a). Como não há vetor único específico, as características como ornitofilia, antropofilia e abundância atuam como fatores determinantes na definição do transmissor na área, sendo assim, podem ser mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (BRASIL, 2004a). Mosquitos desses dois últimos gêneros já foram isolados com WNV na África, Europa e EUA (MURRAY, et al., 2010). As aves migratórias possuem relevância na disseminação do WNV pelo mundo (BRASIL, 2004a).

Os sintomas consistem em febre, náuseas e vômitos, cefaleia, fadiga, 80% das pessoas infectadas são assintomáticas (MURRAY, et al., 2011; LOPES et al., 2014). Apesar de, na maioria dos casos, a recuperação ser completa, menos de 1% dos pacientes infectados, principalmente idosos e imunossuprimidos, podem desenvolver a forma mais grave da doença, com problemas neurológicos, meningite e encefalite, além de poder ir à óbito (MURRAY, et al., 2011; SEJVAR, 2014). Segundo a última atualização do Monitoramento da Febre do Nilo Ocidental, Brasil e Espírito Santo 2018 (BRASIL, 2018a), realizada em agosto de 2018, o último caso humano ocorreu em 2014, e as últimas epizootias detectadas ocorreram em 2018, no Espírito Santo.

1.3.5 Encefalite de Saint Louis

O vírus (SLEV) pertence ao gênero *Flavivirus* (LINDENBACH, 2007). Está presente em toda América (SILVA e ANGERAMI, 2008; LOPES et al., 2014). Em 1933, em Saint Louis, Missouri, EUA, ocorreu uma epidemia que matou cerca de 10 mil pessoas (MONATH, 1980). Depois dessa epidemia, houve outras em diversos locais dos EUA, ao longo dos anos subsequentes (LOPES et al., 2014). No Brasil, o primeiro isolamento viral de SLEV foi em 1960 (SILVA e ANGERAMI, 2008) em mosquitos *Sabethes belisariori* coletados na região Norte (LOPES et al., 2014). Em Belém, até 1978 o vírus foi isolado do sangue de dois pacientes (PINHEIRO et al., 1981). Em 2004, na cidade de São Pedro, estado de São Paulo, o SLEV foi isolado de um paciente com suspeita de dengue (ROCCO et al., 2005). Em 2006, ocorreu o primeiro surto de SLEV no Brasil, na cidade de São José do Rio Preto, também estado de São Paulo, do qual 14 casos humanos foram positivos para SLEV (MONDINI et al., 2007a). No entanto, uma epidemia de DENV-3 ocorreu simultaneamente (MONDINI et al., 2007a) e um paciente foi diagnosticado com co-infecção SLEV e DENV-3 (MONDINI et al., 2007b).

Em 2008, um caso de SLEV em humano foi reportado em Ribeirão Preto, em São Paulo (MAIA et al., 2014). Embora surtos causados pelo SLEV sejam raros, anticorpos para SLEV foram detectados em 5% das populações das regiões Norte e Sudeste do Brasil (MONDINI et al., 2007a).

Os vetores desse arbovírus são principalmente os mosquitos do gênero *Culex*, nos EUA são o *Cx. tarsalis* e o *Cx. pipiens* (MALEAN, 1980). A espécie *Psorophora ferox* já foi encontrada infectada naturalmente com o SLEV, em Trinidad (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Marupiais, PNH e aves migratórias são os principais reservatórios do SLEV, sendo essas últimas responsáveis pela disseminação do vírus pelo continente (LOPES et al., 2014). Os sintomas consistem em febre, cefaleia, mialgia, prostração e, principalmente, um quadro neurológico variável, como alterações de equilíbrio, crises convulsivas e confusão mental (SILVA e ANGERAMI, 2008) que podem levar a óbito 20% dos casos (LOPES et al., 2014). Ainda não existe tratamento específico (SILVA e ANGERAMI, 2008).

1.3.4 Febre do Chikungunya

A palavra “Chikungunya” tem origem no dialeto africano “Makonde”, do Norte de Moçambique e Sudeste da Tanzânia, que significa “aquele que se contorce”, referente à postura adotada pelo paciente infectado devido às dores nas articulações (GRIFFIN, 2007). O vírus da febre do Chikungunya (CHIKV) pertence ao gênero *Alpavirus* (GRIFFIN, 2007). Isolado pela primeira vez em soro de humano, em 1953, durante um surto de doença febril na Tanzânia, suspeitando-se de dengue, investigações revelaram um novo arbovírus, o CHIKV, cujas descrições dos sintomas da doença sugere que o CHIKV está presente no continente africano e no sudeste asiático desde 1779 (ROSS, 1956; MEASON e PATERSON, 2014). Os primeiros surtos de Chikungunya ocorreram em 1952, no Zimbábue, e partir de 1960 até 2003 vírus causou epidemias intermitentes no Sudeste asiático e, na África, causou outros surtos na Nigéria, em 1969, tornando-se endêmico a partir de 1980 em diversos países do continente africano (MEASON e PATERSON, 2014; WAHID et al., 2017).

A maior epidemia de Chikungunya, até o momento, ocorreu na ilha francesa de La Reunión, no oceano Índico, com mais de 240 mil casos e 203 óbitos (KUCHARZ e CEBULA-BRYSKA, 2012; BURT et al., 2012). Antes de 1995 a febre do Chikungunya não era comum na América, entretanto, 109 casos ocorreram desse ano até 2009 (WAHID et al., 2017). A partir de 2006, casos não autóctones de CHIKV foram detectados nos EUA, com média anual de 28 pessoas (CDC, 2018). Em 2007, houve epidemias na Índia e em outros países do sudeste

asiático e no continente europeu, onde a França registrou o primeiro caso importado do vírus e a província italiana de Ravenna confirmou 205 casos, dentre eles casos autóctones (KUCHARZ e CEBULA-BYRSKA, 2012; WHO, 2016; WAHID et al., 2017). Em 2010, o Brasil confirmou o primeiro caso importado no Rio de Janeiro, de Sumatra (WAHID et al., 2017). A partir de 2013, após ocorrência de casos na Ilha de São Martinho, no Caribe, o vírus atingiu 17 países e, em pouco tempo, foi identificada transmissão autóctone em mais de 40 países das Américas (WAHID et al., 2017). Ainda em 2013, um único caso foi confirmado na Arábia Saudita e 14 casos foram confirmados no Japão, sendo um por transmissão autóctone em um viajante que retornou de Cuba e um caso importado da Índia (WAHID, et al., 2017).

O primeiro registro autóctone no Brasil foi em 2014, em Oiapoque, no Amapá e, até 2016, os estados do Amapá, Bahia e Pernambuco foram os que mais notificaram casos de Chikungunya (LIMA-CAMARA, 2016). Nesse mesmo ano, 12 casos autóctones foram identificados na França (WHO, 2016; WAHID, et al., 2017). No final de 2014, os EUA registraram transmissões autóctones na Flórida (12 casos), Miami, e Texas (um caso, em 2015), além de novos registros em seus territórios caribenhos como Porto Rico, Ilhas Virgens e Samoa (totalizando 4.659 casos) (WAHID, et al., 2017, CDC, 2018). No Brasil, em 2015, 149 casos foram confirmados (WAHID et al., 2017). Em 2016, foram 3394 casos confirmados no Brasil (WAHID et al., 2017). Ainda em 2016, casos importados de Chikungunya foram relatados em 38 estados norte-americanos e 180 casos autóctones foram confirmados no Caribe (CDC, 2018). Em 2017, 39 casos locais foram registrados em Porto Rico (CDC, 2018) e, até 2018, muitos países registraram casos autóctones de Chikungunya (WAHID et al., 2017; CDC, 2018). Na África, os vetores silvestres são do gênero *Aedes*, dos quais o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* não estão inclusos, estão envolvidos na transmissão do CHIKV, pois o ciclo ocorre em áreas com bastante vegetação com presença de hospedeiros PNH (MEASON e PATERSON, 2014). Todavia, no Gabão, bem como na Europa foi demonstrado que o *Ae. albopictus* teve participação na transmissão epidemiológica de Chikungunya (MEASON e PATERSON, 2014). Na Ásia, entretanto, o ciclo é correlacionado com o *Ae. aegypti* e o ser humano, geralmente (LIMA-CAMARA et al., 2006; BURT et al., 2012).

O *Ae. albopictus* ocorre em pelos menos 20 países europeus (WAHID et al., 2017). É importante salientar que essa espécie está presente em áreas rurais e no peridomicílio, pois se refugiam em áreas de mata (LIMA-CAMARA et al., 2006). Devido à presença do *Ae. albopictus* em regiões temperadas, como a Europa, essas áreas podem sofrer futuros surtos e epidemias dessa arbovirose com potencial epidêmico e dispersão global (MEASON e

PATERSON, 2014; DONALÍSIO et al., 2017; WAHID et al., 2017). Os sintomas são febre alta, cefaleia, mialgia, exantema, náuseas e vômitos e, como característica principal dessa doença, o paciente sente fortes artralgias (KUCCHARZ e CEBULA-BYRSKA, 2012). Até a Semana Epidemiológica (SE) 52, do período de 31/12/2017 a 29/12/2018 foram registrados 87.687 casos prováveis de febre de Chikungunya no Brasil, destes, 174.724 foram confirmados, sendo que a região Sudeste apresentou os maiores números de casos prováveis (52.966), seguida pela região Centro-Oeste (13.862 casos prováveis), Nordeste (11.287 casos prováveis), Norte (9.315 casos prováveis) e Sul (257 casos prováveis) (BRASIL, 2019). Foram 39 óbitos confirmados por chikungunya e 42 que ainda estão sendo investigados e podem ser confirmados, até a SE 52, no Brasil (BRASIL, 2019).

1.3.5 Febre do Mayaro

O vírus Mayaro (MAYV), gênero *Alphavirus*, foi isolado pela primeira vez em humanos febris em áreas de florestas em Trinidad, em 1954 (WEAVER e REISEN, 2010; LOPES, et al., 2014; BRASIL, 2018b). O primeiro registro no Brasil foi em 1955, em Belém, no Pará. Até os dias atuais, casos esporádicos ou surtos localizados são registrados em estados da região Norte, na região amazônica e Centro-oeste e outros locais das Américas do Sul (WEAVER e REISEN, 2010; BRASIL, 2018b). Recentemente transmissões localizadas desse vírus ocorreram em municípios de Goiás, Pará e Tocantins, entre os anos de 2014 e 2016 (WEAVER e REISEN, 2010; BRASIL, 2018b). Esse vírus foi isolado em lagartos, PNH e aves migratórias nos EUA, bem como anticorpos já foram detectados em alguns mamíferos (preguiças, tamanduás, tatus, marsupiais, roedores e alguns carnívoros) (BRASIL, 2018b). O MAYV é transmitido por mosquitos silvestres do gênero *Haemagogus*, principalmente *Haemagogus janthinomys*, encontrados em áreas de matas fechadas próximos às margens de rios, tendo mamíferos como principais hospedeiros vertebrados (LOPES et al., 2014; BRASIL, 2018b).

É uma zoonose silvestre endêmica da região amazônica (BRASIL, 2018b). Quando o homem invade o ambiente natural no período de atividade dos mosquitos, diurno, torna-se hospedeiro acidental (LOPES et al., 2014, BRASIL, 2018b). Apesar de não haver indicativos de que ocorra transmissão sustentada (DONALÍSIO et al., 2017), existem evidências que comprovam a capacidade que o vírus tem de se adaptar a ciclos de transmissão alternativo entre aves e ser humano (LOPES et al., 2014). Trata-se de uma doença com quadro indistinguível,

debilitante com erupção cutânea e artralgia (WEARVER e REISEN, 2010). Os sintomas como artralgias, exantema, cefaleia e febre iniciam-se de 1-2 dias após a picada do mosquito e podem durar meses (LOPES et al., 2014; BRASIL, 2018b). Não existem tratamentos específicos e os sintomas desaparecem e o paciente se recupera da febre do Mayaro entre uma ou duas semanas, contudo o vírus pode desenvolver complicações neurológicas causando encefalites e Síndrome de Guillain Barré, em alguns casos (BRASIL, 2018b). A infecção do MAYV não é fatal como a Dengue, por exemplo, porém as infecções primárias são extremamente debilitantes por causa da artralgia, ocasionando em absenteísmo e, consequente, perda da produtividade (WEAVER e REISEN, 2010).

1.3.6 Oropouche

O vírus Oropouche (OROV), um dos mais importantes do gênero *Orthobunyavirus* (NUNES et al., 2005; SCHMALJOHN e NICHOL, 2001), é transmitido por mosquitos *Aedes serratus* e *Culex quinquefasciatus* (SILVA e ANGERAMI, 2008). Isolado pela primeira vez em 1955, em Trinidad, do sangue de um humano febril em um local em que a espécie *Coquillettidia venezuelensis* ocorre em abundância (NUNES et al. 2005). Essa espécie já foi encontrada infectada naturalmente por OROV (FORATTINI, 1965; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). No Brasil, o OROV foi isolado pela primeira vez de uma preguiça capturada em uma área verde, próxima à construção da Rodovia Belém-Brasília, em 1960, local com abundância de *Aedes serratus* (NUNES et al., 2005; SILVA e ANGERAMI, 2008). O vetor primário desse vírus é maruin, *Culicoides paraenses* (Diptera: Ceratopoginidae), responsável pelas epidemias rurais que se alastram por vilas e cidades, enquanto que o *Culex quinquefasciatus*, considerado vetor secundário no Pará, é responsável pelas epidemias urbanas (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SCHMALJOHN e NICHOL, 2001). Como *Culicoides paraenses* é abundante em todo o Brasil, existe a possibilidade do OROV se disseminar por todo país (SILVA e ANGERAMI, 2008).

O OROV já infectou mais de meio milhão de pessoas nas Américas Central e do Sul, especificamente nas áreas tropicais e subtropicais (NUNES et al., 2005). Há uma estimativa de que, nos últimos 50 anos, houve epidemias que totalizaram 500 mil casos de infecção por esse vírus, e a região mais acometida é a Amazônica central (MOURÃO et al. 2009, 2012). A presença do vírus foi relatada no Norte do Pará, com surtos em Belém, entre 1961 e 1980 e, de 1980 a 2004, o vírus atingiu os estados do Amazonas, Amapá, Acre, Maranhão, Rondônia,

Tocantins (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; NUNES et al. 2005; MOURÃO et al., 2009, 2012). Nos anos 2000, em Minas Gerais, foi isolada uma cepa do vírus em macaco (*Callithrix* sp.) (NUNES et al., 2005). As manifestações clínicas são leves e autolimitadas, os pacientes se recuperam em poucos dias (MOURÃO et al., 2009). Porém, casos graves da doença podem ocorrer devido à longa distância em que se encontram os serviços de cuidado à saúde, às dificuldades com transportes da amostra e à falta de diagnóstico específico, pois essa doença se manifesta de modo muito parecida com outras arboviroses e não existem tratamentos específicos (MOURÃO et al., 2009).

1.4 MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica abrange a costa Leste, Sudeste e Sul do Brasil (BRASIL, 2010). É um bioma considerado *hotspot* devido à sua vasta biodiversidade (SILVA, 2017). Atualmente, os remanescentes de Mata Atlântica de vegetação nativa ocupam apenas 27% de toda área original, cuja distribuição não é uniforme e as áreas maiores e bem preservadas não chegam a 8% de todo território (BRASIL, 2010). Esses remanescentes de mata correspondem às Unidades de Conservação (UC's) e, também, a parques urbanos (BRASIL, 2010; SÃO PAULO, 2019 a,b). As UC's são territórios naturais importantes na manutenção do equilíbrio ecológico, podendo ser de proteção integral ou de uso sustentável (SÃO PAULO, 2019a), criadas pelo Poder Público e constituídas em âmbito federal, estadual e municipal. Elas são reguladas pela Lei N° 9.985, de 2000 que estabelece o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC) (SÃO PAULO, 2019a).

1.4.1 Unidades de Conservação na Metrópole Paulistana

A maioria das metrópoles brasileiras estão situadas em região de Mata Atlântica (SILVA, 2017; MORAIS E NATAL, 2017;), com cerca de 123 milhões de pessoas. O estado de São Paulo está entre os Estados que possuem as maiores extensões desse bioma (SILVA, 2017). A região metropolitana de São Paulo (a Grande São Paulo) concentra 39 municípios e está inserida em área de Mata Atlântica que reúne fragmentos de diversos tamanhos espalhados pela região (BRASIL, 2010; EMPLASA, 2018). A APA Capivari-Monos, na região Sul do município de São Paulo e o Parque Estadual da Cantareira, na região Norte do município de São Paulo abrangendo mais três municípios (Caieiras, Guarulhos e Mairiporã), são UC's de uso sustentável, com resquícios de Mata em meio à malha urbana da grande São Paulo (MONTES,

2005; SÃO PAULO, 2009, 2011, 2012; DUARTE et al., 2013). Essas áreas verdes são de funcionalidade para a população humana servindo como ambiente de lazer, prática de esportes, recreação, ecoturismo, dentre outras atividades (WHATELY et al., 2008; SÃO PAULO, 2009, 2011, 2012). Além disso, desempenham papel fundamental na preservação da biodiversidade e dos recursos naturais (SÃO PAULO, 2009; 2011, 2012).

Entretanto, estudos de levantamento de fauna de culicídeos realizados em remanescentes de Mata Atlântica, no município de São Paulo, demonstram que essas áreas verdes possuem condições favoráveis para a proliferação e abrigo de diversas espécies de mosquitos causadores de incômodos, incluindo espécies de importância médica como *Anopheles cruzii* (transmissor de malária autóctone de Mata Atlântica), *Ae. Aegypti* (transmissor do vírus da febre amarela silvestre, na África e urbana nas Américas, dos quatro sorotipos do vírus da dengue), *Ae. albopictus* (vetor potencial dos quatro sorotipos do vírus da dengue, Chikungunya e Zika na América), *Haemagogus leucocelaenus* (vetor do vírus da febre amarela silvestre na América), dentre outras (URBINATTI et al., 2001; MONTES, 2005; RIBEIRO et al., 2012; DUARTE et al., 2013; MEDEIROS-DE-SOUSA, 2013, 2015, 2016; PAULA et al., 2015; CARVALHO et al., 2014, 2017; CERETTI-JÚNIOR et al., 2015; MORAIS e NATAL, 2017; HEINISCH, 2019). Embora a fauna de culicídeos que circulam no município de São Paulo sejam mais conhecidas atualmente, ainda são escassas as informações a respeito da fauna de mosquitos presentes em Unidades de Conservação como a APA Capivari-Monos e o Parque Estadual da Cantareira, inseridos na região metropolinana de São Paulo. Nessa primeira há histórico de malária autóctone (DUARTE et al., 2013) e de dengue, sendo que alguns casos foram autóctones (RIBEIRO et al., 2012). Na segunda, MAZZEI et al., (2009) ressaltam que as principais arboviroses de importância para a região do Parque Estadual da Cantareira são Dengue, Malária e febre amarela silvestre.

Se levado em conta a população que vive no município de São Paulo, esse número chega a 12.176.866 de pessoas, se somado às populações residentes nos municípios de Caieiras, Guarulhos e Mairiporã, esse número é de 13.741.268 pessoas (EMPLASA, 2019a). Logo, são milhões de pessoas que correm risco de infecção por algum *Flavivirus* através da picada de mosquitos, principalmente àquelas que moram, estudam ou trabalham próximas dessas UC's e Parques Urbanos, além de viajantes e turistas que as visitam, importando ou exportando esse vírus. Assim, essas áreas verdes possuem alto potencial na disseminação de arbovírus uma vez que refugiam espécies de hospedeiros reservatórios e de culicídeos vetoras. Portanto, o estudo da fauna de culicídeos que circulam nessas áreas, inseridas na região metropolitana de São

Paulo, é indispensável em virtude do papel que esses mosquitos desempenham na transmissão de patógenos causadores de doenças aos vertebrados humanos e não humanos, por meio do contato direto entre mosquitos e o homem, visto que esse último pode se envolver em ciclos enzoóticos (MONTES, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer a fauna de culicídeos e investigar a infecção natural por *Flavivirus* nos culicídeos coletados em duas Unidades de Conservação da Mata Atlântica, na cidade de São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de *Flavivirus* conhecidos ou pouco comuns nos mosquitos coletados.
- Identificar as espécies de culicídeos presentes em cada uma das áreas de estudo.
- Relacionar a variedade, a quantidade e identidade dos *Flavivirus* detectados com os padrões de riqueza, abundância e diversidade das assembleias de mosquitos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDO

As áreas de estudo estão localizadas principalmente no município de São Paulo na região metropolitana de São Paulo, no estado de São Paulo (Figura 6). No extremo norte do município está o Parque Estadual da Cantareira (PEC), com área de borda no Bairro da Vila Rosa, e ao extremo sul da Zona Sul está a Área de Proteção Ambiental (APA) Capivari-Monos, Subdistrito de Parelheiros.

Figura 6. Mapa do Brasil com realce do estado de São Paulo (esquerda) e o município de São Paulo em maior destaque (direita). A localidade de cada ponto de coleta está marcada com pontos vermelhos no mapa.

A maior parte do Parque Estadual da Cantareira está inserida no município de São Paulo, porém se estende a outros municípios como Caieiras, Mairiporã e Guarulhos, fronteiros ao município de São Paulo. É importante ressaltar que um dos pontos de coleta de mosquitos do Parque Estadual da Cantareira está inserido no município de Mairiporã, próximo aos limites com o município de São Paulo. Na Figura 6 é possível observar as localizações exatas dos pontos de coletas de ambas as áreas de estudos marcados em vermelho. Já os limites do Parque

Estadual da Cantareira, assim como os da APA Capivari-Monos, podem ser examinados na Figura 7.

Figura 7. Mapa do município de São Paulo de acordo com a urbanização (cinza), cobertura vegetal/capoeiras e matas (verde) e reservatórios d'água (azul) com limite do Parque Estadual da Cantareira (contorno preto) APA Capivari-Monos (contorno laranja) e locais de estudo (retângulo vermelho). Fontes: Área urbanizada: Atlas Ambiental do MPS; cobertura vegetal: SIFESP-IF/SMA (2002).

3. 1.1 Caracterização das Áreas de Estudo

- APA Capivari-Monos: é uma UC de uso sustentável com área de 251 km², situada a 60 km do centro da cidade de São Paulo, abriga relevantes remanescentes de Mata Atlântica, além de abranger 1/6 da área de todo município faz fronteira com o Parque da Serra do Mar (Figura 8) e, também, está inserida na Reserva da Biosfera do Cinturão Verde de São Paulo (SÃO PAULO, 2012). O distrito de Engenheiro Marsilac está inserido dentro da área da APA e possui por volta de 10 mil habitantes, com densidade demográfica de aproximadamente 41 habitantes por Km², cuja população é de baixa renda e a maioria vive em núcleos rurais (SÃO PAULO, 2011).

Por fazer fronteira com a Serra do Mar, ocupa os primeiros morros e vertentes oceânicos próximos à crista da Serra do Mar, com altitudes que variam de 740 a 800 metros acima do nível do mar (SÃO PAULO, 2011). O clima é do tipo Tropical Oceânico Superúmido da fachada Oriental do Planalto Atlântico, mesoclima de morros serras e, também, escarpas do Alto Capivari-Monos, com temperaturas médias anuais de 19,3 a 19,6°C, segundo a classificação dinâmica de TARIFA e ARMANI (2001). Trata-se de uma área rica em biodiversidade, com cerca de 780 espécies vegetais no qual o tipo de vegetação original é formado por floresta ombrófila densa montana, representada por remanescentes de Mata Atlântica com variados graus de conservação encontrados desde áreas de regeneração datadas da década de 1950 até áreas recentemente degradadas por causa da expansão rural e, principalmente, urbana, há, também, espécies exóticas dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (SÃO PAULO, 2011). Existem por volta de 364 espécies animais, incluindo espécies emblemáticas como a anta (*Tapirus terrestris*), o mono-carvoeiro (*Brachyteles arachnoides*) e a onça-parda (*Puma concolor capricorniensis*), além de muitas aves, répteis e anfíbios, das quais 113 são endêmicas da Mata Atlântica, entretanto, não há informações a respeito da fauna de invertebrados (SÃO PAULO, 2011).

Na região da APA, existem dois rios que são de grande importância, o rio Capivari e o rio dos Monos, pois além de formarem o nome da APA, são recursos naturais utilizados no abastecimento das bacias Billings e Guarapiranga e mananciais estratégicos para fornecimento de água para a região metropolitana de São Paulo (SÃO PAULO, 2011). O rio Capivari nasce na Serra do Mar e desagua em um importante afluente do rio Itanhaém e o rio dos Monos, que recebe este nome devido à presença do primata mono-carvoeiro ou muriqui (*Brachyteles arachnoides*) que ficava em suas margens, atualmente ausente na região, é o principal afluente do rio Capivari e, juntos, estes dois rios formam o nome da primeira APA municipal da cidade (SÃO PAULO, 2011). É uma região bastante requisitada pelo ecoturismo devido, principalmente, às cachoeiras e rios de águas cristalinas (SÃO PAULO, 2012) (Anexo 1), porém o turismo, juntamente com a urbanização na região, vem causando impactos negativos à APA.

Figura 8. Tamanho da Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos com relação ao tamanho do município de São Paulo (direita). Localização da APA Capivari-Monos os municípios mostrando os municípios que fazem fronteira e, também, a fronteira com o Parque Estadual da Serra do Mar. Fonte: PMSP, 2007.

Quatro pontos de coleta foram selecionados na APA:

- Borracharia: aglomeração urbana no centro de Marsilac circundada pela mata e próximo à linha de ferro Mairinque-Santos. As coletas foram realizadas em um local de mata atrás de uma borracharia (23° 54.395'S 46° 42.486'O) (Figura 10).
- Cachoeira: propriedade particular adjacente à mata e próxima a cachoeira com área de visitação com fluxo elevado de pessoas (23° 56.378'S 46° 41.659'O) (Figura 11).
- Embura: aglomeração urbana circundada por propriedades particulares como chácaras, pequenos sítios e pela mata da APA Capivari-Monos, localizado próximo à Rua Catharina Guilger Reimberg, bairro Jardim Embura. As coletas foram realizadas em um local de mata muito próximo das residências (23° 53.036'S 46° 44.485'O) (Figura 12).
- Siloé: localizado próximo ao núcleo urbano de Marsilac, constitui área de transição entre a área urbana e rural circundada pela mata, próximo ao Sítio Águas de Siloé. (23° 54.556'S 46° 42.167'O) (Figura 10).

- Parque Estadual da Cantareira (PEC): é um remanescente de Mata Atlântica com área de 7.916,52 hectares, inserido dentro da região metropolitana de São Paulo abrangendo os municípios de Caieiras, Guarulhos e Mairiporã (Figura 9), administrado pelo Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, o parque é dividido em quatro núcleos: Engordador, Cabuçu, Pedra Grande e Águas Claras, sendo contíguo ao Horto Florestal Alberto

Löefgren, também parque estadual (SÃO PAULO, 2009). As altitudes do parque variam entre 755 a 1215 metros acima do nível do mar (SÃO PAULO, 2009), segundo a classificação dinâmica de Tarifa e Armani (2001) o clima do parque é do tipo Tropical Úmido Serrano, mesoclima Cantareira-Jaraguá, cuja temperatura média anual varia de 17,7 a 19,3°C e a pluviosidade é de 1.400 a 1590 mm.

Trata-se de uma área protegida que tem grande importância biológica, com vegetação típica de Mata Atlântica, ricas em bromélias, mas também com espécies exóticas introduzidas como bambu e pinus (MONTES 2005; SÃO PAULO, 2009) (Anexo 2). Segundo o Plano de Manejo do Parque Estadual da Cantareira (SÃO PAULO, 2009), há uma estimativa de 866 espécies de vertebrados 388 de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes e 478 espécies de invertebrados como abelhas, aracnídeos, formigas e culicídeos (SÃO PAULO, 2009). No caso dos culicídeos, o Plano de Manejo do Parque Estadual da Cantareira aponta 22 espécies presentes no PEC, dados provenientes de MONTES et al., (2005) em estudo realizado no parque. Recentemente houve um surto de febre amarela na região onde o parque está inserido (BRASIL, 2017c).

Figura 9. Localização de Parque Estadual da Cantareira nos municípios de Caieiras, Mairiporã, Guarulhos e São Paulo, cuja maior parte se encontra no município de São Paulo. Fonte: SÃO PAULO, 2009 (Instituto Florestal (IF), 2004; IBGE, 2005). Projeção: UTM Fuso 23° Datum SAD 69. Org. Cartogr.: Everton Talpo – março 2009).

Três pontos de coleta foram selecionados no PEC:

- Pedra Grande: local onde está situada a sede administrativa do PEC, no interior do Núcleo Pedra Grande, área com árvores esparsas e residências de funcionários do parque rodeadas pela mata, possui alto número de visitantes por causa das trilhas ($23^{\circ}26'51.90''S$ $46^{\circ}38'5.46''O$) (Figura 13).
- Trilha da Bica (Rua Frutuoso Viana): área limite entre o PEC, no Núcleo Pedra Grande, e moradias nas imediações do Bairro Vila Rosa na cidade de São Paulo ($23^{\circ} 26.945'S$ $46^{\circ} 37.800'O$) (Figura 14).
- Trilha do Pinheirinho: floresta em estágio avançado de regeneração situada próximo ao núcleo Águas Claras no município de Mairiporã, conserva características silvestres ($23^{\circ} 24.624'S$ $46^{\circ} 37.205'O$). A trilha é utilizada para a prática de *mountainbike* (Figura 15).

É importante salientar que a seleção de cada ponto de estudo levou em conta variações paisagísticas entre os locais de coleta, incluindo, assim, áreas com forte influência antrópica, com diferentes graus de antropização, áreas de transição com a mata e área preservada em estágio avançado de regeneração. Na APA Capivari-Monos foram selecionados locais com antecedentes de casos humanos de malária, todos associados com presença abundante de bromélias e do mosquito vetor. No Parque Estadual da Cantareira foram selecionadas áreas com presença de bromélias e frequentadas na ocasião por diferentes grupos de bugios.

Figura 10. Pontos de coletas de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde estão localizados a Borracharia e o Sítio Águas de Siloé, respectivamente, na APA Capivari-Monos, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.

Figura 11. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Cachoeira na APA Capivari-Monos, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.

Figura 12. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizado o Embura, no bairro Jardim Embura, próximo à Rua Catharina Guilger Reimberg e às residências, na APA Capivari-Monos, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2018.

Figura 13. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Administração no Núcleo Pedra Grande, no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.

Figura 14. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Trilha da Bica (Rua Frutuoso Viana), no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo. Fonte: Google Earth, 2015.

Figura 15. Ponto de coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) onde está localizada a Trilha do Pinheirinho no Parque Estadual da Cantareira, município de Mairiporã Fonte: Google Earth, 2015.

3.1.2 Técnica de Coleta e Identificação dos Espécimes

Os mosquitos foram coletados mediante o uso de armadilhas automáticas tipo CDC, cuja atração é feita pela iluminação e utilização de isca de CO_2 com gelo seco e também do lurex (Mosquito Magnet - Lurex3 Attractant), substância que simula CO_2 e o ácido lático emanado pela pele de mamíferos. Foram instaladas armadilhas na copa das árvores (acima de 10 metros) e na altura do solo (aproximadamente 1 metro) (Figura 16 A e B). No total, foram instaladas seis armadilhas no PEC e oito na APA Capivari-Monos, sendo duas (uma na copa das árvores e outra na altura do solo) em cada ponto de coleta. As armadilhas foram instaladas por volta das 14 horas e retiradas após 18 horas de exposição, permitindo a coleta de mosquitos de hábitos diurnos, crepusculares e noturnos.

Figura 16. Técnicas de coleta utilizadas no estudo. A- Armadilha do tipo CDC instalada na copa de uma árvore. B- CDC instalada no nível do solo, ambas na APA Capivari-Monos. Imagens: Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP).

Os mosquitos foram levados com vida até o Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP), foram mortos por congelamento e identificados morfológicamente em mesa fria, com auxílio de estereomicroscópio Zeiss, (Stemi 2000-C). Foram usadas as seguintes chaves dicotômicas: ROZEBOM e KOMP (1950); LANE (1953 a,b); GALINDO et al., (1954); CORRÊA e RAMALHO (1956); BRAM (1967); HAL-AMELL (1976); CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994); SALLUM E FORATTINI (1996); FORATTINI (2002). Após a identificação, os espécimes foram agrupados em *pools* com, no máximo, 10 espécimes. Cada *pool* foi devidamente codificado segundo a data de coleta, o ponto de coleta, estrato (copa ou solo), sexo e táxon. Neste trabalho não foram utilizadas fêmeas ingurgitadas para evitar um resultado positivo proveniente do sangue uma vez que a detecção de infecção de arbovírus em mosquitos coletados em campo pode ser apenas devido à alimentação de sangue infectado não digerido, ou seja, quando a fêmea está ingurgitada (DODSON e RASGON, 2017).

3.1.3 Análise dos Dados de Abundância, Riqueza e Diversidade

Os dados sobre as coletas de mosquitos foram manipulados e armazenados em tabela dinâmica. A riqueza consiste no número de táxons amostrados em determinada área e a abundância é o número de indivíduos coletados (MAGURRAM, 2004). Ambas foram calculadas para as duas Unidades de Conservação e seus respectivos pontos de coleta, e utilizou-se o programa Microsoft excel 2016 para construção dos gráficos. A abundância de cada armadilha CDC, instaladas nos diferentes estratos, também foi calculada e para a

construção do gráfico utilizou-se o programa mencionado anteriormente. A diversidade biológica pode ser mensurada a partir da riqueza (número de táxons ou espécies encontradas na área de estudo) e da uniformidade, que é a variabilidade das abundâncias de espécies (MAGURRAM, 2004). Para calcular a diversidade optou-se pelo índice de Shannon (S_H) (índice de diversidade de espécies), o qual foi calculado no programa *Paleontological Statistics* 2.16 (PAST) (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo, Noruega) somente para a área em que algum *Flavivirus* foi detectado.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE *FLAVIVIRUS*

3.2.1 Técnica de Isolamento Viral e Teste de Imunofluorescência Indireta

As amostras foram transportadas em isopor contendo gelo seco até o Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial (NDTV) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL), um centro de referência macrorregional para a vigilância de arboviroses, e criopreservadas em freezer a temperatura -70°C até a realização da técnica de isolamento viral seguido do teste de imunofluorescência indireta (IFI) com etapas descritas a seguir.

3.2.1.1 Preparo de Mosquitos

Os pools de mosquitos foram retirados do freezer -70°C e colocados na Cabine de Segurança Biológica (CSB) em banho de gelo. Foi colocado 1ml de albumina bovina 1,8%, com penicilina e estreptomicina, em flaconetes estéreis de plástico de 4ml e codificado de acordo com cada *pool*. Os mosquitos (Figura 17 A) foram macerados em gral com auxílio de pistilo (Figura 17 B, C, D) e, logo após, a albumina bovina foi adicionada ao gral (Figura 17 E). Com a pipeta automática foram retirados os tecidos fragmentados do gral (Figura 17 F) e colocados nos flaconetes de 4ml (Figura 17 G). Os flaconetes foram centrifugados em centrífuga refrigerada de mesa (Sorvall TR6000D) a 2.500 rpm, por 10 minutos (Figura 17 H). Após a centrifugação, os sobrenadantes (amostra original) foram recolhidos em tubos criogênicos (Figura 17 I) devidamente identificados de acordo com os flaconetes e a ficha de inoculação, colocados em caixas numeradas das amostras originais codificados e armazenados em freezer a temperatura -70°C .

Figura 17. Preparo de mosquitos. A= Pool de mosquito recém-tirado da temperatura -70°C; B, C e D= Maceração de mosquitos; E= Albumina bovina adicionada; F= Retirada de tecidos fragmentados; G= Armazenamento dos tecidos fragmentados em flaconete; H= Centrifugação dos flaconetes; I= Sobrenadantes recolhidos para armazenamento a temperatura -70°C em tubos criogênicos.

3.2.1.2 Inoculação das Amostras de Mosquitos em Cultura de Células C6/36

Os tubos criogênicos (amostras originais) (Figura 18 A) foram retirados do freezer. Os tubos de ensaio semeados com cultura de células de mosquitos *Ae. albopictus*, clone C6/36, contendo 1ml de meio Leibovitz modificado (L-15), (SIGMA-ALDRICH L4386), com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO 2009-07) e Penicilina 100U/ml e Estreptomicina 100µl/ml, (SIGMA P0781) foram fornecidos pelo Núcleo de Cultura de Células (Figura 18 B). Na CSB, o meio L-15 dos tubos foi descartado (Figura 17 C) e as tampas de rosca foram substituídas por rolhas de silicone (nº 3) (Figuras 18 D e E). As amostras foram inoculadas nesses tubos de células (Figuras 18 F e G). Um tubo não foi inoculado, controle negativo e, para não haver risco de contaminação, por último, foi inoculado um controle positivo (SLEV). Os tubos de células foram incubados por uma hora a 28°C na estufa de CO₂ (Fanem 002 CB) (Figura 17 H). A cada 15 minutos eram levemente agitados. Após esse procedimento, foram colocados 1,5ml de meio Meio L-15 acrescido de 2,0% de SBF + antibióticos (Figura 18 I) em cada tubo de células e incubados por noverdias até a realização do teste de imunofluorescência indireta (IFI).

Figura 18. Inoculação das amostras de mosquitos em cultura de células C6/36. A= Tubos criogênicos com amostras originais; B= Tubos semeados com células C6/36; C= meio de crescimento (L-15) desprezado; D e E= Tampa de rosca substituída pela rolha de silicone nº 3; F e G= Inoculação das amostras nos tubos de células C/36; H= Tubos de células C6/36 inoculados incubados na estufa a temperatura 28°C; I= Meio Leibovitz (L-15).

3.2.1.3 Teste Imunofluorescência Indireta

Após o período de incubação, foi realizado o teste de imunofluorescência indireta (IFI). Os tubos de células foram retirados da estufa. Se algum tubo de célula apresentasse contaminação por bactérias ou fungos, era descartado e a amostra original filtrada e reinoculada no teste seguinte. Cada tubo foi agitado vigorosamente para desprender as células e centrifugados em centrífuga refrigerada de mesa (SORVALL-RT 6000D), por 10 minutos a 2.000 rpm. As lâminas de vidro, com 12 orifícios, foram numeradas de acordo com a ficha de inoculação (Figura 19 A). Os tubos (Figura 19 B) foram retirados da centrífuga e o sobrenadante (fluido de células) de cada tubo de células foi decantado em pequenos tubos plásticos transparentes (Figura 19 C) e armazenados a temperatura -70°C (Figura 19 D).

O teste de IFI seguiu a técnica padronizada por GUBLER et al., (1984). Com auxílio da pipeta Pasteur, o sedimento de cada tubo de células foi homogeneizado com 0,5ml de *Phosphate*

Buffered Saline (PBS) (Figura 19 E), foi depositado uma gota de 10µl foi depositada nos orifícios das lâminas (Figura 19 F), em duplicata, seguindo a ficha de inoculação. Após secagem completa das lâminas na CSB, foram fixadas em acetona a temperatura -20°C, por 10 minutos. Depois, levadas até a CSB para secar. Com auxílio da pipeta Pasteur, uma gota de fluido ascístico imunes anti-flavivírus *Saint Louis Encephalite* (SLEV), produzido no próprio laboratório (previamente diluído em PBS 7,5%, segundo o título) foi pingada em cada orifício (Figura 19 G). As lâminas, então, foram incubadas na estufa, em câmara úmida tampada, a temperatura 37°C, por 30 minutos (Figura 19 H). Depois, foram mergulhadas em PBS, por cinco minutos. Em seguida, mergulhadas rapidamente em água destilada para a lavagem da lâmina e colocadas para secagem na CSB.

Em seguida, uma gota de conjugado anti-camundongo (SIGMA-F0257) (já diluído segundo o título) (Figura 19 I) foi pingada em todos os orifícios. Novamente, as lâminas foram incubadas na estufa, em câmara úmida tampada, a 37°C, por 30 minutos. Para finalização do teste, as lâminas foram retiradas da estufa e mergulhadas em PBS, por cinco minutos. Uma gota de glicerina tamponada foi colocada em lamínulas que foram fixadas às lâminas à medida que essas foram sendo retiradas do PBS. A leitura das lâminas foi feita no microscópio imunofluorescência (Nikon, mod. UN) no aumento de 40x. O resultado da leitura de cada orifício das lâminas foi registrado na ficha de inoculação no código correspondente à amostra. As amostras originais positivas (Figura 20) foram direcionadas para realização da técnica de RT-qPCR.

Figura 19. Técnica de isolamento viral seguido do teste de imunofluorescência indireta. A= Lâmina; B= Tubos de células armazenados por 9 dias em estufa (28°C) centrifugados; C= Armazenamento do fluido dos tubos de células recém centrifugados; D= Fluido de células armazenado a temperatura -70°C; E= Homogeneização das células sedimentadas no tubo de células recém centrifugados com Meio L-15; F= Amostra homogeneizada pingada (em duplicata) nos orifícios das lâminas; G= Anti-flavívirus pingado em cada orifício das lâminas; H= Câmara úmida em estufa a temperatura 37°C; I= Anti-camundongo pingado em cada orifício das lâminas.

Figura 20. Amostra de *Flavivirus* isolada de mosquitos (Diptera: Culicidae), oriundos da APA Capivari-Monos, município de São Paulo, em células C6/36.

3.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO VIRAL

Para a extração do ácido ribonucleico (RNA) viral foi utilizado o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 140µl do sobrenadante proveniente do cultivo celular positivo para *Flavivirus* (já centrifugado no início do teste de imunofluorescência indireta) em tubos de 1,5ml e, em seguida foram adicionados 560µl de tampão (Buffer AVL Viral Lysis Buffer) contendo RNA transportador e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, acrescidos 560µl de etanol (96-100%), uso de Vortex por 15 segundos e centrifugado brevemente. Foram aplicados 630µl do sobrenadante ao centro da coluna de sílica gel QIAamp Mini Column em um tubo coletor de 2ml, identificado previamente. O tubo (com a coluna) foi centrifugado a 8.000 rpm por um minuto. O tubo com o filtrado foi descartado e a coluna foi transferida a um novo tubo coletor de 2ml. Posteriormente, o passo anterior foi repetido (aplicando 630µl novamente à coluna, centrifugação e descarte).

Foram adicionados na coluna 500µl de tampão de lavagem (Buffer AW1) e, posteriormente, foram centrifugadas a 8.000 rpm por um minuto, o tubo contendo o filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor com adição de 500µl de tampão de lavagem (Buffer AW2), centrifugados a 14.000 rpm por três minutos. O tubo contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi, novamente, transferida a um novo tubo coletor com posterior centrifugação a 14.000 rpm por um minuto. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5ml, previamente identificado, e adicionados 65µl de tampão de eluição AVE (em temperatura ambiente) incluso no kit. Outra centrifugação foi feita a 8.000 por um minuto. A coluna foi descartada e o produto final foi coletado e congelado a temperatura – 70°C. Para cada tipo viral foi extraído junto um controle negativo da reação.

3.3.1 Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia Pela Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

Para a realização da reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR), foi utilizado o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA), disponível no Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. Os oligonucleotídeos iniciadores codificantes da região NS5 foram selecionados

a partir de análise *in silico*, dessa forma, foram utilizados os descritos por Patel et al., (2013), cujas informações estão descritas no quadro 1.

Quadro 1. Sequência e posição de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores codificantes da região NS5, descritos por Patel et al., 2013, usados neste estudo.

Primer	Sequência	Posição Genoma
Senso Flavi all S	5'- TACAACATgATggggAARAgAgARAA – 3	8993- 9019
Antissenso Flavi all S2	5'- gTgTCCCAgCCNgCKgTgTCATCWgC – 3	9232- 9260
Probe 3	FAM-Tg + gTWYATgT + ggYTNg + gRgC— BBQ	9062- 9082

3.4 ENSAIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

Foi utilizado par de iniciadores Flav all S e Flav all S2, com a *probe* (sonda) do tipo *Taqman* (PATEL et al., 2013) marcada na região 5'terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) e na região 3'terminal com *Blackhole Quencher 1* (BHQ1). Para obtenção de um volume final de 25 µL, foram utilizados 12,5 µL de Master Mix (SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with Rox, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachutes, EUA), 0,5µL de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 25 µM, 0,5µl de probe na concentração de 10 µl, 5 µl de RNA extraído e água grau puro para completar o volume. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 50°C por 10 minutos, seguido de 95°C por 2 minutos, 45 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos. Para cada reação de RT-qPCR para detecção de *Flavivirus* foram utilizados 4 controles de reagentes e ambiente (NTC – no template control) e como controle positivo o YFV.

Após a reação de RT-qPCR, os resultados foram obtidos e interpretados no software do aparelho ABI 7500 v2.3. (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA). O Cycle Threshold (Ct) considerados como positivos foram os que apresentaram valores de 39,7, de acordo com Patel et al. (2013).

3.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

As amostras positivas foram sequenciadas. Foi coletado 1µl de cada produto da PCR (cDNA amplificado após a reação de RT-qPCR) e foram submetidos à reação cíclica de sequenciamento usando o kit comercial *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachutes, EUA), fazendo o uso dos

mesmos oligonucleotídeos iniciadores da reação de RT-qPCR, segundo o método de Sanger et al., (1977).

Em microtubos foi realizada a mistura para o sequenciamento, contendo 1µl de *BigDye®* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachutes, EUA), 6µl de tampão 5x concentrado (*Thermo 70 Fisher Scientific*, Waltham, Massachutes, EUA), 1µl de *primer* e 11µl água MilliQ estéril. Os microtubos foram levados para o termociclador (*Perkin Elmer Cetus*, modelo GeneAmp PCR System 9600), do qual foi programado para amplificação em 25 ciclos (96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 64°C por 4 minutos). O produto de sequenciamento foi precipitado utilizando o método de acetato/etanol de acordo com o protocolo descrito em https://nature.berkeley.edu/soilmicro/methods/EDTA_NaOAc_EtOH_ppt_seq_products.pdf. Na etapa final os produtos marcados (Dye) e ressuspendidos em 10 µl de formamida Hi-DiTM (*Applied Biosystem*, Foster City, Califórnia, EUA) foram aplicados no analisador genético, sequenciador automático de DNA modelo *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, EUA) utilizando o polímero POP6 (*Applied Biosystem*, Foster City, Califórnia, EUA).

3.5.1 Purificação e Precipitação do Produto da Reação de Sequenciamento

O produto de sequenciamento foi precipitado utilizando o método de acetato/etanol de acordo com o protocolo descrito em https://nature.berkeley.edu/soilmicro/methods/EDTA_NaOAc_EtOH_ppt_seq_products.pdf. Na etapa final os produtos marcados (Dye) e ressuspendidos em 10 µl de formamida Hi-DiTM (*Applied Biosystem*, Foster City, Califórnia, EUA) foram aplicados no analisador genético, sequenciador automático de DNA modelo *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, EUA) utilizando o polímero POP6 (*Applied Biosystem*, Foster City, Califórnia, EUA).

3.5.2 Análise das Sequências e Similaridade

Os cromatogramas obtidos das sequências senso e anti-senso, por meio da análise do sequenciador automático, foram editados manualmente a fim de se obterem sequências consenso (*contigs*) usando o software *Sequencher™ 4.7* (*Gene Codes Corporation*, Michigan, EUA). Os arquivos foram salvos no FASTA.

O site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado como ferramenta online para a comparação das sequências consenso obtidas. As sequências consenso geradas por edição manual e o conjunto de sequências cognatas de dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) e ZIKV, utilizadas como sequências de referência, disponíveis e retiradas da base de dados *GenBank*, descritas no quadro 3, foram alinhadas utilizando o programa *Clustal W* (THOMPSON et al., 1994). Assim sendo, todas as sequências foram editadas manualmente utilizando o software *BioEdit 7.0.0* (*Ibis Therapeutics*, EUA) com o propósito de melhorar o alinhamento, incluindo a adequação dos *frames* de tradução (1, 2 e 3). Cada alinhamento gera uma medida estatística denominada *E-value* (Valor de Expectativa), que indica a probabilidade de encontrar uma sequência igual. As sequências com valores $\leq 0,01$ têm maiores chances de serem homólogas (ALTSCHUL et al., 1990; KARLIN e ALTSCHUL, 1990). O cálculo da matriz de identidade, ou seja, a distância genética de nucleotídeos, bem como a de aminoácidos foram determinadas utilizando o software *BioEdit 7.0.0* (*Ibis Therapeutics*, EUA).

As árvores de similaridade foram geradas a partir das sequências de nucleotídeos e construídas por meio do modelo de substituição Kimura *two-parameter distance* e o método de *Neighbor-Joining* utilizando o software MEGA 6.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2013) para inferir relações genéticas entre as cepas. O valor de *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições. As sequências parciais de nucleotídeos foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso apresentados no quadro 2.

Quadro 2. Descrição das informações das sequências analisadas e alinhadas para a construção das árvores de similaridade como o país de isolamento, *Flavivirus* isolado, ano, material isolado, sequência genômica e respectivos números de acesso no *Genbank*.

País	Isolamento do Viral			Sequência Genômica		Número de acesso <i>Genbank</i>
	<i>Flavivirus</i>	Ano	Origem Material Isolado	Completo	Parcial	
Tailândia	DENV1	2001	<i>Homo sapiens</i>	x		FJ687432
Porto Rico	DENV1	2010	<i>Homo sapiens</i>	x		KJ189367
Cuba	DENV2	1891	<i>Homo sapiens</i>	x		KF704357
Papua Nova Guiné	DENV2	1994	<i>Homo sapiens</i>	x		KM204118
Brasil	DENV2	2000	<i>Homo sapiens</i>	x		JN819419
China	DENV2	2015	<i>Homo sapiens</i>	x		KU094070
Colômbia	DENV3	2004	<i>Homo sapiens</i>	x		GU131953
Brasil	DENV3	2007	<i>Homo sapiens</i>	x		GU131878
Camboja	DENV3	2008	<i>Homo sapiens</i>	x		GU131905

Isolamento do Viral				Sequência Genômica		Número de acesso <i>Genbank</i>
País	<i>Flavivirus</i>	Ano	Origem Material Isolado	Completo	Parcial	
Camboja	DENV4	2002	<i>Homo sapiens</i>	x		KF955510
Brasil	DENV4	2012	<i>Homo sapiens</i>	x		KP188560
Uganda	ZIKV	1947	Macaco (sentinela)	x		NC012532
Nigéria	ZIKV	1968	<i>Homo sapiens</i>	x		KU963574
Senegal	ZIKV	1984	Mosquito (<i>Aedes taylori</i>)	x		MF510857
Micronésia	ZIKV	2007	<i>Homo sapiens</i>	x		EU545988
Filipinas	ZIKV	2012	<i>Homo sapiens</i>	x		KU681082
Brasil	ZIKV	2015	<i>Homo sapiens</i>	x		KU729218
Brasil	ZIKV	2015	<i>Homo sapiens</i>	x		KU497555
Estados Unidos	ZIKV	2016	Mosquito (<i>Aedes aegypti</i>)	x		KY785468
Brasil	ZIKV	2016	<i>Homo sapiens</i>	x		KY014307
Colômbia	ZIKV	2016	<i>Homo sapiens</i>	x		MK049249
Venezuela	ZIKV	2016	<i>Homo sapiens</i>	x		KX893855
Haiti	ZIKV	2016	<i>Homo sapiens</i>	x		MF783073
Equador	ZIKV	2016	<i>Homo sapiens</i>	x		MF794971
Colômbia	ZIKV	2016	Mosquito (<i>Aedes aegypti</i>)	x		MK049247
Brasil	ZIKV	2017	<i>Callithrix</i> sp.		x	MG770183
Cuba	ZIKV	2017	<i>Homo sapiens</i>	x		MH063264

4. RESULTADOS

4.1 ABUNDÂNCIA, RIQUEZA E DIVERSIDADE DE CULICÍDEOS

No período de março de 2016 a abril de 2017, foram coletados 1216 espécimes no total (N), sendo que desses, 878 foram coletados na APA Capivari-Monos e 338 no Parque Estadual da Cantareira (Tabela 1). Todos os espécimes coletados na APA Capivari-Monos estão descritos no Apêndice 3, de acordo cada ponto de coleta, enquanto que todos os espécimes coletados no Parque Estadual da Cantareira estão descritos no Apêndice 4, também de acordo com cada ponto de coleta.

Tabela 1. Resultados referentes à abundância de espécimes, à riqueza de táxons, à quantidade de gêneros e subgêneros, ao sexo, ao estrato (copa e solo) e ao número de *pools* analisados, respectivamente, de mosquitos coletados na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo e Mairiporã, no período de março de 2016 a abril de 2017.

		APA	PEC	Total
Sexo	N de mosquitos	878	338	1216
	Riqueza de táxons	37	23	42
	Gêneros	11	10	13
	Subgêneros	15	13	18
	Fêmeas	876	336	1212
	Machos	2	2	4
	Copa	475	120	595
	Solo	361	218	579
Estrato	*	42	0	42
	Pools	261	106	367

* Sem informação

No entanto, para melhor compreensão dos resultados, é importante salientar que os espécimes identificados somente até os subgêneros *Cx. (Culex.)* sp, *Cx. (Melanoconion)* sp e *Wy. (Phoniomyia)* sp não foram contabilizados em nenhuma análise de riqueza. Isso porque outros espécimes, pertencentes a esses mesmos subgêneros, foram identificados até o nível de espécie e, assim, evitou-se a repetição desses táxons nessa análise. Porém, esses táxons foram contabilizados em todas as análises de abundância. Também é importante salientar que devido

à incerteza taxonômica encontrada no exemplar denominado *Coquillettidia (Rhynchotaenia) chrysonotum/albifera*, podendo pertencer tanto à espécie *Cq. (Rhynchotaenia) albifera* como à espécie *Cq. (Rhynchotaenia) chrysonotum*, este não foi contabilizado na análise de riqueza das Unidade de Conservação devido ao mesmo motivo descrito anteriormente. Contudo, foi contabilizado tanto nas análises de riqueza dos pontos de coleta das duas Unidades de Conservação nos quais não apareceram nem a espécie *Cq. (Rhynchotaenia) albifera* nem a *Cq. (Rhynchotaenia) chrysonotum* quanto em todas as análises de abundância.

A abundância de espécimes de mosquitos coletados na APA Capivari-Monos está representada no gráfico da Figura 24, cuja espécie mais abundante foi *An. (Ker.) cruzii* com 171 espécimes coletados. Entretanto, outros espécimes pertencentes à outras espécies também foram abundantes, tais como *Wy. (Prl.) confusa* com 134, *Cx. (Cux.) sp* com 109, *Li. durhamii* com 61, *Wy. (Pho.) theobaldi* com 58, *Ru. (Run.) reversa* com 55, *Cx. (Cux.) chidesteri* com 37, *Cx. (Mel.) vaxus* com 36 e *Cx. (Cux.) quinquefasciatus* com 31. A abundância de táxons na Borracharia, Cachoeira, Embura e Siloé está representada graficamente nos Apêndices 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Figura 21. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados na APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Com relação à abundância de espécimes coletados no Parque Estadual da Cantareira (Figura 25) a espécie de maior abundância foi *Wy. confusa* com 184 espécimes. Além disso, outras espécies coletadas nessa área também foram abundantes, especificamente *Ru. reversa* com 34 espécimes, *Li. durhami* com 26, *Cx. vaxus* com 23 e *Cx. sp* com 16. A abundância de táxons na Pedra Grande, Trilha da Bica e Trilha do Pinheirinho está representada graficamente nos Apêndices 9, 10 e 11, respectivamente.

Figura 22. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo e de Mairiporã, no período de março de 2016 a abril de 2017.

A riqueza observada nas duas Unidade de Conservação está apresentada na Figura 24, onde pode-se perceber que APA Capivari-Monos obteve a maior riqueza amostrada dentre as duas UC's, com 37 táxons amostrados. Já a riqueza no Parque Estadual da Cantareira foi de 23 táxons. A riqueza total foi 42 táxons amostrados nas duas UC's (Tabela 1) e com o intuito de ilustrar a intersecção dos táxons coletados tanto na APA Capivari-Monos como no Parque Estadual da Cantareira, foi elaborado o diagrama de Venn (Figura 23), no qual apresenta a riqueza obtida nas duas áreas de estudo. As espécies em destaque foram as mais abundantes. O tamanho dos círculos no diagrama representa a quantidade de táxons coletados nas Unidades de Conservação, onde a maior riqueza pode ser observada na APA Capivari-Monos. Os 42

táxons estão distribuídos em 13 gêneros, dos quais oito foram coletados tanto na APA Capivari-Monos quanto no Parque Estadual da Cantareira. Contudo, além desses, três gêneros, *Aedeomyia*, *Anopheles* e *Mansonia*, foram coletados somente na APA Capivari-Monos e dois gêneros, *Haemagogus* e *Psorophora*, foram coletados apenas no Parque Estadual da Cantareira (Tabela 1). Com relação aos subgêneros, 11 foram coletados na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira. Além desses, quatro foram coletados somente na APA Capivari-Monos e três somente no Parque Estadual da Cantareira (Tabela 1). Todos esses gêneros e subgêneros estão descritos no Quadro 3, aqueles marcados em cinza são os gêneros e subgêneros amostrados em apenas uma das áreas de estudo.

Figura 23. Diagrama de Venn: Representação da quantidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados nas duas Unidades de Conservação (APA= APA Capivari-Monos e PEC= Parque Estadual da Cantareira), no período de março de 2016 a abril de 2017. Estão marcadas em negrito as espécies coletadas em maior abundância.

Quadro 3. Gêneros e subgêneros de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira. Aqueles coletados apenas em uma das áreas de estudo estão marcados em cinza e os que não estão marcados correspondem aos coletados em ambas as áreas de estudo.

Gêneros		Subgêneros	
APA	PEC	APA	PEC
<i>Aedeomyia</i>	<i>Aedes</i>	<i>Aedeomyia</i> (<i>Aedeomyia</i>)	<i>Aedes</i> (<i>Ochlerotatus</i>)
<i>Aedes</i>	<i>Coquilleltidia</i>	<i>Aedes</i> (<i>Georgecraigius</i>)	<i>Aedes</i> (<i>Protomacleaya</i>)
<i>Anopheles</i>	<i>Culex</i>	<i>Aedes</i> (<i>Ochlerotatus</i>)	<i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>)
<i>Coquilleltidia</i>	<i>Haemagogus</i>	<i>Aedes</i> (<i>Protomacleaya</i>)	<i>Coquilleltidia</i> (<i>Rhynchotaenia</i>)
<i>Culex</i>	<i>Limatus</i>	<i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>)	<i>Culex</i> (<i>Carrollia</i>)
<i>Limatus</i>	<i>Psorophora</i>	<i>Anopheles</i> (<i>Kerteszia</i>)	<i>Culex</i> (<i>Culex</i>)
<i>Mansonia</i>	<i>Runchomyia</i>	<i>Coquilleltidia</i> (<i>Rhynchotaenia</i>)	<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>)
<i>Runchomyia</i>	<i>Sabethes</i>	<i>Culex</i> (<i>Carrollia</i>)	<i>Haemagogus</i> (<i>Conopostegus</i>)
<i>Sabethes</i>	<i>Trichoprosopon</i>	<i>Culex</i> (<i>Culex</i>)	<i>Limatus durhamii</i> *
<i>Trichoprosopon</i>	<i>Wyeomyia</i>	<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>)	<i>Psorophora</i> (<i>Janthinosoma</i>)
<i>Wyeomyia</i>		<i>Limatus durhami</i> *	<i>Runchomyia</i> (<i>Runchomyia</i>)
		<i>Mansonia</i> (<i>Mansonia</i>)	<i>Sabethes</i> (<i>Peytonulus</i>)
		<i>Runchomyia</i> (<i>Runchomyia</i>)	<i>Sabethes</i> (<i>Sabethes</i>)
		<i>Sabethes</i> (<i>Sabethes</i>)	<i>Trichoprosopon pallidiventer</i> *
		<i>Trichoprosopon pallidiventer</i> *	Wy. (<i>Hystatomyia</i>) <i>coenonus</i>
		<i>Wyeomyia</i> (<i>Phoniomyia</i>)	<i>Wyeomyia</i> (<i>Phoniomyia</i>)
		<i>Wyeomyia</i> (<i>Prosopolepis</i>)	<i>Wyeomyia</i> (<i>Prosopolepis</i>)
		Wy. (<i>Spilonympha</i>)	Wy. (<i>Spilonympha</i>)
		Wy. <i>roucouyana/chalcocephala</i> '	

* Espécies coletadas na APA – APA Capivari-Monos e no PEC – Parque Estadual da Cantareira que não possuem subgênero

' Espécies coletadas na APA – APA Capivari-Monos e no PEC – Parque Estadual da Cantareira com subgêneros incertos ou desconhecidos

Figura 24. Riqueza de táxons de mosquitos (Diptera: Culicidae) observada cada uma das Unidade de Conservação (APA Capivari-Monos e Parque Estadual da Cantareira), estado de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Cada ponto de coleta da APA Capivari-Monos e do Parque Estadual da Cantareira obteve uma riqueza que está apresentada nas Figuras 25 e 26. Pode-se perceber que a maior riqueza da APA Capivari-Monos foi observada no ponto Cachoeira, com 26 táxons coletados (Figura 24). Logo em seguida, está o ponto Borracharia com 20 táxons coletados, Siloé e Embura com 17 e 15 táxons coletados, respectivamente (Figura 25). No caso do Parque Estadual da Cantareira, o ponto de coleta que apresentou a maior riqueza foi a Trilha do Pinheirinho, seguida da Pedra Grande e Trilha da Bica, com 16, 12 e 9 táxons coletados, respectivamente (Figura 26).

Figura 25. Riqueza de táxons de mosquitos (Diptera: Culicidae) observada em cada ponto de coleta da APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Figura 26. Riqueza de táxons de mosquitos (Diptera: Culicidae) observada em cada ponto de coleta do Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo e de Mairiporã, no período de março de 2016 a abril de 2017.

De todos os exemplares de culicídeos amostrados, a grande maioria corresponde às fêmeas (99,67%) (Tabela 1). Em ambas as áreas de estudo, o total de fêmeas foi de 1212. Dessas, 876 foram coletadas na APA Capivari-Monos e 336 no Parque Estadual da Cantareira. Apenas quatro machos foram amostrados no total (0,33%) (Tabela 1), sendo um *Cx. (Mel.) ribeirensis* e um *Cq. (Rhy.) chrysonotum/albifera* na APA Capivari-Monos, um *Cx. (Car.) iridescens* e um *Cx. (Cux.) dolosus/eduardoi* no Parque Estadual da Cantareira.

A análise de abundância dos espécimes coletados na copa das árvores e na altura do solo, na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira, pode ser observada no gráfico do Apêndice 12. Ele mostra a comparação entre a abundância de espécimes coletados na CDC copa e na CDC solo entre as Unidades de Conservação. Além disso, também é possível comparar a abundância de espécimes coletados na CDC copa com a abundância dos espécimes coletados na CDC solo em cada área de estudo, individualmente.

Apesar do esforço amostral empregado por ambas armadilhas ter sido o mesmo, a abundância de espécimes coletados por elas foi diferente. Ao comparar as Unidades de Conservação com relação à abundância de espécimes coletados na copa das árvores é possível observar que a abundância foi maior na APA Capivari-Monos, com 475 espécimes, em comparação com o Parque Estadual da Cantareira, com 120 espécimes coletados. Dessa forma, o total de espécimes coletados na CDC copa é de 595 (Tabela 1). Na comparação entre as Unidades de Conservação em função da abundância de espécimes coletados na CDC solo, a maior abundância também foi observada na APA Capivari-Monos, com 361 espécimes coletados, enquanto que no Parque Estadual da Cantareira foram coletados 218. No total, as duas áreas coletaram 579 espécimes na CDC solo (Tabela 1).

Na APA Capivari-Monos, ao comparar a abundância de espécimes coletados na CDC copa com os amostrados na CDC solo, nota-se que essa primeira obteve o maior número de espécimes coletados. Os táxons mais abundantes coletados na CDC copa foram *An. (Ker.) cruzii*, *Cx. (Cux.)* sp, *Wy. (Pho.) theobaldi*, *Wy. (Prl.) confusa*, *Cx. (Cux.) chidesteri* e *Cx. (Cux.) quinquefasciatus*, com 132, 72, 36, 36, 28 e 21 espécimes coletados, respectivamente. Apesar de poder haver repetição desses dois últimos táxons na contabilização do táxon *Cx. (Cux.)* sp, que os agrega, todos foram contabilizados para que se conheça o número total de espécimes coletados na CDC copa. Com relação à CDC solo, os táxons mais abundantes foram *Wy. (Prl.) confusa*, *Li. durhamii*, *An. (Ker.) cruzii*, *Cx. (Cux.)* sp e *Ru. (Run.) reversa*, com 80, 48, 39, 36 e 28 espécimes, respectivamente. Entretanto, 42 espécimes coletados na APA Capivari-Monos ficaram sem informações sobre o estrato em que foram coletados (Tabela 1).

Já no Parque Estadual da Cantareira, também ao comparar a abundância de espécimes coletados na CDC copa com a abundância de espécimes coletados na CDC solo, verifica-se que a maior abundância foi observada na CDC solo, cujos táxons mais abundantes foram *Wy. (Prl.) confusa*, *Ru. (Run.) reversa* e *Cx. (Mel.) vaxus*, com 30, 24 e 22, espécimes coletados, respectivamente. Na CDC copa os espécimes mais abundantes foram *Wy. (Prl.) confusa*, *Li. durhamii* e *Ru. (Run.) reversa*, com 154, 20 e 10, respectivamente.

A diversidade de táxons de mosquitos coletados nos quatro pontos de coleta da APA Capivari-Monos foi mensurada através do Índice de Shannon e está apresentada na Tabela 2. A maior diversidade foi observada na Borracharia, seguida do Embura, Cachoeira e, por último com menor diversidade, o Siloé.

Tabela 2. Resultado da diversidade de táxons de mosquitos coletados nos quatro pontos de coleta da APA Capivari-Monos (Borracharia, Cachoeira, Embura e Siloé) calculada através do Índice de Shannon.

APA Capivari-Monos				
Índice	Pontos de Coleta			
	Borracharia	Cachoeira	Embura	Siloé
Shannon_H	2,537	2,293	2,322	2,082

4.2 DETECÇÃO DE *FLAVIVIRUS* EM MOSQUITOS

4.2.1 *Flavivirus* Detectados a Partir do Isolamento Viral em Células C6/36 Seguido do Teste de Imunofluorescência Indireta

Dos 368 *pools* de mosquitos provenientes das duas áreas verdes (APA Capivari-Monos e Parque Estadual da Cantareira) seis *pools* de mosquitos oriundos da APA Capivari-Monos foram positivos para o gênero *Flavivirus* por meio do isolamento viral em células C6/36 seguido da técnica de imunofluorescência indireta. Ambas as técnicas foram repetidas para confirmação do resultado. Assim, três dos seis *pools* contêm as espécies *An. (Ker.) cruzii* (157 14P-A2), *Wy. (Pho.) theobaldi* (163 14P-B) e o táxon *Cx. (Cux.) sp* (168 14P-F), todas fêmeas coletadas no mês de outubro de 2016, na CDC copa do ponto de coleta Cachoeira, com 10, cinco e seis mosquitos em cada *pool*, respectivamente. Outro *pool* contém a espécie *Cx. (Mel.) vaxus* (143 9P-C), todas fêmeas coletadas em fevereiro de 2017 na CDC copa do ponto de coleta

Cachoeira, com quatro mosquitos no *pool*. Os outros dois *pools* contêm as espécies *Li. durhami* (148 11P-A) e *Wy. (Prl.) confusa* (150 12P-A), todas fêmeas coletadas no mês de fevereiro de 2017, cuja primeira é oriunda da CDC solo e a segunda da CDC copa, ambas provenientes do ponto de coleta Siloé, com seis e dois mosquitos em cada *pool*, respectivamente. A descrição dessas amostras, correspondentes aos *pools* positivos para *Flavivirus*, pode ser analisada no Quadro 4. Dessa forma, todas elas foram direcionadas para o ensaio de RT-qPCR.

Quadro 4. Descrição dos *pools* de mosquitos oriundos da APA Capivari-Monos com resultados positivos para o gênero *Flavivirus* por meio da técnica de isolamento viral seguido do teste de Imunofluorescência Indireta, cujas informações aparecem de acordo com o código da amostra, data de coleta, ponto de coleta, táxon dos mosquitos, sexo, número de mosquitos por *pool*, estrato e resultado obtido no isolamento viral seguido de imunofluorescência indireta.

Amostra	Data da Coleta	Ponto de Coleta	Espécie	Sexo	Nº mosquitos/ <i>pool</i>	Estrato	Isolamento Viral/IFI
157 14P-A2	out/16	Cachoeira	<i>An. (Ker.) cruzii</i>	f	10	copa	+/+
163 14P-B	out/16	Cachoeira	<i>Wy. (Pho.) theobaldi</i>	f	5	copa	+/+
168 14P-F	out/16	Cachoeira	<i>Cx. (Cux.) sp</i>	f	6	copa	+/+
143 9P-C	fev/17	Cachoeira	<i>Cx. (Mel.) vaxus</i>	f	4	copa	+/+
148 11P-A	fev/17	Siloé	<i>Li. durhami</i>	f	6	solo	+/+
150 12P-A	fev/17	Siloé	<i>Wy. (Prl.) confusa</i>	f	2	copa	+/+

4.2.2 PCR em Tempo Real do Gene NS5 de *Flavivirus*

Dos seis *pools* positivos encaminhados para o ensaio de RT-qPCR, cinco apresentaram resultados positivos para *Flavivirus*, cuja reação de amplificação do gene NS5 de *Flavivirus* pode ser examinada no gráfico da Figura 27 (onde observa-se que quanto menor o Ct maior o número de cópias iniciais de cDNA detectadas), de acordo com as curvas sigmóides. Os resultados e descrição das informações referentes aos *pools* de mosquitos positivos para *Flavivirus*, na RT-qPCR, estão descritos no Quadro 5, com os respectivos Ciclo limiar (Ct) e Temperatura de *Melting* (Tm).

Figura 27. Curvas sigmóides de amplificação geradas a partir da técnica RT-qPCR que amplifica fragmento do gene NS5 de *Flavivirus*. O limiar (linha reta na cor azul) e as curvas que o ultrapassam (amarela, roxa, azul, verde clara, verde escura, azul clara e azul escura) podem ser observados.

Quadro 5. Resultados da PCR em tempo real do gene NS5 de *Flavivirus* com descrição dos *pools* de mosquitos (Diptera: Culicidae) (amostra, mosquitos e quantidade de exemplares por pool) e seus respectivos Ct e Tm. Em negrito estão os *pools* positivos para *Flavivirus*.

<i>Pool</i>			Ct	Tm (°C)
Amostra	Mosquito	Nº mosquito/ <i>pool</i>		
Controle positivo	-	-	12,4	60°
168 14P-F	<i>Cx. (Cux.) sp</i>	6	15,3	60°
143 9P-C	<i>Cx. (Mel.) vaxus</i>	4	16	60°
148 11P-A	<i>Li. durhami</i>	6	18,8	60°
157 14P-A2	<i>An. (Ker.) cruzii</i>	10	34	60°
150 12P-A	<i>Wy. (Prl.) confusa</i>	2	37,7	60°
163 14P-B	<i>Wy. (Pho.) theobaldi</i>	5	42	60°

Ct – Ciclo limiar; Tm – Temperatura de *Melting*

4.2.3 Sequenciamento Genômico das Amostras Positivas para *Flavivirus*

Os cinco pools positivos para o gene NS5 de *flavivirus* amplificados no ensaio de RT-qPCR foram sequenciados com sucesso. As amostras 168 14P-F e 143 9P-C foram identificadas como Dengue Vírus genótipo 2 (DENV-2), enquanto as amostras 148 11P-A, 157 14P-A2 e

150 12P-A foram classificadas como Zika Vírus (ZIKV). No Quadro 6 estão apresentadas as informações desses *pools* positivos para *Flavivirus*, com tamanho de fragmento, em pares de bases (pb), cepas e número de acesso no *Genbank*.

Quadro 6. Características dos *pools* dos quais foram detectadas sequências de RNA viral, segundo amostra, data de coleta, ponto de coleta, táxon, sexo, quantidade de exemplares por *pool*, estrato, RNA viral detectado no sequenciamento e número de acesso no *Genbank*.

Amostra	Data da Coleta	Ponto de Coleta	Táxon	Nº mosquito/ <i>pool</i>	Estrato	RNA viral	Tamanho do Fragmento (pb)	Cepas	Número de Acesso <i>Genbank</i>
168 14P-F	out/16	Cachoeira	<i>Cx. (Cux.) sp</i>	6	copa	DENV-2	243	Flavi_168_DENV-2	MK134006
143 9P-C	fev/17	Cachoeira	<i>Cx. (Mel.) vaxus</i>	4	copa	DENV-2	255	Flavi_143_DENV-2	MK134005
148 11P-A	fev/17	Siloé	<i>Li. durhami</i>	6	solo	ZIKV	242	Flavi_148_zika	MK371391
157 14P-A2	out/16	Cachoeira	<i>An. (Ker.) cruzii</i>	10	copa	ZIKV	268	Flavi_157_zika	MK371393
150 12P-A	fev/17	Siloé	<i>Wy. (Prl.) confusa</i>	2	copa	ZIKV	269	Flavi_150_zika	MK371392

Pb – Pares de base

O produto das sequências de nucleotídeos obtidas das cepas Flavi_143_DENV-2 e Flavi_168_DENV-2, ambas isoladas de mosquitos provenientes da APA Capivari-Monos, município de São Paulo, foram de 243pb e 255pb, respectivamente. Para as cepas, Flavi_148_zika, Flavi_150_zika e Flavi_157_zika, também isoladas de mosquitos provenientes da APA Capivari-Monos, as sequências obtidas foram de 242pb, 269pb e 268pb, respectivamente.

Árvores de similaridade foram construídas com a finalidade de confirmar as espécies virais e os genótipos obtidos pela ferramenta online BLAST (Figuras 28 e 29). Para as análises de identidade, comparação entre as cepas protótipos e construção da árvore de similaridade foram utilizadas sequências com 256pb para DENV e 267pb para ZIKV. Para a árvore de similaridade de DENV-2 (Figura 28), incluiu-se cepas de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 isolados no Brasil e mundo. Para a árvore de similaridade de ZIKV (Figura 29), o critério adotado foi incluir cepas de ZIKV detectadas no Brasil e demais cepas provenientes das Américas, Ásia e África.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos parciais do gene NS5 obtidas a partir das cepas Flavi_143_DENV-2 e Flavi_168_DENV-2 foram comparadas com as cepas protótipos apresentadas na matriz de nucleotídeos (Apêndices 11 e 12) segundo seus respectivos números

de acesso no *Genbank*: FJ687432, KJ189367, isoladas de *Homo sapiens* com DENV-1; JN819419, KF704357, KU094070, KM204118, isoladas de *Homo sapiens* com DENV-2; GU131878, GU131905, GU131953, isoladas de *Homo sapiens* com DENV-3; KP188560, KF955510, isoladas de *Homo sapiens* com DENV-4. O mesmo foi feito com as cepas Flavi_148_zika, Flavi_150_zika e Flavi_157_zika com relação às cepas protótipos apresentadas na matriz de nucleotídeos (Apêndice 13) e aminoácidos (Apêndice 15) segundo seus respectivos números de acesso no *Genbank*: MF510857, KU963574, NC012532, isoladas de macaco sentinela, *Homo sapiens* e *Aedes taylori* com ZIKV, respectivamente, na África; KU963574, KU729218, MK049249, MF783073, MH063264, MF794971, KX893855, KY785468, KU497555 isoladas de *Homo sapiens*, MG770183, isolada de *Callitrix* sp., KY014307 e MK049247 isoladas de *Aedes aegypti*, com ZIKV, nas Américas; KU681082, EU545988, isoladas de *Homo sapiens* com ZIKV, na Ásia. Todas as informações das sequências de referência podem ser encontradas no Quadro 2.

A árvore de similaridade de DENV confirmou a identificação das cepas Flavi_143_DENV-2 e Flavi_168_DENV-2 como pertencentes ao genótipo 2 (Figura 28). As cepas Flavi_143_DENV-2 e Flavi_168_DENV-2 apresentaram identidade nucleotídica (nt) de 94,1% e de aminoácidos (aa) 93,9% quando comparadas entre si. A análise genética das sequências parciais do gene NS5 permitiu observar que as cepas de DENV-2, detectadas no presente estudo, exibem maior similaridade nucleotídica com cepas humanas de DENV-2 isoladas em Cuba em 1981 (A169; KF704357), na China em 2015 (SZ; KU094070) e na Nova Guiné em 1944 (C; KM204118) (93,3%-97,6% nt; 90,3%-96,3% aa). A análise genética das sequências parciais do gene NS5 permitiu observar que as cepas Flavi_143_DENV-2 e Flavi_168_DENV-2 exibem uma similaridade nucleotídica menor em relação à cepa humana brasileira de DENV-2 BID-V2377 detectada em 2000 (JN819419), variando de 88,6% a 93,7% (79,5%-85,5% aa) (Apêndice 11 e 12). O percentual de identidade maior, compartilhado entre as cepas Flavi_143_DENV-2 e Flavi_168_DENV-2 e as cepas humanas isoladas ao redor mundo, fica mais evidente na Figura 28.

As cepas Flavi_148_zika, Flavi_150_zika e Flavi_157_zika apresentaram identidade nucleotídica de 99,6% (98,8%-100% aa) quando comparadas entre si. A análise genética das sequências parciais do gene NS5 permitiu observar que as cepas Flavi_148_zika, Flavi_150_zika e Flavi_157_zika, detectadas no presente estudo, exibem alta similaridade nucleotídica com as demais cepas de ZIKV detectadas nas Américas a partir de 2015, isoladas tanto em humanos quanto em mosquitos do gênero *Aedes* e PNH, variando de 97,0% a 98,1%

(90,6%-94,1% aa) (Apêndice 13 e 14; Figura 29). A Figura 29 também evidencia os grupos geneticamente distintos de ZIKV detectados nas Américas, Ásia e África.

Figura 28. Árvore de similaridade do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene NS5 de DENV-2 das cepas Flavi_143_DENV-2 e Flavi_168_DENV-2 geradas com o software MEGA 6.0. Sequências de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. As espécies e o número de aceso de cada cepa estão indicados. As informações do isolamento viral de cada cepa estão descritas no quadro 4. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

Figura 29. Árvore de similaridade do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene NS5 de ZIKV das cepas Flavi_148_ZIKV, Flavi_150_ZIKV e Flavi_157_ZIKV geradas com o software MEGA 6.0. Sequências de ZIKV de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. As espécies e o número de acesso de cada cepa estão indicados. As informações do isolamento viral de cada cepa estão descritas no quadro 4. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

5. DISCUSSÃO

De acordo com Joshua Lederberg, médico e biólogo molecular americano, laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1958:

“Os únicos reais competidores da humanidade pelo domínio do planeta são os vírus, os quais podem servir como parasitas e elementos genéticos nos seus hospedeiros. Os vírus não só apresentam uma plasticidade genética que os capacita a evoluir em novas direções, como também mostram a capacidade de interação genética e metabólica com as células infectadas, que os coloca em posição de mediar alterações evolucionárias cumulativas nas células hospedeiras. Contudo, o efeito das infecções virais não é sempre sutil; os vírus podem também dizimar uma população”.

O Brasil tem sido palco de diversas arboviroses emergentes e reemergentes, das quais muitas são endêmicas de determinadas regiões de florestas do país, enquanto outras foram introduzidas, ao longo do tempo, em locais específicos (SILVA e ANGERAMI, 2008). Essa introdução ocorreu por meio do comércio de pessoas e mercadorias entre o século XVI e XIX, e atualmente devido à globalização no novo milênio (SILVA e ANGERAMI, 2008; AAGAARD-HANSEN et al., 2010; WEAVER e REISEN, 2010). Dessa mesma forma, muitos mosquitos foram introduzidos e reintroduzidos no Brasil, dentre eles espécies vetoras de diversos abovírus (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1996, 2002). Muitas dessas arboviroses introduzidas foram posteriormente disseminadas para outras áreas brasileiras, que antes eram indenes e, algumas delas, se tornaram endêmicas no Brasil como, por exemplo, a dengue (LIMA-CAMARA, 2016; DONALISIO et al., 2017).

A disseminação dos arbovírus está diretamente relacionada à expansão geográfica de mosquitos vetores e de seus hospedeiros vertebrados, sendo totalmente dependente da inter-relação existente entre eles (HARDY et al., 1983; GUBLER, 2001; WEAVER e REISEN, 2010; LOPES et al., 2014). Muitos desses vetores estão associados à Mata Atlântica, cuja fragmentação influencia na adaptação dessas espécies (MEDEIROS-SOUSA, et al., 2017M; MORAIS e NATAL, 2017). MORAIS e NATAL (2017) acreditam que, possivelmente, a maior diversidade de culicídeos do Brasil está na Mata Atlântica. Diversos remanescentes desse bioma estão distribuídos pela região metropolitana de São Paulo, desde parques urbanos até Unidades de Conservação (UCs). HEINESCHI et al. (2018) apontam que as áreas verdes nos centros urbanos podem servir como habitats importantes para assembleias de mosquitos, inclusive espécies vetoras. Segundo MAGURRAM (2004), assembleias (usada como sinônimo de

comunidades muitas vezes) compõem grupos de espécies com relações filogenéticas em uma comunidade.

Há alguns anos as informações a respeito da fauna de culicídeos que circulam na região metropolitana de São Paulo era bastante escassa. Diante dessa escassez, alguns trabalhos foram desenvolvidos com intuito de conhecer essas espécies. FORATTINI et al. (1968) em um estudo na região metropolitana de São Paulo, Casa Grande, no município de Salesópolis, amostraram mais de 180 mil espécimes catalogados em 42 espécies distribuídos em 4 Anophelini, 16 Culicini e 23 Sabethini, durante o período de 1963 e 1966. FORATTINI et al., (1973) realizaram um dos trabalhos pioneiros com culicídeos, em diversos locais distribuídos pela cidade de São Paulo, o qual registrou ampla incidência de mosquitos do gênero *Culex* como *Culex (Cux.) chidesteri*, *Culex (Cux.) dolosus*, *Culex (Cux.) pipens fatigans* e *Culex (Cux.) bidens* em diversos locais. URBINATTI et al. (2001) amostraram 9.065 exemplares de culicídeos, classificadas em 22 táxons, distribuídos em seis gêneros, em um estudo conduzido no Parque Ecológico do Tietê. TAPE-LAGOS e NATAL (2003) coletaram mais de 50 mil exemplares pertencentes a 25 táxons, distribuídos em 8 gêneros, também no Parque Ecológico do Tietê. MONTES (2005), em um trabalho feito no Parque Estadual da Cantareira, coletou 21 espécies de culicídeos. RIBEIRO et al., (2012) encontraram, na APA Capivari-Monos, onde 91 táxons de culicídeos. Duarte et al., (2013), também na região da APA Capivari-Monos, coletaram diversas espécie de *Anopheles*.

Em um estudo foi realizado em 65 parques urbanos da cidade de São Paulo, no período de outubro de 2010 a julho de 2013, foram coletados mais de 30 mil exemplares de culicídeos: 5.129 espécimes, catalogadas em 41 unidades taxonômicas, distribuídas em 11 gêneros em 35 parques (MEDEIROS-SOUSA et al., 2013a); 7.015 culicídeos, pertencentes a 53 unidades taxonômicas, distribuídas em 13 gêneros em 59 parques (MEDEIROS-SOUSA et al., 2013b); 8.541 culicídeos em estágio imaturo, catalogadas em 21 unidades taxonômicas em 23 parques (CERETTI-JUNIOR et al., 2014); 2.582 espécimes pertencentes a táxons, distribuídos em cinco gêneros em um parque (CERETTI-JUNIOR et al., 2015); pouco mais de 11 mil exemplares catalogadas em 57 táxons, distribuídos em 13 gêneros um parque (MEDEIROS-SOUSA et al., 2015); 5.579 culicídeos, pertencentes a 23 unidades taxonômicas, distribuídas em 9 gêneros em dois parques (PAULA et al., 2015); 2.024 indivíduos classificados em 17 espécies, distribuídos em 6 gêneros em 15 parques (CERETTI-JUNIOR et al., 2016); 6.001 indivíduos distribuídos em 11 gêneros em sete parques (FERNANDES et al., 2016); 8.850 espécimes, pertencentes a 63 unidades taxonômicas, distribuídos em nove gêneros em dois parques (CARVALHO et al.,

2017); 37.972 culicídeos catalogados 73 táxons, distribuídos em 14 gêneros em nove parques (MEDEIROS-SOUSA et al., 2017).

No presente estudo, foi possível amostrar 1216 exemplares de culicídeos na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira, durante 14 coletas efetuadas mensalmente, no período de março de 2016 a abril de 2017. A APA Capivari-Monos registrou a maior abundância de culicídeos, sendo 878 exemplares coletados, em quatro pontos de coleta (Borracharia, Cachoeira, Embura e Siloé). Ribeiro et al. (2012), em um estudo também conduzido na APA Capivari-Monos, coletaram um total de 9.403 espécimes de mosquitos, pertencentes a 91 táxons, no período de maio de 2009 a junho de 2010 em coletas mensais, em dois pontos de coleta, sendo um deles em comum, o Embura. Ambos estudos tiveram exatamente a mesma quantidade de coletas realizadas em seus respectivos períodos, totalizando 14 meses. No entanto, o esforço amostral empregado por RIBEIRO et al. (2012) foi maior, utilizando armadilhas de busca ativa (aspirador) e passiva (CDC e armadilha de Shannon), o que explica a discrepante diferença entre os números de espécimes coletados nos dois trabalhos. DUARTE et al. (2013), em estudo paralelo com o de RIBEIRO et al. (2012), no período de maio de 2009 a junho de 2010 e de janeiro de 2011 a abril de 2011 em três pontos de coleta, sendo o Embura em comum, coletaram 6.703 exemplares, sendo que os dados obtidos por RIBEIRO et al. (2012) estão inclusos nesse valor. O esforço amostral que DUARTE et al. (2013) empregaram também foi maior, utilizando armadilhas do tipo CDC e armadilha de Shannon.

No Parque Estadual da Cantareira, a abundância de mosquitos foi de 338 espécimes, em três pontos de coleta (Pedra Grande, Trilha da Bica e trilha do Pinheirinho). Em ambas UC's as espécies *Li. durhamii*, *Ru. (Run.) reversa*, *Wy. (Prl.) confusa* foram as mais abundantes. O táxon *Cx. (Cux.)* sp. também está entre os táxons mais abundantes nas duas UC's, entretanto, a identificação dos espécimes catalogados nesse táxon não foi possível até o nível espécie. MONTES (2005), na mesma UC, coletou 2.219 exemplares de mosquitos pertencentes a 22 táxons durante 240 coletas efetuadas mediante armadilhas CDC copa e solo, de fevereiro de 2001 a janeiro de 2002, em dois pontos de coleta, sendo o ponto Pedra Grande em comum com o presente trabalho. O esforço amostral que MONTES (2005) empregou nas coletas também foi maior com relação ao esforço amostral empregado no presente estudo, evidenciando a grande diferença no número de exemplares coletados. No entanto, a riqueza obtida no presente estudo, 23 espécies, foi maior do que a riqueza apresentada por MONTES (2005), com 22 espécies de mosquitos, cuja citação sobre a riqueza de espécies de mosquitos encontrados no

Parque Estadual da Cantareira também é relatada no Plano de Manejo do Parque Estadual da Cantareira (SÃO PAULO, 2009).

Dentre os pontos de coleta da APA Capivari-Monos, a maior abundância foi observada na Cachoeira (539 espécimes), seguida do Siloé (131 espécimes) e Embura (115 espécimes), sendo a menor abundância verificada na Borracharia (76 espécimes). As espécies mais abundantes foram *An. cruzii*, *Li. durhamii*, *Cx. sp* e *Tr. pallidiventer*, respectivamente, para cada ponto de coleta. Levando em conta que o esforço amostral foi equivalente nos quatro pontos, uma possível explicação para a diferença entre o número de indivíduos amostrados em cada ponto de coleta, dentro da mesma área de estudo, é a quantidade de criadouros disponíveis em cada um deles, que permitem que os mosquitos completem seus ciclos (SÃO PAULO, 2018). Tanto criadouros naturais quanto artificiais são encontrados nos quatro pontos, sendo que alguns são permanentes e outros temporários. Criadouros naturais (occos de árvores, buracos nas pedras, poças no solo, bromélias epífitas e de solo e furos laterais de bambus) são comumente encontrados na Cachoeira, Embura, Siloé e Borracharia. Além desses, há dois lagos próximos ao Embura e um ao Siloé. Criadouros artificiais também são habitualmente encontrados nesses pontos uma vez que todos eles têm propriedades e/ou estabelecimentos muito próximos e com grande fluxo de pessoas. Há um lago artificial próximo à Cachoeira e dois próximos à Borracharia. Além da disponibilidade de criadouros, a presença e quantidade de hospedeiros vertebrados em cada um dos pontos também pode ser outra possível explicação (CARVALHO et al., 2014), sendo que são encontrados animais domésticos, rurais e silvestres próximo a esses quatro pontos.

Ao comparar os pontos de coleta no Parque Estadual da Cantareira, a maior abundância foi observada na Trilha do Pinheirinho (150 indivíduos), seguida da Pedra Grande (122 indivíduos) e Trilha da Bica (66 indivíduos), cuja espécie mais abundante nesses três pontos foi *Wy. confusa*. Uma vez que o esforço amostral foi exatamente o mesmo para os três pontos, as possíveis explicações são as mesmas da APA Capivari-Monos, quantidade de criadouros disponíveis em cada um deles (SÃO PAULO, 2018), além da presença e quantidade de hospedeiros vertebrados que são comumente encontrados nesses pontos de coleta (CARVALHO et al., 2014). Criadouros naturais e artificiais são encontrados nos três pontos, alguns são permanentes e outros temporários. Com relação aos criadouros naturais são comumente encontrados nos três pontos de coleta. Além desses, na Pedra Grande há um pequeno lago próximo à sede administrativa, e na Trilha do Pinheirinho há algumas poças grandes e profundas que mantêm água acumulada por determinado tempo devido ao relevo

bastante irregular no caminho da trilha. Os criadouros artificiais são habitualmente encontrados nos três pontos de coleta, na Pedra Grande há um tanque de água instalado próximo à sede administrativa do parque.

A riqueza observada nessas duas UC's corresponde a 42 táxons amostrados, distribuídos em 13 gêneros. A maior riqueza de culicídeos observada foi registrada na APA Capivari-Monos, com 37 táxons, enquanto que no Parque Estadual da Cantareira, a riqueza observada foi de 23 táxons. Em ambas UC's espécies de importância epidemiológica estão inclusas. O tamanho da APA Capivari-Monos, que compreende 1/6 de toda a cidade de São Paulo, o fato de ser fronteira à Serra do Mar, de possuir diversas áreas bastante preservadas, apesar de algumas partes sofrer influência antrópica, e de abrigar uma vasta biodiversidade animal e vegetal (com plantas nativas do bioma Mata Atlântica) (SÃO PAULO, 2011) são fatores que podem explicar a maior riqueza de táxons amostrados. O Parque Estadual da Cantareira, inserido em meio à malha urbana, na área metropolitana de São Paulo, apesar de apresentar pontos com características mais silvestres, sofre com intervenção antrópica ao seu redor, além de sua extensão territorial ser menor (SÃO PAULO, 2009), quando comparado à da APA Capivari-Monos, fatores que podem explicar a menor riqueza amostrada.

Entre os quatro pontos de coleta da APA Capivari-Monos, a maior riqueza foi observada na Cachoeira, com 26 táxons de culicídeos amostrados. Apesar desse ponto de coleta não ser considerado um ambiente silvestre devido a intervenção antrópica, quando comparada ao Embura, Siloé e Borracharia, é o ponto que apresenta as características mais silvestres, inserido em ampla área de mata, com presença de uma cachoeira e criadouros naturais. A Borracharia, onde foi observada a segunda maior riqueza de táxons de mosquitos (20 táxons), é o ambiente considerado mais urbano dos quatro, pois está localizada no centro do bairro Engenheiro Marsilac, entretanto, atrás da Borracharia há uma área bem ampla de mata com elevada presença de criadouros naturais. O Siloé apresentou a terceira maior riqueza de táxons de mosquitos (17 táxons), fato que pode ser explicado por estar localizado próximo ao núcleo urbano de Marsilac e por ter a presença de animais domésticos e rurais que frequentam as áreas de mata ao seu arredor, com transição de mata-área urbana. A menor riqueza de mosquitos foi observada no Embura (15 táxons), que pode ser explicada por ser um ambiente periurbano, sem a presença de alto número de criadouros naturais.

A Trilha do Pinheirinho, no município de Mairiporã, foi o ponto de coleta que apresentou a maior riqueza de culicídeos amostrados (16 táxons), que pode ser explicada pelo fato de esse ponto ser um ambiente com que apresenta características silvestre, no Parque

Estadual da Cantareira. A segunda maior riqueza foi observada na Pedra Grande (12 táxons), local onde a sede administrativa está inserida, e pode ser explicada por ser um ponto com mata preservada ao redor. A menor riqueza de culicídeos foi observada na Trilha da Bica (9 táxons) que pode ser explicada por ser um ambiente periurbano. Então, é possível perceber, com relação aos indivíduos de mosquitos coletados na APA Capivari-Monos, que a Cachoeira amostrou tanto a maior abundância quanto a maior riqueza, a Borracharia revelou a menor abundância e uma das maiores riquezas, o Siloé amostrou um dos mais altos números de espécimes coletados e uma das mais baixas riquezas e o Embura revelou uma das abundâncias mais baixas a menor riqueza. Já no Parque Estadual da Cantareira, a Trilha do Pinheirinho amostrou tanto a maior abundância quanto a maior riqueza, a Pedra Grande revelou abundância e riqueza intermediária e a Trilha da Bica amostrou a menor abundância e menor riqueza.

A diversidade foi calculada através do índice de Shannon (S_H) somente para a APA Capivari-Monos, visto que foi a única área que amostrou espécies de mosquitos detectadas com infecção natural por *Flavivirus*, como DENV-2 e ZIKV. No entanto, o ponto que obteve a maior diversidade de espécies foi a Borracharia, mostrando que as espécies presentes nesse ponto estão distribuídas de forma mais uniforme com relação à Cachoeira, ao Embura e ao Siloé. Apesar de a Cachoeira ter sido o ponto de coleta que apresentou a maior riqueza, não obteve a maior diversidade. Isso porque não necessariamente o ambiente mais rico seja também o ambiente mais diverso, pois diversidade leva em consideração a riqueza e a uniformidade na distribuição de indivíduos entre os táxons do ambiente.

Com relação ao sexo dos espécimens mosquitos coletados, o número de fêmeas de mosquitos amostradas foi superior ao número de espécimes machos. Esse resultado é esperado considerando o tipo de armadilha utilizada (CDC luminosa automática), uma vez que as fêmeas são mais atraídas pela luz, pelo CO₂ e o ácido láctico. Já os machos foram atraídos pelos feromônios liberados por essas fêmeas coletadas. Dessas fêmeas, duas espécies, coletadas na APA Capivari-Monos, são incriminadas vetoradoras de patógenos, *An (Ker.) cruzii* e *Cx. (Cux.) quinquefasciatus*, ambos coletados na Cachoeira, Borracharia e Siloé. No Parque Estadual da Cantareira, duas espécies são incriminadas como vetoradoras, *Hg. (Con.) leucolelaenus*, coletada na Pedra Grande, Trilha da Bica e Trilha do Pinheirinho. As espécies discutidas a seguir foram amostradas neste estudo e são as mais relevantes em Saúde Pública.

- *Ad. (Ady.) suamapennis*: Apenas um indivíduo dessa espécie foi amostrado na Cachoeira, APA Capivari-Monos, corroborando com RIBEIRO et al. (2012) que coletou poucos indivíduos na mesma área de estudo. Esta espécie é ornitófila (CONSOLI e

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), ocorrendo em toda América Central e do Sul. Já foi encontrada naturalmente infectada com o vírus Gamboa e é considerada vetora de plasmódios de aves (BRASIL, 2007).

- *Ae. (Grg.) fluviatilis*: Uma pequena quantidade de mosquitos dessa espécie foram coletados, apenas na APA Capivari-Monos, dado que corrobora com a baixa quantidade que RIBEIRO et al. (2012) amostraram dessa espécie na mesma localidade. Indivíduos dessa espécie já foram detectados com sangue de animal doméstico e do homem (CARVALHO et al., 2014). No presente trabalho não foi amostrado essa espécie no Parque Estadual da Cantareira, entretanto, MONTES (2005) amostrou espécimes de *Ochlerotatus fluviatilis* e MUCCI et al. (2016) amostraram alguns exemplares de *Ae. fluviatilis* no mesmo parque. A capacidade de atuar na transmissão de YLV já foi provada em condições laboratoriais (DEGALLIER et al. 2001).

- *Ae. (Och.) scapularis*: Foram coletados poucos indivíduos dessa espécie, na Borracharia, na APA Capivari-Monos, corroborando com os achados de RIBEIRO et al. (2012) na mesma área de estudo, e na Trilha da Bica, no Parque Estadual da Cantareira corroborando com os achados de MUCCI et al. (2016). Essa espécie ocorre em toda América do Sul. Os vírus Ilhéus, Maguari, Mucambo, dentre outros (BRASIL, 2007), já foram isolados naturalmente nessa espécie. Esta espécie é considerada suspeita na transmissão do ROCV, e embora tenha comprovado competência para o ROCV, em condições laboratoriais (MITCHELL e FORATTINI, 1984), não foi encontrada com infecção natural (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Outros *Flavivirus* foram isolados nessa espécie em condições naturais (HERVÉ et al., 1986). Além disso, é apontada como vetor local, em Santa Catarina, de *Wuchereria bancrofti*. Um fato interessante é que CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA apontam que *Ae. scapularis* se desenvolvem apenas em criadouros no solo, nunca em recipientes, entretanto, SILVA e MENEZES, (1996) encontraram imaturos dessa espécie em desenvolvimento em um criadouro artificial não habitual e chamam atenção para o potencial de criação que esse tipo de recipiente pode promover para *Ae. scapularis*. É importante salientar que CARVALHO et al., (2014) detectou que essa espécie se alimentou em roedores, animais domésticos e homem, na natureza.

- *Ae. (Och.) crifer*: Coletados poucos indivíduos dessa espécie na APA Capivari-Monos, apenas na Cachoeira e no Siloé, corroborando com os achados de RIBEIRO et al. (2012) na mesma área de estudo. Não foi amostrado no Parque Estadual da Cantareira, sendo que MUCCI et al. (2016) encontrou resultado equivalente. No entanto, CAMARGO et al. (2018) coletaram

alguns indivíduos dessa espécie nesse parque. Essa espécie já foi detectada com sangue de aves e humanos (CARVALHO et al., 2014).

- *Ae. (Och.) serratus*: Foram amostrados alguns exemplares dessa espécie em quase todos os pontos de coletas na APA Capivari-Monos, corroborando com os achados de RIBEIRO et al. (2012), que coletaram esta espécie em grande quantidade na mesma área. Apesar de não ter sido amostrada no Parque Estadual da Cantareira, essa espécie circula na região (MUCCI et al., 2016). Possui importância epidemiológica uma vez que é considerada vetor secundária do ILHV (VASCONCELOS, et al., 1998) e naturalmente infectada com trocara vírus (TRAVASSOS-DA-ROSA et al., 1998). Ocorre em toda América Central e do Sul, foi detectada com sangue de aves e humanos (CARVALHO et al., 2014) e já foi isolada naturalmente portando AURAV, VEEV, SLEV, ILHV, OROV e UNAV (BRASIL, 2007).

- *Ae. (Stg.) albopictus*: Esta espécie ocorre em área de clima temperado e tropical (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Foi coletada apenas na Borracharia, na APA Capivari-Monos, corroborando com RIBEIRO et al. (2012) na mesma área, e na Trilha da Bica, no Parque estadual da Cantareira, porém em menor quantidade quando comparado aos achados de MONTES (2005) e MUCCI et al. (2016). Apesar da investigação do CHIKV não ter sido realizada neste estudo, não deve deixar de ser discutido que a APA Capivari-Monos e o Parque Estadual da Cantareira abrigam o *Ae. albopictus* e é importante salientar que é uma espécie potencial para disseminação desse vírus (MEASON e PATERSON, 2014), pois KUCHARZ e CEBULA-BYRSKA et al. (2012) apontam que este mosquito pode ser um bom vetor em regiões em que *Ae. aegypti* não são encontrados em abundância. Embora o *Ae. albopictus* seja um mosquito que se refugia em áreas mais florestadas (LIMA-CAMARA, 2006; HEINISCH et al., 2019) é um vetor de hábito diurno eclético e oportunista, criando-se em criadouros naturais e artificiais (FORATTINI, 2002). É vetor principal do DENV no continente asiático (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Esse mosquito foi incriminado como sendo vetor principal do CHIKV durante as epidemias da Micronésia (VAZEILLE-FALCOZ et al., 2007) e Europa (BONILAURI et al., 2008), também é vetor secundário do vírus da dengue (GUZMAN et al., 2003; WEAVER e REISEN, 2010) e vetor potencial para CHIKV (VEGA-RÚA et al., 2014; FERREIRA-DE-LIMA e LIMA-CAMARA, 2018) e ZIKV nas Américas (FERREIRA-DE-LIMA e LIMA-CAMARA, 2018).

- *Cq. (Rhy.) chrysnotum*: São mosquitos zoofílicos ecléticos e oportunistas. Além de grande e agressivos, são pragas, principalmente em áreas rurais (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). As fêmeas ovipõe sob folhas de plantas flutuantes,

submersos na água. Ocorre em toda América do Sul e é comum no Brasil. É considerada como potencial vetora de alguns arbovírus (HERVÉ et al., 1986; FORATTINI, 1965). É considerada um mosquito que causa incômodo para a população humana que se encontra próximo aos criadouros, pois é uma espécie agressiva e numerosa (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). *Cq. chrysonotum/albifera*: Foi amostrada na APA Capivari-Monos, apenas na Cachoeira e na Borracharia, corroborando com RIBEIRO et al. (2012) que também coletou esse táxon, porém, em grande quantidade, principalmente em locais com intervenção antrópica. *Cq. albifera* também ocorreu em pouca quantidade, dado que corrobora com os de RIBEIRO et al. (2012) nessa mesma área de estudo.

- *Cq. (Rhy.) venezuelensis*: Possuem as mesmas características e hábitos que *Cq. chrysonotum* e também ocorre em toda América do Sul, sendo comum no Brasil. Essa espécie foi pouco amostrada na APA Capivari-Monos, porém RIBEIRO et al. (2012) coletaram uma grande quantidade nessa mesma área de estudo. Apesar de não ter sido amostrado nenhum exemplar no Parque Estadual da Cantareira, essa espécie ocorre no local uma vez que foi coletada por MONTES (2005). Desse mosquito, já foram isolados os vírus BSQV, Guama, Mucambo (BRASIL, 2007) e OROV (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; Forattini, 2002; BRASIL, 2007). Bem como *Cq. chrysonotum*, *Cq. venezuelensis* também é fator de incômodo, sendo agressiva e geralmente numerosa (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). CARVALHO et al. (2014) detectaram sangue de animal doméstico e do homem nessa espécie.

- *Cx. (Cux.) nigripalpus*: Presente na região tropical das Américas, essa espécie foi amostrada nas duas UC's, exceto no ponto Embura. Se desenvolvem em criadores naturais ou artificiais, com águas poluídas ou não, possui hábito noturno, de comportamento exofílico, comum em ambientes silvestres e periurbano. São mosquitos principalmente ornitófilos, porém podem se alimentar em roedores, animais domésticos e no homem, conforme demonstrou CARVALHO et al., 2014. Foi incriminada como transmissor de SLV durante uma epidemia ocorrida na Flórida (DAY e CURTIS, 1993). O SLV já foi isolado de aves da Mata Atlântica (FERREIRA et al., 1994) e ROCCO et al. (2005) isolaram pela primeira vez o SLV de humano residente na cidade de São Pedro, estado de São Paulo.

- *Hg. (Con.) leucocelaenus*: Ocorre em boa parte da América (BRASIL, 2007) e frequente no Brasil (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). São espécies silvestres, se desenvolvem em criadouros naturais (FORATTINI, 2002). CERETTI-JÚNIOR et al. (2014) coletaram fases imaturas em internódios de bambu no Parque

Anhanguera, cidade de São Paulo. Por possuírem aptidão para voarem longas distâncias (raio de aproximadamente 6km) podem atingir fragmentos de mata isolados por ação antrópica (IOC/FIOCRUZ, 2018). Essa espécie foi amostrada em todos os pontos de coleta do Parque Estadual da Cantareira, achados que corroboram com MUCCI et al. (2016) os quais apontam que é uma espécie amplamente espalhada por todo Parque Estadual da Cantareira. *Hg. (Con.) leucocelaenus* não foi coletada na APA Capivari-Monos, corroborando com RIBEIRO et al. (2012). É vetora do YFV no ciclo silvestre (SOUZA et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; MUCCI et al., 2016). Além disso, já foi encontrada com infecção natural por YFV, ILHV, MAGUARI, UNAV e Wyeomyia vírus (BRASIL, 2007). Por possuírem aptidão para voarem longas distâncias (raio de aproximadamente 6km) podem atingir fragmentos de mata isolados por ação antrópica (IOC/FIOCRUZ, 2018). É uma espécie amplamente espalhada por todo Parque estadual da Cantareira (MUCCI et al., 2016).

- *Ma (Man.) titilans*: Apenas um indivíduo foi coletado, no Siloé. RIBEIRO et al. (2012) não amostram essa espécie no estudo da APA Capivari-Monos. Possuem praticamente as mesmas características que *Cq. sp.* Espécie com ampla distribuição nas Américas, frequente no Brasil, de hábito diurno ou noturno, sendo mais comum no crepúsculo vespertino, comumente exofílico, podendo ser exofágico e endofágico (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Já foi encontrada portando VEEV na natureza (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Uma espécie do gênero *Mansonia* foi detectada com infecção natural por ZIKV, na África (DIALLO et al., 2014).

- *Ps. (Jan) ferox*: Apenas um exemplar foi amostrado na Trilha do Pinheirinho, no Parque Estadual da Cantareira, corroborando com os resultados de MUCCI et al. (2016) que também coletaram essa espécie na Trilha do Pinheirinho. Entretanto, apesar de RIBEIRO et al. (2012) coletarem essa espécie na APA Capivari-Monos, no presente trabalho essa espécie não foi amostrada nessa área de estudo. Trata-se de uma espécie encontrada em toda América do Sul (BRASIL, 2007). É um potencial vetor de YFV silvestre (FORATTINI, 2002; MUCCI et al., 2016), já foi encontrada portando os vírus Ilhéus, Maguari, Mayaro, Una, dentre outros, na natureza (HERVÉ et al., 1986; BRASIL, 2007). Durante o surto do ROCV, no Vale do Ribeira, em meados da década de 1970, foi incriminada vetora de ROCV (LOPES, et al., 1981).

- *Ru. (Run.) reversa*: Foi uma das espécies mais abundantes nas duas UC's, não sendo amostrada apenas na Trilha da Bica, no Parque Estadual da Cantareira. São de hábito silvestre e diurno, se desenvolvem em criadouros artificiais como bromélias, com adaptabilidade para acrodendrofilia (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), entretanto na APA

Capivari-Monos foi mais abundante na copa das árvores. Se alimentam de mamíferos com certa “timidez”, dos quais o homem pode estar incluso (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As demais espécies coletadas neste estudo não apresentam grande importância epidemiológica até o momento. *Ae. aegypti* não foi coletado neste estudo, resultado que corrobora com RIBEIRO et al. (2012) na APA Capivari-Monos e com MONTES (2005) no Parque Estadual da Cantareira, fato que pode ser explicado pelo método de coleta aplicado e o local, sendo apenas para mosquitos adultos em áreas de mata. Contudo, uma pequena quantidade de imaturos dessa espécie já foram coletados no Parque Estadual da Cantareira por MUCCI et al. (2016) e por CAMARGO (2018) na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira, em criadouros artificiais. É importante notar que espécies com características silvestres que são vetoras de arbovírus podem ser encontradas nos mesmos ambientes que o *Ae. aegypti*. O *Ae. aegypti* pode servir como ponte para disseminação de vírus em ciclos de transmissão dentro dessas áreas para outras localidades, uma vez que a grande maioria das cidades oferecem condições para abrigar essa espécie sinantrópica. Assim, a população vive sob o risco de contrair diversas doenças causadas por agentes etiológicos transmitidos por este mosquito (MORAIS e NATAL, 2017).

Para o isolamento de *Flavivirus* optou-se por inoculação em cultura celular (células C6/36) por ser uma técnica barata, de alta especificidade e implantada há algumas décadas na rotina de muitos laboratórios de referência para aplicação em diagnósticos (GUBLER, 2001; ROCO, 2005). Assim, os *pools* detectados com *Flavivirus* foram direcionados para a técnica a técnica de RT-qPCR, que foi selecionada pelas vantagens que apresenta. Embora seja uma técnica cara, possui maior sensibilidade, precisão, velocidade na análise gerando resultados quantitativos e de forma mais rápida e precisa, além de ter menor risco de contaminação, em comparação com a PCR convencional (NOVAIS et al., 2004; ROMEIRO et al., 2016). As espécies *An. cruzii*, *Cx. vaxus*, *Li. durhamii* e *Wy. confusa* e mosquitos pertencentes ao táxons *Cx. sp*, coletados na APA Capivari-Monos, foram detectadas com infecção natural por *Flavivirus*. *An. cruzii*, coletada na Cachoeira, *Li. durhamii* e *Wy. confusa*, coletados no Siloé, foram encontradas na natureza portando o ZIKV. Por meio de buscas conduzidas nas principais bases de pesquisas online (Medline, SciELO e Lilacs) não foram obtidos resultados equivalentes na literatura, sugerindo, assim, que esse é o primeiro registro dessas espécies infectadas naturalmente por ZIKV. Já no caso dos táxons *Cx. vaxus* e *Cx. sp* foram detectados na natureza portando DENV-2, ambos oriundos na Cachoeira. Buscas nas principais bases de

pesquisas online (Medline, SciELO e Lilacs) também foram conduzidas. Para *Cx. vaxus* não foram obtidos resultados equivalentes na literatura, sugerindo, então, que esse também é o primeiro registro dessa espécie portando DENV-2, na natureza. Entretanto, para *Cx. sp* foi encontrado resultados semelhantes. Todas essas espécies estão descritas a seguir.

- *An. cruzii*: foi o táxon mais abundante da APA Capivari-Monos. Esse resultado corrobora com os achados de RIBEIRO et al. (2012) e DUARTE et al. (2013), pois ambos coletaram diversos anofelinos na mesma área, dos quais *An. cruzii* foi o mais abundante, sendo 5.371 e 6.566 exemplares para cada um desses estudos, respectivamente. O resultado obtido no presente trabalho também corrobora com KIRCHGATTER et al. (2014) e BOCATO-CHAMELET (2001), ambos realizados em Juquitiba, região de Mata Atlântica no estado de São Paulo. KIRCHGATTER et al. (2014) coletaram 13.441 espécimes de *An. cruzii*, sendo a espécie mais abundante e BOCATO-CHAMELET (2001) coletaram 1.295 exemplares dessa espécie, sendo, também, a espécie mais abundante do estudo. SANTOS-NETO e LOZOVEI (2008), em um estudo realizado em outra região de Mata Atlântica, local próximo à planície litorânea do estado do Paraná, estado fronteiro ao estado de São Paulo, coletaram 617 *An. cruzii*, sendo, também, a espécie mais abundante. Essa espécie é comumente restrita ao litoral brasileiro, do Nordeste ao Rio Grande do Sul e segue a distribuição original da Mata Atlântica (FORATTINI, 2002; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). DEANE et al. (1971) coletaram 2.605 indivíduos dessa espécie na região do Parque Estadual da Cantareira e Horto Florestal Alberto Löefgren. Até a década de 1980, o *An. cruzii* era coletado em abundância na região do Parque Estadual da Cantareira (DEANE et al., 1971, 1984). CAMARGO (2018) coletou 257 larvas de *An. cruzii*, no período de fevereiro de 2015 a abril de 2017, no Parque Estadual da Cantareira. Entretanto, nesse trabalho, nenhum exemplar dessa espécie foi amostrado nessa área, corroborando com MONTES (2005), que também demonstrou ausência da espécie.

É importante salientar que essa espécie possui importância epidemiológica uma vez que é uma das vetoras primárias da malária autóctone que ocorre na região de Mata Atlântica, basicamente apenas no Sudeste e Sul Brasil (malária extra-amazônica) (FORATTINI, 2002; PINA-COSTA et al., 2014; LAPORTA e SALLUM, 2014). No subdistrito de Parelheiros, região da APA Capivari-Monos, de 2008 a 2013 ocorreram 64 casos autóctones de malária (Duarte et al., 2013). Os agentes etiológicos são os protozoários dos gêneros *Plasmodium vivax*, considerado o principal, *P. malariae* e *P. falciparum* (PINA-COSTA e SALLUM, 2014). Nesse bioma, devido à abundância de Bromélias, planta da família Bromeliaceae, a malária é

conhecida como Bromélia-malária, porque as formas imaturas do *An. cruzii* se desenvolvem impreterivelmente na água acumulada nas imbricações entre as axilas desse criadouro natural (FORATTINI, 2002; PINA-COSTA et al., 2014; LAPORTA e SALLUM, 2014), com maior adaptabilidade em bromélias epífitas e no solo (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). É possível dizer que a elevada abundância de *An. cruzii*, que este trabalho registrou na APA Capivari-Monos, está diretamente relacionada com a alta disponibilidade de criadouros naturais (bromélias) e, também, com a umidade relativa do ar proveniente das chuvas e da sua vagarosa evaporação (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Esse é o perfil encontrado nessa área, já que se trata de uma floresta úmida, com bromélias sombreadas pela copa das árvores e fronteira com a Serra do Mar.

An. cruzii é vetor de malária simiana tanto nas Américas, principalmente no Brasil, transmitindo os dois plasmódios de macacos *P. brasilianum* e *P. simium*, ambos podem infectar o homem (DEANE et al., 1970), essa enzootia é restrita na área geográfica onde o vetor é encontrado (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Em algumas regiões podem ocorrer a malária simiana e a humana concomitantemente (DEANE et al., 1971). Essa espécie é encontrada no peridomicílio (KIRCHGATTER et al. (2014) e em ambientes silvestres, se refugiam na mata (exofilia), cujo maior período de atividade hematofágica ocorre no crepúsculo vespertino, todavia, podem picar tanto de dia quanto à noite. Porém, apesar do hábito exofílico, podem invadir as residências com facilidade e elevada incidência para realizar a hematofagia, principalmente em áreas muito úmidas e em determinadas épocas do ano em que a densidade desse mosquito é alta (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA).

A maioria dos exemplares foram provenientes da copa das árvores, corroborando com os achados de CAMARGO (2018), cuja maioria das larvas de *An. cruzii* foram coletadas em bromélias epífitas. Esses dados são sustentados pela observação feita por DEANE et al., (1971), em pouco mais de seis anos de estudo (na área do Parque Estadual da Cantareira), a qual constatou que para essa região, o único anofelino coletado em abundância próximo à copa das árvores era *An. cruzii*. Um fato biológico que possivelmente explica o comportamento acrodendrófilo desses mosquitos é que sua principal fonte de alimentação (PNH dos gêneros *Allouata*, *Cebus*, *Callithrix* e *Callicebus*) é encontrada no dossel florestal (DEANE et al., 1971, 1984). Contudo, em regiões de elevada umidade, o *An. cruzii* é mais comum no nível do solo, fato evidenciado por DEANE et al., (1984) quando demonstraram a dispersão vertical dessa espécie em uma área litorânea de Santa Catarina, cuja maioria dos espécimes foram coletados no nível do solo. É importante destacar que o *An. cruzii* é oportunista e eclético se alimentando

em aves e outros mamíferos, inclusive o ser humano quando este adentra à mata ou quando o mosquito invade as residências (DEANE, 1976; CONSOLI e LOURENÇO –DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1996, 2002). O fato de 39 indivíduos dessa espécie terem sido amostrados no nível do solo pode ser explicado pelo seu comportamento oportunista e eclético e, também, possivelmente pela umidade encontrada na região da APA por esta ser fronteira à Serra do Mar. Embora *An. cruzii* não tenha sido amostrado neste trabalho no Parque Estadual da Cantareira, é sabido que essa espécie circula nessa região, portanto mais estudos relacionados à essa espécie, no âmbito da investigação de arbovírus, são realmente necessários nessa UC, bem como estudos que tangem à malária-bromélia, visto que há presença de hospedeiros reservatórios para manter o ciclo desses patógenos.

Apesar dos anofelinos serem mais conhecidos por transmitirem parasitas, um *pool* contendo 10 indivíduos de *An. cruzii* foi detectado com infecção natural por ZIKV, neste trabalho. Embora existam registros de duas espécies desse gênero, *An. (Ano.) coustani* e *An. (Cel.) gambiae*, infectadas naturalmente com ZIKV, na África (EPELBOIN et al., 2017), não foram encontrados relatos da espécie *An. cruzii* infectada naturalmente, e nem artificialmente, pelo ZIKV. EPELBOIN et al., (2017) destacam que *An. cruzii* também são responsáveis por transmitirem O'nyong-nyong vírus (*Alphavirus*), este vírus é intimamente relacionado com o CHIKV. Infecção por ZIKV foi detectada em 10 espécies de *Aedes*, uma de *Mansonia* e uma de *Culex* (DIALLO, 2016). No entanto, DODSON e RASGON (2017) concluem, por meio de infecção artificial de ZIKV, que duas espécies de *Anopheles*, *An. gambiae* e *An. stephensi*, são refratários para essa infecção, e DODSON et al., (2018) demonstram que é improvável que *An. freeborni* e *An. quadrimaculatus* estejam envolvidas na transmissão de ZIKV, na América do Norte. É significativo ressaltar que essa espécie também já encontrada naturalmente infectada com o vírus do Iguape (*Flavivirus*) em 1994, em Juquitiba, estado de São Paulo (BOCATO-CHAMELET et al., 2001). Contudo, BOCATO-CHAMELET et al., (2001) salienta que mais estudos sejam realizados, principalmente no âmbito da competência e da capacidade vetorial, que são necessários para correlacionar esse possível transmissor ao vírus do Iguape, porém enfatiza que o vírus está associado ao ecossistema de forma intrínseca uma vez que foi detectado em condições naturais.

A espécie *Li. durhamii* e *Wy. confusa* também foram detectadas com infecção natural pelo ZIKV, ambas coletadas no Siloé. Esses dois mosquitos pertencem à tribo Sabethini, têm relações filogenéticas muito próximas uma da outra e, como alguns outros membros dessa tribo, apresentam dificuldades na identificação dos gêneros (CONSOLI e LOURENÇO-DE-

OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2008). Embora sejam vetores potenciais ou até mesmo comprovados de algum arbovírus, se ocorrer o isolamento viral em algum espécime o vírus isolado, muitas vezes, será associado ao nome genérico dado ao espécime, portanto, a importância médica desses mosquitos é considerada mais restrita (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

- *Wy. confusa*: Essa foi a espécie mais abundante no Parque Estadual da Cantareira, dado que corrobora com MONTE (2005) uma vez que essa espécie foi uma das mais abundantes na mesma área de estudo. Esse resultado também corrobora com FORATTINI et al. (1968), sendo a espécie mais abundante no estudo do município de Salesópolis. No entanto, ao comparar o número de espécimes coletados no mesmo ponto, Pedra Grande, MONTE (2005) amostrou apenas 15 exemplares em 240 coletas, enquanto que neste trabalho 72 indivíduos foram amostrados, em 14 coletas. Quando somados todos os exemplares de *Wy. confusa*, coletados tanto na APA Capivari-Monos quanto no Parque Estadual da Cantareira, essa foi a espécie mais abundante deste trabalho, com 318 indivíduos. Isso mostra que, apesar dessa espécie não estar distribuída de forma uniforme em todos os pontos de coleta dessas duas UCs e de não ter sido amostrada na Borracharia, pode-se perceber que tem ampla distribuição e está estabilizada em ambas as áreas de estudo.

Trata-se de uma espécie de ambiente silvestre (FORATTINI et al., 1968), cujos criadouros são os mesmos que do *An. cruzii*, água acumulada entre as axilas de bromélias, sendo raros registros em outros tipos de criadouros (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Entretanto, foi registrado a ocorrência dessa espécie em ambientes com maior intervenção antrópica (Pedra Grande, Trilha da Bica, Cachoeira, Embura e Siloé). São mosquitos de hábito diurno e podem se alimentar na copa das árvores, contudo, são mais comumente encontrados no nível do solo (FORATTINI et al., 1968), circunstância que corrobora com estrato em que os exemplares de *Wy. confusa* foram coletados em cada UC deste estudo, sendo 154 no Parque Estadual da Cantareira e 80 na APA Capivari-Monos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). É uma espécie eclética em sua alimentação e, portanto, pode ser atraída pelo ser humano em alta quantidade de indivíduos e rodeá-lo por um curto período de tempo até o momento da picada. *Wy. confusa* costuma reagir em menor grau ao picar seus hospedeiros com relação aos culicídeos da tribo Aedini, por exemplo, que reagem prontamente ao serem atraídos pelo homem e em maior grau com relação à picada (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O *pool* dessa espécie infectada com ZIKV foi proveniente da copa das árvores, com apenas dois indivíduos. Essa espécie já foi detectada

portando arbovírus na natureza, porém, informações sobre sua importância médica são escassas (FORATTINI, 2002).

- *Li. durhamii*: as fêmeas dessa espécie têm o voo relativamente delicado quando comparado ao voo dos culicídeos da tribo Aedini, assim, conseguem se alimentar em seus hospedeiros com facilidade, inclusive no homem. (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). São mosquitos silvestres (HARBACH, 2008) que ocorrem na maioria dos países sul-americanos (BRASIL, 2007; HARBACH, 2008) e possuem hábito diurno (HERVÉ et al., 1986). A maioria desses exemplares foram coletadas no nível do solo, sendo 48 na APA Capivari-Monos e 20 no Parque Estadual da Cantareira, corroborando com CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994) que afirmam que essas espécies são atraídas para o nível do solo pelos seus hospedeiros naturais como PNH e aves (HERVÉ et al., 1986), entretanto, podem ser atraídos pelo ser humano (FORATTINI, 2002). Se desenvolvem em criadouros naturais como internódios de bambu, cascas de frutos, folhas caída, conchas de caracóis, buracos em rochas e em árvores e axila de folhas de bananeiras. No entanto, também é comum se desenvolverem em pequenos criadouros artificiais como latas, recipiente de vidros e plásticos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2008; MEDEIROS-SOUSA et al., 2015), pneus (ZEQUI et al., 2005) dentre outros deixados pelo homem na mata.

Um fato interessante é que as larvas de *Li. durhamii* têm sido encontradas em criadouros com larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; ZEQUI et al., 2005). CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994) e LOPES (2002) destacam que *Li. durhamii* é o Sabethini com os níveis mais avançados na adaptação aos ambientes antropizados. Essa espécie, apesar de ter hábitos silvestres, vem sendo encontrada com frequência e em abundância tanto em criadouros naturais quanto em artificiais em áreas alteradas pelo homem, mas sempre associada à vegetação em locais sombreados (LOPES, 2002). Embora *Li. durhamii* não tenha sido a espécie mais abundante na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira está dentre as mais abundantes nessas duas UCs. Sendo assim, os registros de *Li. durhamii* corroboram com os dados de ZEQUI et al. (2005), os quais descreveram resultados similares na reserva florestal Mata Daher, em Londrina, Paraná. Quando comparado o número de exemplares de *Li. durhamii* amostrados nessas duas áreas com o número dos exemplares coletados em áreas verdes, espalhadas pela cidade de São Paulo, verifica-se uma certa diferença. Ainda que essa espécie possua adaptabilidade de se refugiar em ambientes que sofrem com a influência antrópica ela foi registrada em menor abundância, conforme mostram os dados relatados por MEDEIROS-SOUSA et al. (2013a,b, 2015, 2017);

CERETTI-JUNIOR et al., (2014, 2016); PAULA et al. (2015) e CARVALHO et al. (2017), e algumas áreas verdes essa espécie não foi amostrada, como no parque Ibirapuera (CERETTI-JUNIOR et al., 2015).

Embora esse trabalho mostre a primeira infecção natural por ZIKV em *Li. durhamii*, não é a primeira vez que essa espécie é reportada portando arbovírus. Há relatos de *Li. durhamii* portando os vírus Guama, Tucunduba (HERVÉ et al., 1986; BRASIL, 2007) e Maguari (BRASIL, 2007). O Guama vírus circulam em áreas florestadas, cujos reservatórios são pequenos roedores que vivem no solo e marsupiais arbóreos, entretanto, alguns PNH e morcegos à priori são apenas hospedeiros causais (HERVÉ et al., 1986). O Tucunduba vírus e o Maguari vírus fazem parte do grupo Bunyawera (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998). Este primeiro foi isolado em mosquitos com hábitos noturnos e diurnos (HERVÉ et al., 1986) e o segundo, intimamente relacionado com o vírus Cache Valley (*Orthobunyavirus*) (IVERSSON 1993; SCHMALJOHN e NICHOL, 2001) foi detectado em circulação entre cavalos no Pantanal (IVERSSON 1993). Esses três vírus já foram isolados em mosquitos na região da Amazônia, entre 1954 e 1994 (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998). HARBACH (2008) destaca que apesar de mosquitos do gênero *Limatus* terem sido isolados com o vírus Wyeomyia, em Trinidad, e a espécie *Li. flavisetosus* já ter sido isolada com VEEV é improvável que as espécies do gênero *Limatus* tenham importância epidemiológica ou mesmo econômica para o homem. Entretanto, diante da gravidade que o ZIKV denota para a Saúde Pública, mais estudos envolvendo essa espécie devem ser realizados, principalmente no que tange às investigações de arbovírus.

- *Cx. vaxus*: Os mosquitos da espécie *Cx. vaxus* conservam características comportamentais típicas de mosquitos de hábito silvestre devido à fraca adaptabilidade à área de mata ciliar reduzida (LOPES e LOZOVEI, 1995). Essa espécie está dentre as mais abundantes coletadas na APA Capivari-Monos e no Parque Estadual da Cantareira, corroborando com MONTES (2005) e HUTCHINGS et al. (2005), que apresentaram resultados similares com relação à abundância dessa espécie no Parque Estadual da Cantareira e na região Amazônica, respectivamente. Um fato interessante é que apesar de essa espécie ter caráter silvestre, não foi amostrado nenhum exemplar na Trilha do Pinheirinho, local com características silvestres, no Parque Estadual da Cantareira. No entanto, ocorreu em abundância na Pedra Grande, corroborando com os achados de MONTES (2005) que coletou no mesmo local. As informações sobre essa espécie ainda são bastante escassas, cuja maioria delas são voltadas para os membros do subgênero *Melanoconion* em geral. Não foram encontrados

relatos dessa espécie, na literatura, portando vírus. Neste trabalho, um *pool* contendo quatro exemplares de *Cx. vaxus* foi isolado com infecção natural por DENV-2.

As espécies do subgênero *Melanoconion* são ecléticos se desenvolvem em uma gama de criadouros, naturais sem salinidade, desde grandes porções de água no solo (lagos, charcos e bolsões de rios) a criadouros naturais como bromélias (CONSOLI e LOURENÇO-DEOLIVEIRA, 1994) e artificiais (FORATTINI, 2002). Podem se alimentar em animais silvestres, domésticos e até no ser humano, podendo se envolver facilmente em ciclos naturais de arbovírus (FORATTINI, 2002). Algumas espécies do subgênero *Melanoconion* já foram comprovadas atuando na transmissão de patógenos em vários países, inclusive no Brasil (HERVÉ et al., 1986; CONSOLI e LOURENÇO-DEOLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). O *Cx. pedroi* ocorre em toda América do Sul e foi encontrada naturalmente infectada pelos vírus Ananindeua, Capim, EEEV, Guama, Oriboca (BRASIL, 2007) e WEEV, além de ser vetor potencial do VEEV; FORATTINI, 2002; FERRO et al., 2008). O *Cx. spissipes*, ocorre no Brasil e em outros países das Américas, é vetor potencial dos vírus Bimiti, Caraparu, Oriboca e Itaqui (*Orthobunyavirus*) e VEEV (SHOPE et al., 1988; WALTON e GRAYSON, 1988). O *Cx. portesi* pode estar envolvida no ciclo do Mucambo vírus no nordeste da América do Sul (AITKEN, 1972).

- *Cx. sp*: Alguns exemplares coletados em ambas UCs foram catalogados no táxon *Cx. sp* devido à imprecisão na identificação morfológica. É provável que esses espécimes sejam *Cx. chidesteri*, *Cx. dolosus/eduardoi*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. quinquefasciatus* ou pertença ao grupo Coronator, pois são espécies que foram amostradas nas duas áreas de estudo. Um *pool* contendo seis indivíduos do gênero *Culex* e subgênero *Culex* foram detectados naturalmente infectados com DENV-2. Apesar de algumas espécies do gênero *Culex* ter sido encontradas portando vírus na natureza, CONSOLI e LOURENÇO-DE OLIVEIRA apontam que a importância epidemiológica não é tão grande quanto a do *Cx. quinquefasciatus*. De todas as espécies de *Culex*, *Cx. quinquefasciatus* foi a mais abundante e foi amostrada na Borracharia, Cachoeira e Siloé. Não ocorreu em nenhum ponto do Parque Estadual da Cantareira, corroborando com os dados de MONTES (2005). Os locais onde essa espécie é encontrada indicam alto grau de antropização (FORATTINI, 2002). A região metropolitana de São Paulo é infestada de *Cx. quinquefasciatus* (FORATTINI, 1973), pois criadouros a céu aberto com alto teor de matéria orgânica, como o rio Pinheiros, oferecem condições ótimas para o desenvolvimento e proliferação dessa espécie altamente antropofílica (MORAIS et al., 2006). Esse mosquito tem o hábito noturno, endofílico e endofágico, sendo o homem o principal hospedeiro, entretanto,

também possui hábito ornitófilo (FORATTINI, 2002; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

É crucial destacar que, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2018d) o DENV-2 é o mais agressivo e está circulando com maior frequência, pois, atualmente, é responsável por 54,3% das infecções. Embora *Cx. quinquefasciatus* tenha sido infectado, experimentalmente, com DENV-2, por via parenteral, a replicação desse vírus foi detectada baixos níveis que gerou alta quantidade de partículas não infecciosas (et al., 1999). Além disso, essa espécie não se infectou com o DENV-2 quando por meio de via oral com sangue infectado chegou a infectar 100% das fêmeas de *Ae. aegypti* utilizadas no estudo (VAZEILLE-FALCOZ et al., 1999). Dessa forma, segundo os resultados obtidos, VAZEILLE-FALCOZ et al., 1999 acreditam que *Cx. quinquefasciatus* não atua como vetor de DENV-2. Indivíduos dessa espécie, coletados em Cuiabá, Mato Grosso, foram isolados com infecção natural de DENV-4 (SERRA et al., 2016), de ZIKV na região de Recife que apresentou elevada incidência de microcefalia (GUEDES et al., 2017). É fundamental destacar que a competência vetorial de *Cx. quinquefasciatus* na transmissão de ZIKV foi provada. GUEDES et al., (2017) por meio de experimentos de competência vetorial alimentaram artificialmente essa espécie com sangue infectado por ZIKV e o vírus foi detectado no intestino médio, glândulas salivares e saliva. Porém, estudos de capacidade vetorial dessa espécie são necessários para elucidar essa incógnita. O MAYV também já foi isolado de espécimes de *Cx. quinquefasciatus* coletados em Cuiabá (SERRA, 2016). Essa espécie é vetora de *Wuchereria bancrofti*, atualmente, restrita na região de Pernambuco (FORATTINI, 2002). Essa espécie já foi isolada com infecção natural por OROV (CARDOSO et al., 2015).

O vírus da febre amarela (YFV) não foi detectado nas amostras de mosquitos coletados no Parque Estadual da Cantareira. Entretanto, acredita-se que se as coletas tivessem perdurado até o final do ano de 2017, talvez houvesse a possibilidade de isolamento viral do YFV, pois em outubro de 2017 houve detecção dos primeiros casos positivos de febre amarela silvestre em dois PNH no município de Mairiporã, onde está localizada a Trilha do Pinheirinho. O presente trabalho e MUCCI et al. (2016) registraram a presença de um dos principais vetores da febre amarela silvestre, o *Haemagogus leucocelaenus*, na Trilha do Pinheirinho, bem como na Trilha da Bica e Pedra Grande. É bastante provável que essa espécie tenha tido participação na disseminação do vírus no último surto da doença que atingiu o estado de São Paulo de forma devastadora, no final de 2017, apesar de MUCCI et al. (2016) alertarem para os riscos de reemergência desta arbovirose.

A Borracharia, apesar de ser um ambiente com intervenção antrópica, mostrou que existe uma relação entre a menor abundância, alta riqueza e maior diversidade, pois nenhum táxon, portando *Flavivirus* na natureza, foi amostrado nesse ponto. Sugerindo, assim, que as espécies presentes nesse ponto estão distribuídas mais uniformemente, com relação aos outros três pontos. Além disso, pode-se perceber que a abundância influencia na detecção de espécies portadoras de *Flavivirus* na natureza. Também é possível inferir que o fato de nenhuma espécie ter sido detectada portando *Flavivirus* nesse ponto não significa que não circulem espécies naturalmente infectadas na Borracharia. A Cachoeira apresentou a maior riqueza e abundância, entretanto, apesar de possuir as características mais silvestres, obteve baixa diversidade. Dois *Flavivirus* (DENV-2 e ZIKV) foram detectados em espécies provenientes desse ponto, o que mostra que quanto maior a abundância de espécimes maior as chances de *Flavivirus* serem detectados. Como esses *Flavivirus* diferentes foram detectados infectando naturalmente três táxons de mosquitos, *An. cruzii*, *Cx. vaxus* e *Cx. sp.*, esse fato pode estar relacionado com a alta riqueza encontrada na Cachoeira, pois somente neste ponto três táxons e dois *Flavivirus* foram identificados, sugerindo, assim, que ambientes de maior riqueza e maior abundância são mais propensos de se detectar espécies de mosquitos com infecção natural por *Flavivirus*.

O mesmo observado na Cachoeira pode ser notado no Siloé, pois a riqueza e a abundância foram relativamente altas enquanto a diversidade foi a menor. Nesse ponto foram duas as espécies de culicídeos detectadas com infecção natural, ambas com ZIKV. Sugerindo, então, que essa relação pode ser explicada pelo fato desse ponto de coleta ter obtido uma das maiores riquezas e abundâncias. Além disso, as espécies não estão distribuídas de forma tão uniforme quanto observado nos outros três pontos. Ademais, é importante destacar que foram detectadas duas espécies infectadas naturalmente com o mesmo *Flavivirus*. O mesmo que foi observado na Borracharia com relação à abundância e à diversidade pode ser verificado no Embura, visto que abundância foi baixa e diversidade alta. Entretanto a riqueza foi baixa. Nenhuma espécie, oriunda desse ponto de coleta, foi detectada com infecção natural por *Flavivirus*, sugerindo que quando a diversidade é alta é mais raro a detecção de espécies de mosquitos infectadas naturalmente com *Flavivirus*.

É crucial observar que os cinco táxons detectados com infecção natural por *Flavivirus* estão entre os mais abundantes, amostrados em ambas UC's. É bastante relevante que as espécies de mosquitos, amostradas neste trabalho, registradas na APA Capivari-Monos sejam inclusas no seu plano de manejo, atualizado pela última vez há mais de oito anos, para que toda comunidade tenha acesso às informações a respeito de quais mosquitos circulam na região, bem

como espécies detectadas com infecção natural por arbovírus. O mesmo deve ser feito para o Parque Estadual da Cantareira. Como há apenas 11 espécies em comum neste trabalho com o trabalho de MONTES (2005), é indispensável que seja feita uma atualização do número de espécies que circulam no Parque Estadual da Cantareira em seu plano de manejo, o que é de extrema importância para que todos possam ter acesso à essa informação das espécies presentes na região e as detectadas portando arbovírus na natureza. Além disso, esses primeiros registros de isolamento de *Flavivirus* como DENV-2, em mosquitos *Cx. vaxus* e *Cx. sp.*, e ZIKV, em mosquitos *An. cruzii*, *Li. durhamii* e *Wy. confusa*, naturalmente infectados, provenientes da APA Capivari-Monos, são fundamentais aos estudos de entomologia médica e epidemiologia, pois pode haver uma possível participação dessas espécies na disseminação desses *Flavivirus*. Contudo, apenas a detecção desses *Flavivirus* nessas espécies não as incriminam como vetoras, sendo imprescindíveis estudos que envolvam a competência e a capacidade vetorial dessas espécies para que seus papéis como transmissoras desses *Flavivirus* sejam comprovados.

6. CONCLUSÃO

- Foram amostrados 1216 espécimes de culicídeos, em ambas Unidades de Conservação, catalogados em 42 táxons, pertencentes a 13 gêneros. Os *Flavivirus* foram investigados nessa fauna e cinco táxons foram detectados com infecção natural por *Flavivirus*.
- Dois *Flavivirus* comuns foram detectados em cinco táxons de culicídeos, na APA Capivari-Monos. O DENV-2 foi isolado de *Cx. vaxus* e *Cx. sp.* O ZIKV foi isolado de *An. cruzii*, *Li. durhamii* e *Wy. confusa*.
- Foram amostrados 878 exemplares de culicídeos na APA Capivari-Monos e 37 táxons (11 gêneros) foram identificados. No Parque Estadual da Cantareia, 338 espécimes de culicídeos foram amostrados e 23 táxons (10 gêneros) também foram identificados.
- Pode-se averiguar que existe uma relação entre os *Flavivirus* detectados com a riqueza e abundância de culicídeos na APA Capivari-Monos.

Conclui-se que a riqueza, abundância e diversidade estão relacionadas entre si e, juntas, influenciaram na detecção de espécies de culicídeos infectadas naturalmente por *Flavivirus*, sendo que estes foram detectados em pontos de coleta cuja riqueza e abundância foram altas, e a diversidade baixa. A quantidade e a variedade dos *Flavivirus* também foram influenciadas por esses três fatores, para ocorrer na natureza. Não foi possível correlacionar a identidade dos *Flavivirus* com os três fatores uma vez que as espécies detectadas com infecção natural por esses vírus não são apontadas como potenciais vetoras. Além disso, a abundância e a diversidade pareceram ter uma relação inversa entre si.

8. REFERÊNCIAS

- AAGAARD-HANSEN, J.; NOMBELA, N.; ALVAR, J. Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases. **Trop Med Int Health**, [S.l.] v. 15, n. 11, p.1281-1288. 2010.
- AITKEN, T.H.G. Habits of some mosquito hosts of VEE (Mucambo) virus from northeastern South America, including Trinidad. p. 254-256. In: **Proceedings of the Workshop Symposium on Venezuelan Encephalitis Virus**. Pan American Health Organization (PAHO) Scientific Publ: Washington, D.C. v. 243. 1972.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYRES, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.**, [S.l.], v. 2150, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ASAD, H.; CARPENTER, D. O. Effects of climate change on the spread of zika virus: a public health threat. **Reviews on Environmental Health**, [S.l.], v. 33, n.1, p. 31-42, 2018.
- BESNARD, M.; LASTÈRE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, [S.l.], v. 19, n. 13, p. 2014.
- BONILAURI, P.; BELLINI, R.; CALZOLARI, M.; ANGELINI, R.; VENTURI, L.; FALLACARA, F.; CORDIOLI, P.; ANGELINI, P.; VENTURELLI, C.; MERIALDI, G.; et al. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. **Emerg. Infect. Dis.**, [S.l.], v. 14, p. 852-853, 2008.
- BOORMAN, J. P.; PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, [S.l.], v. 50, n. 3, p. 238-242, 1956.
- BRAM, R.A. Classification of *Culex* Subgenus *Culex* in the New World (Diptera: Culicidae). In: **Proceedings of The National Museum**. Washington, DC: Smithsonian Institution, v. 120, n. 3557, p. 1-122, 1967.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico. Febre do Nilo Ocidental. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do parque nacional da lagoa do peixe/RS para detecção do vírus da febre do Nilo Ocidental e outros vírus**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/16/Ano04-n05-2---inq-sorol-aves-virus-fno-rs-completo.pdf>> Acesso em: 23 jan 2019. 2004a.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Investigação de Óbitos Humanos de Causa Desconhecida Ocorridos no Rio Grande do Norte e de Epizootia em Saguês (*Callithrix jacchus*) no Parque das Dunas, Rio Grande do Norte, 2004**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano04_n07.pdf> Acesso em: 10 nov.2018. 2004b.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. SEGURA, M. N. O.; CASTRO, F. C. (Org.). **Atlas de Culicídeos na Amazônia Brasileira. Características específica de insetos hematófagos da família Culicidae**. INSTITUTO EVANDRO CHAGAS: Belém, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE / SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE E FLORESTA. Maura Campanili e Wigold Bertoldo Schaffer (Org.). **Mata Atlântica: Patrimônio Nacional dos Brasileiros**. Brasília: MMA, Biodiversidade, v. 34, 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 5ed. Brasília – DF. Ministério da Saúde, 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre Amarela: causas, sintomas, diagnósticos, prevenção e tratamento**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>> Acesso em: 09 nov. 2018. 2017a.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue>> Acesso em: 02 dez. 2018. 2017b.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017**. v. 48, n. 28, 2017c.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento da Febre do Nilo Ocidental Brasil e Espírito Santo – 2018**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/29/INFORME-01-FNO-2018-SE-31-22ago18.pdf>>. Acesso em 23 de jan. 2019. 2018a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre do Mayaro: Causas, sintoma, tratamentos, diagnósticos e prevenção.** Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro>> Acesso em: 26 dez. 2018. 2018b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento do Período Sazonal de Febre Amarela Brasil – 2018/2019.** Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/informe-FA-n.1_8nov_final2.pdf> Acesso em: 03 dez. 2018. 2018c

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 5 de 2018.** v. 49, n. 7, 2018. 2018d.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2019.** v. 50, n. 4, 2019.

BOCATO-CHAMELET, E. L.; COIMBRA, T. L. M.; NASSAR, E. S.; PEREIRA, L. E.; FERREIRA, I. B.; SOUZA, L. T. M.; SUZUKI, A. Isolation of *Flavivirus* Iguape from mosquitoes *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in Juquitiba – São Paulo State – Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, [S.l.], v. 60, n. 1, p. 65-69, 2001.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flavivírus. In: Knipe, D. M. e Howley, P. M. (Org.). **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v. 1, p. 852-921. 2001.

BURT, F. J.; ROLPH, M. S.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M.T. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, [S.l.], v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012.

CAMARGO, A. A. **Estudo da resposta de mosquitos (Diptera: Culicidae) a diferentes tipos de criadouros e condições de fatores físico-químicos da água.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

CANALI, M. RIVAS-MORALES, S. BEUTELS, P. VENTURELLI, C. The Cost of Arbovirus Disease Prevention in Europe: Area-Wide Integrated Control of Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Emilia-Romagna, Northern Italy. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, [S.l.], v. 14, n. 4, p.444, 2017.

CARDOSO, J. C.; ALMEIDA, M. A. B.; SANTOS, E.; FONSECA, D. F.; SALLUM, M. A. M.; NOLL, C. A. et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008. **Emerg Infect Dis**, [S.l.], v.16, n.2, p. 1918-1924, 2010.

CARDOSO, B. F.; SERRA, O. P.; HEINEN, L. B. S.; ZUCHI, N.; SOUZA, V. C.; NAVECA, F. G.; SANTOS, M. A. M.; SLHESSARENKO, R. D. Detection of Oropouche virus segment S in patient and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [S.l.], v. 110, n. 6, p. 745-754, 2015.

CARVALHO, G. C.; MALAFRONT, R. S.; IZUMISAWA, M. C.; SOUZA, T. R.; NATAL, L.; MARRELLI, M. T. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. **J Vector Ecol.**, [S.l.], v. 38, n. 1, p. 146-152, 2014.

CARVALHO, G. C.; CERETTI-JUNIOR, W.; BARRIO-NUOVO, K. M.; WILK-DA-SILVA, R.; CRISTE, O. R.; PAULA, M. B.; VENDRAMI, D. P.; MULTINI, L. C.; EVANGELISTA, E.; CAMARGO, A. A.; SOUZA, L. F.; WILKE, A. B. B.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; MARRELLI, M. T. Composition and Diversity of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Urban Parks in the South Region of the City of São Paulo, Brazil. **Biota Neotrop.**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 1-7, 2017.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Geographic Distribution: Chikungunya virus in the United States.** Atlanta: CDC. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states.html>> Acesso em: 28/12/2018.

CERETTI-JÚNIOR, W.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; MULTINI, L. C.; URBINATTI, P. R.; VENDRAMI, D. P.; NATAL, D.; MARQUES, S.; FERNANDES, A.; OGATA, H.; MARRELLI, M. T. Immature mosquitoes in bamboo internodes in municipal parks, city of São Paulo, Brazil. **J Am Mosq Control Association**, [S.l.], v. 30, n. 4, p. 268-274, 2014.

CERETTI-JÚNIOR, W.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; WILKE, A. B. B.; STROBEL, R. C.; ORICO, L. D.; TEIXEIRA, R. S.; MARQUES, S.; MARRELLI, M. T. Mosquito Faunal Survey in a Central Park of the City of São Paulo, Brazil. **J Am Mosq Control Association**, [S.l.], v. 31, n. 2, p.172-176, 2015.

- CERETTI-JÚNIOR, W.; CHRISTE, R. O.; STROBEL, R. C.; MATOS-JUNIOR, M. O.; MELLO, M. H. S. H.; FERNANDES, A.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CARVALHOS, G. C.; MARRELLI, M. T. Species Composition and Ecological Aspects of Immature Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Bromeliads in Urban Parks in the City of São Paulo, Brazil. **J Arthropod-Borne Dis**, [S.l], v. 10, n. 1, p. 102–112, 2016.
- COFFEY, L. L.; FORRESTER, N.; TSETSKARKIN, K.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol**, [S.l], v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.
- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1994.
- CORRÊA, R. R. e RAMALHO, G. R. Revisão de *Phoniomyia* Theobald, (Diptera, Culicidae, Sabethini). **Folia Clínica et Biológica** 25, [S.l], p. 1-176. 1956.
- DAMBACH, P.; JORGE, M. M.; TRAORÁ, I.; PHALKEY, R.; SAWADOGO, H.; ZABRÉ, P.; KAGONÉ, M.; SIÉ, A.; SAUERBORN, R.; BECKER, N.; BEIERSMANN, C. A qualitative study of community perception and acceptance of biological larviciding for malaria mosquito control in rural Burkina Faso. **BCM Public Health**, [S.l], v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.
- DAY, J. F.; CURTIS, G. A. Annual emergence patterns of *Culex nigripalpus* females before, during and after a widespread St. Louis encephalitis epidemic in south Florida. **J Am Mosq Control Association**, [S.l], v. 9, n. 3, p. 249-255, 1993.
- DEANE, L. M. et al. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 4, p. 647, 1970.
- DEANE, L. M.; DEANE, m. p.; NETO, J. A.F.; ALMEIDA, F. B. On the transmission of simian malaria in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 13, n. 5, p. 311-319, 1971.
- DEANE, L. M. Epidemiology of simian malaria in the American continent. In First Inter-America Conference on Conservation and Utilization of American Non-Human Primates in Biomedical research. **Panamer. Hith. Org. Scient**, [S.l], n. 317, p. 144-163, 1976.
- DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A.; LIMA, M. M. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [S.l], v. 79, n. 4, p. 461-3, 1984.
- DIALLO, D.; SALL, A. A.; DIAGNE, C. T.; FAYE, O.; FAYE, O.; BA, Y.; HANLEY, K. A.; BUENEMANN, M.; WEAVER, S. C.; DIALLO, M. ZIKA Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, [S.l], v. 9, n. 10, p. 1-8, 2014.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, [S.l], v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- DODSON, B. L.; RASGON, J. L. Vector competence o *Anopheles* and *Culex* mosquitoes for Zika virus. **Perr J**, [S.l], v. 5, p. 1-10, 2017.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev Saúde Pública**, [S.l], v. 51, n. 30, p. 1-6, 2017.
- DUARTE, A. M. R. C.; PEREIRA, D. M.; PAULA, M. B.; FERNANDES, A.; PAULO R URBINATTI, P. R.; RIBEIRO, A. F.; MELLO, M. H. S. H.; MATOS, M. O.; MUCCI, L. F.; FERNANDES, L. N.; NATAL, D. MALAFRONT, R. S. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. **Parasites & Vectors**, [S.l], v. 6, n. 1, p. 1-6. 2013.
- EMPLASA – Empresa Paulista de Planejamento Metropolitano S/A. **Região Metropolitana de São Paulo**. Disponível em: <<https://www.emplasa.sp.gov.br/RMSP>>. Acesso em 10/12/2018. 2018.
- EPELBOIN, Y.; TALAGA, S.; EPELBOIN, L.; DUSFOUR, I. Zika virus: An updated review of competente or naturally infected mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.l], v. 11, n. 11, p. 1-22, 2017.
- FAGBAMI A. Epidemiological investigations on arbovirus infections at Igbo-Ora, Nigeria. **Trop Geogr Med**, [S.l], v. 29, n. 2, p. 187-191, 1977.
- FARIA, N. R.; KRAEMER, M. U. G.; HILL, S. C.; GOES DE JESUS, J.; DE AGUIAR, R. S; IANI, F. C. M.; XAVIER, J.; QUICK, J.; DU PLESSIS, L.; DELLICOUR, S.; et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science**, [S.l], v. 361, n. 6405, p. 894-899, 2018.

- FERNANDES, L. N.; PAULA, M. B.; ARAÚJO, A. B.; GONÇALVES, E. F. B.; ROMANO, C. M.; NATAL, D.; MALAFRONT, R. S.; MARRELLI, M. T.; LEVI, J. E. Detection of *Culex Flavivirus* nucleotide sequencias in mosquitoes from parks in the city of Sao Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, [S.l], v. 157, p. 73-83, 2016.
- FERNANDÉZ, L. M.; NAVARRO, Y. P. T. Fiebre Chikungunya. **Revista Cubana de Medicina**, Havana, v. 54, n. 1, p. 74-96, 2015.
- FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; ROCCO, I. M. et al. - Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 36, p. 265-274, 1994.
- FERREIRA-DE-LIMA, V. H.; LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 77, 2018.
- FERRO, C.; OLANO, V. A.; AHMADA, M.; WEAVER, S. Mosquitos (Diptera: Culicidae) in the small village where a human case of Venezuelan equine encephalitis was recorded. **Biomédica**, Bogotá, v. 28, n. 2, p. 234-244, 2008.
- FONSECA, B. F.; FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCCAIA, R. (Org.). **Tradado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu. p. 343-356. 2005.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: USP. v. 3. 1965.
- FORATTINI, O. P.; LOPES, O. S.; RABELLO, E. X. Investigaço sobre o comportamento de formas adultas de mosquitos silvestres no estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Publ.**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 11-173, 1968.
- FORATTINI, O. P.; ISHIATA, G. K.; RABELLO, E. X.; COTRIM, M. D. Observations on *Culex* mosquitoes of S. Paulo City, Brazil. **Rev. Saúde Publ.** [S.l], v. 7, p. 315-330, 1973.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp. v. 1. 1996.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp. v. 2. 2002.
- FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; FOY, J. L. C.; BLITVICH, B. J.; DA ROSA, A. T.; HADDOW, A. D.; LANCIOTTI, R. S.; TESH, R. B. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**, [S.l], v. 17, n. 5, p. 880-882, 2011.
- FUNASA- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - MINISTRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilncia Epidemiolgica**. Braslia. v. 1. 2002.
- GALINDO, P.; BLANTON, F. S.; PEYTON, E. L. A Revision of the *Uranotaenia* of Panama with Notes on Other American Species of the Genus (Diptera, Culicidae). **Annals of The Entomological Society of America**, [S.l], v. 47, n. 1, p.107-177. 1954.
- GAUNT, M. W.; SALL, A. A.; LAMBALLERIE, X.; FALCONAR, A. K. I.; DZHIVANIAN, T. I.; GOULD, E. A. Phylogenetic relationships of *Flavivirus* correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, [S.l], v. 82, n. 8, p.1867-1876. 2001.
- GOURINAT, A. C.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C.; DUPONT-ROUZEYROL, M. Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis**, [S.l], v. 21, n. 1, p. 84-86, 2015.
- GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1024-1067. 2007.
- GUBLER, D. G.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance of dengue virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 33. p. 158-65. 1984.
- GUBLER, D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**, [S.l], v. 11, n 3, p.480-496, 1998.
- GUBLER, D. J., **Human arbovirus infections worldwide**. Annals of the New York Academy of Sciences. p.13-24. 2001.
- GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. *Flaviviruses*. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1154-1252. 2007.
- GUEDES, R. D.; PAIVA, M. H. S.; DONATO, M. M. A.; BARBOSA, P. P.; KROKOVSKY, L.; ROCHA, S. W. S.; SARAIVA, K. L. A.; CRESPO, M. M.; REZENDE, T. M. T.; WALLAU, G. L.; BARBOSA, R. M. R.; OLIVEIRA, C. M. F.; MELO-SANTOS, M. A. V.; PENA, L.; CORDEIRO, M. T.; FRANCA, R. F. O.; OLIVEIRA, A. L. S.; PEIXOTO, C. A.; LEAL, W. S.; AYRES, C. F. J. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, [S.l], v. 6, n. 1, 2017.

- GUZMAN, M.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Lessons and challenges. **J. Clin. Virol.**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis**, [S.l.], v. 15, n. 9, p. 1347-1350, 2009.
- HAL-AMELL, J. A review of the Scapularis group of *Aedes* (Ochlerotatus). **Contr. Amer. Ent. Inst.**, v. 13, n. 3, 1976.
- HARBACH, R. E. **Mosquito Taxonomix inventory. Valid Species**. 2008. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list#>>. Acesso em: 21 fev. 2018.
- HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, [S.l.], v. 1668, n.01, p. 591-638. 2007.
- HARDY, J. L.; HOUK, F. J.; KRAMER, L. D.; REEVES, W. C 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annu. Rev. Entomol.**, [S.l.], v. 28, n. 1, p. 229–262, 1983.
- HEINISCH, M. R. S.; DIAZ-QUIJANO, F. A.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F.; PANCETTI, F. G. M.; COELHO, R. R.; ANDRADE, P.S.; URBINATTI, P. R.; ALMEIDA, R. M.M. S.; LIMA-CAMARA, T. N. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. **Acta Tropica**, [S.l.], v. 189, 2019.
- HERVÉ, J.P.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G. C. **Arboviroses: Aspectos Ecológicos**. In: Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Fundação Serviços de Saúde Pública, Belém, v. 1, p. 409-437. 1986.
- HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 11 ed. 2004.
- HUTCHINGS, R. S. G.; SALLUM, M. A. M.; FERREIRA, R. L. M.; HUTCHINGS, R. W. Mosquitoes of the Jaú National Park and their potential importance in Brazilian Amazonia. **Medical and Veterinary Entomology**, [S.l.], v. 19, p. 428–441, 2005.
- IOC/FIOCRUZ – INSTITUTO OSWALDO CRUZ / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Dengue Vírus e Vetor**. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>> Acesso em: 20 de nov. 2018.
- IOC/FIOCRUZ – INSTITUTO OSWALDO CRUZ / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Conheça os mosquitos que podem transmitir febre amarela**. [s.d.]. <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2741&sid=32>> Acesso em: 24 jan. 2019. 2018.
- IVERSSON, L. B.; SILVA, R. A. M. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; BARROS, V. L. R. S. Circulation of Eastern Equine Encephalitis, Western Equine Encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma Viruses in Equines of the Brazilian Pantanal, South America. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 355-359, 1993.
- KARLIN, S.; ALTSCHUL, S. F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, [S.l.], v. 87, n. 6, p. 2264-2268, 1990.
- KIRCHGATTER, K.; TUBAKI, R. M.; MALAFRONT, R. S.; ALVES, I. C.; LIMA, G. F. M. C.; GUIMARÃES, L. O.; ZAMPAULO, R. A.; WUNDERLICH, G. *Anopheles* (Kerteszia) cruzii (Diptera: Culicidae) in Peridomestic Area During Asymptomatic Malaria Transmission in the Atlantic Forest: Molecular Identification of Blood-Meal Sources Indicates Humans as Primary Intermediate Hosts. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 5, p.403-409, 2014.
- KLOWDEN, M. J.; BRIEGEL, H. Mosquito gonotrophic cycle and multiple feedings potencial: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.**, v. 31, n. 4, p. 618-622, 1994.
- KRAMER LD, LI J, SHI PY. West Nile virus. **Lancet Neurol**, [S.l.], v. 6, n. 2, p.171-81, 2007.
- KUCHARZ EJ, CEBULA-BYRSKA I. Chikungunya fever. **Eur J Intern Med**, v. 23, n. 4, p. 325-329, 2012.
- KUHN, R. J. Togaviridae: The Virus and Their Replication. In: Knipe, D. M. e Howley, P. M. (Org.). **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v. 1, p. 1002-1022. 2007.
- KUNO, G.; CHANG, G. J. 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.
- LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O.; LAMBERT, A. J.; JOHNSON, A. J.; STANFIELD, S. M.; DUFFY, M. R. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, micronesia, 2007. **Emerg. Infect. Dis.** [S.l.], v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.

- LANE, J. **Neotropical Culicidae**. São Paulo: Universidade de São Paulo. v. 1. 1953a
- LANE, J. **Neotropical Culicidae**. São Paulo: Universidade de São Paulo. v. 2. 1953b.
- LAPORTA, G. Z.; SALLUM, M. A. M. Coexistence mechanisms at multiple scales in mosquito assemblages. **BMC ecology**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 30, 2014.
- LIMA-CAMARA, T. N.; HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE OLIVEIRA, R. Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2079-2084, 2006.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging Arboviruses and Public Health Challenges in Brazil. **Rev Saúde Pública**, [S.l.], v. 50, n. 36, 2016.
- LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae: The Virus and Their Replication. In: Knipe, D. M. e Howley, P. M. (Org.). **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v. 1, p. 1102-1152. 2007.
- LOPES, O. S.; SACHETTA, L. A.; FRANCY, B.; JAKOB, W. L.; CALISHER, C. H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of rocio virus from *Psorophora ferox* (humboldt, 1819). **Am J of Epidemiology**, [S.l.], 113, n. 2, p. 122-125, 1981.
- LOPES, J. LOZOVEI, A. L. Mosquito (Diptera: Culicidae) ecology of natural and artificial rural breeding places at North Paraná State, Brazil. I - Collections in a bed-streamlet. **Rev. Saúde Publ.**, [S.l.], v. 29, n. 3, p. 183-191, 1995.
- LOPES, J. Mosquitos (Diptera: Culicidae) da região Baixo Tibagi e suas adaptações a ambientes antropogênicos: causas e consequências. p. 327-351. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, M. E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Eds). **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: MEDRI, M. E, p. 595. 2002.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, [S.l.], v. 5, n. 3, p 55-64, 2014.
- MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **Am J Trop Med Hyg**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 411-415, 1969.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, [S.l.], v. 48, n. 2, p. 139-145, 1954.
- MAGURRAM, E. A. **Measuring biological diversity**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004.
- MAIA, F. G. M.; CHÁVEZ, J. H.; SOUZA, W. M.; ROMEIRO, M. F.; CASTRO-JORGE, LA. A.; FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Infection with Saint Louis Encephalitis virus in the city of Ribeirão preto , Brazil: reposted one case. **Int J Infec Dis**, [S.l.], v. 26, p. 96-97, 2014.
- MAZZAROLO, L. A. MZUFBA – Museu de Zoologia Virtual, Universidade Federal da Bahia. **Os artrópodes**. 2009. Disponível em: <http://www.mzufba.ufba.br/WEB/MZV_arquivos/artropodes.html>. Acesso em 30 dez. 2018.
- MAZZEI, K.; ROSA, A. R.; ARROMBA, A. N.; DUARTE, A. M. C.; BARLETA, C.; et al. **Levantamento e Propostas de Ação Para as Principais Zoonoses dos Parques Estaduais Alberto Löfgren e da Cantareira**. IF Sér. Reg., São Paulo, n. 39, p. 25-41, 2009.
- MCCRAE, A. W.; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, [S.l.], v. 76, n. 4, p. 552-562, 1982.
- MEASON, B.; PATERSON, R. Chikungunya, climate change, and human rights. **Health Hum Rights**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 105-112, 2014.
- MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CERETTI-JUNIOR, W.; URBINATTI, P. R.; NATAL, D.; CARVALHO, G. C.; PAULA, M. B.; FERNANDES, A.; MELLO, M. H. S. H.; OLIVEIRA, R. C.; ORICO, L. D.; GONÇALVES, E. F. B.; MARRELLI, M. T. Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques da cidade de São Paulo I. Campinas: **Biota Neotrop**, [S.l.] v. 13, n. 1, p. 317-321, 2013a.
- MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CERETTI-JUNIOR, W.; URBINATTI, P. R.; NATAL, D.; CARVALHO, G. C.; PAULA, M. B.; FERNANDES, A.; MELLO, M. H. S. H.; OLIVEIRA, R. C.; ORICO, L. D.; GONÇALVES, E. F. B.; MARRELLI, M. T. Mosquito Fauna in Municipal Parks of São Paulo City, Brazil: A Preliminary Survey. **J Am Mosq Control Assoc.**, [S.l.], v. 29, n. 3, p.275-279, 2013b.

- MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CERETTI-JUNIOR, W.; CARVALHO, G. C.; NARDI, M. S.; ARAÚJO, A. B.; VENDRAMI, D. P.; MARRELLI, M. T. Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a urban park area : Larval habitats and temporal variation. **Acta Tropica**, [S.l.] v. 150, p. 200-209, 2015.
- MEDEIROS-SOUSA, A. R.; FERNANDES, A.; CERETTI-JUNIOR, W.; WILK, A. B. B.; MARRELLI, M. T. Mosquitoes in urban green spaces: using an island biogeographic approach to identify drivers of species richness and composition. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 7. N. 17826, 2017.
- MITCHELL, C. J.; FORATTINI, O. P. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. **J. Med. Entomol**, [S.l.], v. 21, p. 34-37, 1984.
- MONATH, T. P. Epidemiology. In: MONTAH, T. P. (ed.). St. Louis Encephalitis. American Public Health Association, Washington, DC. p. 239–312. 1980.
- MONDINI, A.; CARDEAL, I. L. S.; LÁZARO, E.; NUNES, S. H.; MOREIRA, C. C.; RAHAL, P.; et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 176-8, 2007a.
- MONDINI, A.; BRONZONI, R. V. M.; CARDEAL, I. L. S.; SANTOS, T. M. I. L.; LÁZARO, E.; NUNES, S. H. P.; et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **J Clin Virol**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 84-86, 2007b.
- MONTES, J. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 578-584. 2005.
- MOORE, D. L.; CAUSEY, O. R.; CAREY, D. E.; REDDY, S.; COOKE, A. R.; AKINKUGBE, F. M.; et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964– 1970. **Ann Trop Med Parasitol**, [S.l.], v. 69, n. 1, p. 49-64, 1975.
- MORAIS, S. A.; NATAL, D.; MARRELLI, M. T. Aspectos da distribuição de *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. **Ver Bras Entomol**, n. 50, v. 3, p.413-418, 2006.
- MORAIS, S. A.; NATAL, D. Insetos de Interesse Médico-Sanitário: Vetores. In: MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; CONTE, C. E. (Org.). **Revisões em Zoologia Mata Atlântica**. Curitiba: UFPR, 2017. p. 25-55.
- MOURÃO, M. P. G.; BASTOS, M. S.; GIMAQUE, J. B. L.; MOTA, B. R.; SOUZA, G. S.; GRIMMER, G. H. N.; et al. Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. **Emerg Infect Dis**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 2063-2064, 2009.
- MOURÃO, M. P. G.; BASTOS, M. S.; FIGUEIREDO, R. P.; GIMAQUE, J. B. L.; GALUSSO, E. L.; KRAMER, V. M. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne Zoonotic Dis**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.
- MUCCI, L. F.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CERETTI-JÚNIOR, W.; FERNANDES, A.; CAMARGO, A. A.; EVANGELISTA, E.; CHRISTE, R. O.; MONTES, J.; TEIXEIRA, R. S.; MARRELLI, M. T. *Haemagogus leucocelaenus* and Other Mosquito Potentially Associated with Sylvatic Yellow Fever in Cantareira State Park in São Paulo Metropolitan Area, Brazil. **J. of the American Mosquito Control Association**, v. 32, n. 4, p. 329-332, 2016.
- MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSER, A.; CAO-LORMEAU, V. M. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 359-361, 2015.
- MURRAY, K. O.; MERTENS, E.; DESPRÈS, P. West Nile virus and its emergence in the United States of America. **Vet Res**, [S.l.], v. 41, n. 6, p.67, 2010.
- MURRAY, K. O.; WALKER, C.; GOULD, E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. **Epidemiol Infect**, [S.l.], v. 139, n. 6, p.807-817, 2011.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista de Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [S.l.], n. 33, 2004.
- NUNES, M. R. T.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; AZEVEDO, R. S. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; et al. Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. **Emerg Infect Dis**, [S.l.], v. 11, n. 10, p. 1610-1613, 2005.
- OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOFFART, I.; LASTÈRE, S.; VALOUR, F.; et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**, [S.l.], v. 19, n. 9, p. 1-3, 2014.

PAHO/WHO – PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Bacterioses and Mycoses.** Washington, DC. v. 1. n. 580. 2001.

PAHO/WHO – PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Parasitoses.** Washington, DC. v. 3. n. 580. 2003.

PAHO/WHO – PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: General Information.** [s.d]. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734&lang=pt> Acesso em: 01 dez. 2018.

PAULA, M. B.; FERNANDES, A.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CERETTI-JUNIOR, W.; CHRISTIE, R.; STROEBEL, R. C.; PREDQ, L.; ALMEIDA, R. M. M. S.; PEREIRA, U. D.; JACINTO, M. C. O.; MARRELLI, M. T. Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in parks in greater São Paulo, Brazil. **Biota Neotrop.** [S.l], vol.15, n. 3, 2015.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M. A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.; et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** [S.l], v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.

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.**, [S.l], v.8, n. 2 2014.

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*. **Virology Journal**, v. 10, n. 01, p. 58, 2013.

PINA-COSTA, A. et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** [S.l], v. 109, n. 5, p. 618-633, 2014.

PINHEIRO, F. P.; LEDUC, J. W.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; LEITE, O. F. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** [S.l], v. 30, p.145–8, 1981.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L. S.; BISORDI, I.; PETRELLA, S. M. C. N.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P.; COIMBRA, T. L. M.; BESSA, T. A. F.; OSHIRO, F. M.; LIMA, L. B. Q.; CERRONI, M. P.; MARTI, A. T.; BARBOSA, V. M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. St. Louis Encephalitis Virus: First Isolation from a Human in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 47, n. 5, p. 281-285, 2005.

REINERT J. F. et al. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. **Zoological Journal of the Linnean Society.** [S.l], v. 142, n. 3, p. 289-368, 2004.

REINERT J. F. et al. Phylogeny and classification of tribe Aedini (Diptera: Culicidae). **Zoological Journal of the Linnean Society.** [S.l], v. 157, n. 4, p. 700-794. 2009.

RIBEIRO, A. F.; URBINATTI, P. R.; DUARTE, A. M. R. C.; PAULA, M. B.; PEREIRA, D. M.; MUCCI, L. F.; FERNANDES, A.; MELLO, M. H. S. H.; JÚNIOR, M. O. M.; OLIVEIRA, R. C.; NATAL, D.; MALAFRONT, R. S. Mosquitoes in degraded and preserved areas of the Atlantic Forest and potential for vector-borne disease risk in the municipality of São Paulo, Brazil. **J Vector Ecol.**, v. 37, n.2. p. 316-324. 2012.

ROBIN, Y.; MOUCHET, J. Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone. **Bull Soc Pathol Exot Filiales.** [S.l], v. 68, n. 3, p. 249-258, 1975.

ROMEIRO, M. F.; SOUZA, W. M.; TOLARDO, A. L.; VIERIA, L. C.; HENRIQUES, D. A.; ARAÚJO, J.; SIQUEIRA, C. E. H.; COLOMBO, T. E.; AQUINO, V. H.; LOPES DA FONSECA, B. A.; BRONZONI, R. V. M.; NOGUEIRA, M. L.; DURIGON, E. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. A real-time RT-PCR for rapid detection and qualification of mosquito-borne *Alphavirus*. **Arch Virol.** [S.l], v. 161, p. 3171-3177, 2016,

ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J Hyg (Lond).** [S.l], v. 54, n. 2, p.177-191, 1956.

ROZEBOM, L.E., KOMP, W.H.W. **Annal Entomological Society of America.** Vol. XLIII. 1950.

SALLUM, M. A. M., FORATTINI, O. P. Review of The Species Sections of *Culex (Melanoconion)*. **Journal of the American Mosquito Control Association.** v. 12, n. 3, p. 517-600. 1996.

SALUZZO, J. F.; GONZALEZ, J. P.; HERVÉ, J. P.; GEORGES, A. J. Serological survey for the prevalence of certain arboviruses in the human population of the south-east area of Central African Republic [in French]. **Bull Soc Pathol Exot Filiales.** [S.l], v. 74, n. 5, p. 490-499, 1981.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, [S.l.], v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS-NETO, L. G.; LOZOVEI, A. L. Aspectos ecológicos de *Anopheles cruzii* e *Culex ribeirensis* (Diptera, Culicidae) da Mata Atlântica de Morretes, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 105, 111, 2008.

SÃO PAULO (ESTADO). INSTITUTO FLORESTAL - SECRETARIA DO ESTADO DO MEIO AMBIENTE. **Plano de Manejo do Parque Estadual da Cantareira**. Disponível em: <<http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/fundacaoflorestal/2012/01/PECantareira/Plano%20de%20Manejo/Plano%20de%20Manejo%20Completo.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2018. 2009.

SÃO PAULO (MUNICÍPIO). SECRETARIA MUNICIPAL DO VERDE E MEIO AMBIENTE. **Plano de Manejo – Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos**. Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/publicacoes_svma/index.php?p=26341> Acesso em: 21 fev. 2018. 2011.

SÃO PAULO (MUNICÍPIO). SECRETARIA MUNICIPAL DO VERDE E MEIO AMBIENTE. **APA Capivari-Monos**. Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/unid_de_conservacao/apa_capivarimonos/> Acesso em 21 fev. 2018. 2012.

SÃO PAULO (GOVERNO). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Mosquitos**. Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/controle_de_zoonoses/animais_sinantropicos/index.php?p=4402>. Acesso em: 25 jan. 2019. 2018.

SÃO PAULO (GOVERNO). SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. SISTEMA AMBIENTAL PAULISTA. **Parques e Unidades de Conservação**. Disponível em: <<https://www.ambiente.sp.gov.br/ambiente/parques-e-unidades-de-conservacao/>> Acesso em: 02 de jan. 2019. 2019a.

SÃO PAULO (GOVERNO). SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. SISTEMA AMBIENTAL PAULISTA. **Parques Urbanos**. Disponível em: <<https://www.ambiente.sp.gov.br/parque-urbano/>> Acesso em: 02 de jan. 2019. 2019b.

SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, S. T. Bunyaviridae. In: Knipe, D. M. e Howley, P. M. (Org.). **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v. 1, p. 1742-1789. 2007.

SEJVAR, J. J. Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. **Viruses**. [S.l.], v. 6, n. 2, p.606-23, 2014.

SERRA, O. P.; CARDOSO, B. F.; RIBEIRO, A. L. M.; SANTOS, F. A. L.; SLHESSARENKO, R. D. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, [S.l.], v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

SHOPE, R. E.; WOODHALL, J. P.; DA ROSA, A. T. The epidemiology of diseases caused by viruses in Groups C and Guama (Bunyaviridae). In: Monath, T.P. (ed.). **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**, CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 37-52, 1988.

SILVA, A. M.; MENEZES, R. M. T. Occurrence of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) in artificial breeding área of Southern Brazil. **Ver. Saúde Pública**, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 103-104, 1996.

SILVA, L. J.; ANGERAMI, R. N. **Víroses Emergentes no Brasil**. 22 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. 2008.

SILVA, S. M. Mata Atlântica: Uma Apresentação. In: MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; CONTE, C. E. **Revisões em Zoologia Mata Atlântica**. 1. ed. Curitiba: UFPR, p. 9-23. 2017.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSE, R.; SMITH, D. B.; STAPLETON, J. T.; ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile Flaviviridae. **The Journal of General Virology**, [S.l.], v. 98, n. 1, p. 2–3. 2017.

SOUZA, R. P. D.; PETRELLA, S.; COIMBRA, T. L. M.; MAEDA, A. Y.; ROCCO, I. M.; BISORDI, I.; SILVEIRA, V. R.; PEREIRA, L. E.; SUZUKI, A.; SILVA, S. J. S.; SILVA, F. G.; SALVADOR, F. S.; TUBAKI, R. M.; MENEZES, R. T.; PEREIRA, M.; BERGO, E. S.; HOFFMANN, R. C.; SPINOLA, R. M. F.; TENGAN, C. H.; SICILIANO, M. M. Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Dipteral: Culicidae) in São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 133–139, 2009.

STEFFAN, W. A.; EVENHUIS, N. L. Biology of *Toxorhynchites*. **Ann Rev Entomol**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 159-181, 1981.

STRAND, M. R. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. **Current Opinion in Insect Science**, [S.l.], v. 28, p. 59-65, 2018.

TAIPE-LAGOS, C. B.; NATAL, D. Culicidae mosquito abundance in a preserved metropolitan área and its epidemiological implications. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 275-279, 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**, [S.l.] v. 30, n.12, p. 2725-2729, 2013.

TARIFA, J. R.; ARMANI, G. Os climas naturais. In: **Os climas da cidade de São Paulo: Teoria e Prática**. São Paulo: Faculdade de Filosofia, Letras, Ciências Humanas da Universidade de São Paulo FFLCH/USP, Novos Caminhos v. 4, p. 34-70. 2001.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F.; PINHEIRO, F. P.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DIAS, L. B.; CRUZ, A. C. R. Arbovirus isolated in Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathogeny for man, In: IEC – INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Eds.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Instituto Evandro Chagas: Belém, 1998.

TEICH, V.; ARINELLI, R. FAHAM, L. *Aedes aegypti* and society: The economic burden of arbovirus in Brazil. **J Bras Econ Saúde**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 267-276, 2017.

THOMPSON, J.S.; LING, X.; GRUSTEIN, M.; Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silencing locus repression in yeast. **Nature International Journal of Science**, [S.l.], v. 369, p. 245-247, 1994.

TJADEN, N B.; THOMAS, S. M.; FISCHER, D.; BEIERKUHNEIN, C. Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 6, n. 7, p. 1-5, 2013.

URBINATTI, P. R.; SENDACZ, S.; NATAL, D. Immature of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a public city park. **Rev Saúde Pública**, vol.35, n.5, p.461-466, 2001.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; SHOPE, R. E.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; RODRIGUES, S. G.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C.; J TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (eds.). **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Instituto Evandro Chagas: Belém, p. 72-99. 1998.

VAZEILLE-FALCOZ, M.; ROSEN, L.; MOUSSON, L.; RODHAIN, F. O. I. S. Replication of dengue type 2 virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, [S.l.], v. 60, n. 2, pp. 319–321, 1999.

VAZEILLE-FALCOZ, M.; MOUTAILLER, S.; COUDRIER, D.; ROUSSEAUX, C.; KHUN, H.; HUERRE, M.; THIRIA, J.; DEHECQ, J.-S.; FONTENILLE, D.; SCHUFFENECKER, I.; et al. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Réunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS ONE**, [S.l.], v. 2, 2007.

VEGA-RÚA, A.; ZOUACHE, K.; GIROD, R.; FAILLOUX, A. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. High vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor of the spread of Chikungunya. **J Virol**, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, 2014.

WAHID, B.; ALI, A.; RAFIQUE, S.; IDREES, M. Global expansion of Chikungunya virus: mapping the 64-years history. **International Journal of Infectious Diseases**, [S.l.], v. 58, p. 69-76, 2017.

WALTON, T. E.; GRAYSON, M. A. Venezuelan equine encephalomyelitis. In: MONATH, T. P. **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 203-231. 1988.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, [S.l.], v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WHATELY, M.; SANTORO, P.F.; GONÇALVES, B.C.; GONZATTO, A.M.. **Parques Urbanos Municipais de São Paulo: subsídios para a gestão**. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Arthropod-borne and Rodent-borne Viral Diseases**. Geneva; WHO technical reports series, 719, p. 1-116. 1985.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional Office For Europe. **Zika Virus Vectors and Risk of Spread in the WHO European Region.** Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/304459/WEB-news_competence-of-Aedes-aegypti-and-albopictus-vector-species.pdf> Acesso em: 02 dez. 2018. 2016.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector-Borne diseases.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>>. Acesso em: 06 fev. 2018. 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mosquito-borne diseases.** Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/> Acesso em: 02 dez. 2018. 2018.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I.V.; SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S.l.], v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZEQUI, J. A. C.; LOPES, J., MEDRI, I. M. Imaturos de Culicidae (Diptera) encontrados em recipientes instalados em mata residual no município de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, [S.l.], v. 22, n.3, p. 656-61, 2005.

ZHANG, Q.; SUN, K.; CHINAZZI, M.; PASTORE, Y.; PIONTTI, A.; DEAN, N. E.; et al. Spread of Zika virus in the Americas. **Proc Natl Acad Sci USA**, [S.l.], v. 114, n. 22, p. 1-10, 2017.

ANEXOS

Anexo 1. Imagens aéreas da APA Capivari-Monos, cidade de São Paulo. Fonte: SÃO PAULO, 2012.

Anexo 2. Imagens aéreas do Parque Estadual da Cantareira, região metropolitana de São Paulo. Fonte: SÃO PAULO, 2009.

APÊNDICES

Apêndice 1. Lista de espécies coletadas na Área de Proteção Ambiental (APA) Capivari-Monos por número de indivíduos em cada ponto de estudo. Coletas realizadas no período de março de 2015 a abril de 2017.

Táxons	Pontos de Coleta					
	APA Capivari-Monos					
	B	C	E	S	*	N
<i>Aedeomyia</i> (<i>Aedeomyia</i>) <i>squamipennis</i> (LYNCH ARRIBÁLZAGA, 1878)		1				1
<i>Aedes</i> (<i>Georgecraigius</i>) <i>fluviatilis</i> (LUTZ, 1904) * <i>Georgecraigius</i> (<i>Horsfallius</i>) <i>fluviatilis</i>	1	1				2
<i>Aedes</i> (<i>Ochlerotatus</i>) <i>crinifer</i> * <i>Ochlerotatus</i> (<i>Ochlerotatus</i>) <i>crinifer</i>		2		3		5
<i>Aedes</i> (<i>Ochlerotatus</i>) <i>scapularis</i> (RONDANI, 1848) * <i>Ochlerotatus</i> (<i>Ochlerotatus</i>) <i>scapularis</i>	1				1	2
<i>Aedes</i> (<i>Ochlerotatus</i>) <i>serratus</i> (THEOBALD, 1901) * <i>Ochlerotatus</i> (<i>Protoculex</i>) <i>serratus</i>		15	5	1		21
<i>Aedes</i> (<i>Protomacleaya</i>) <i>terrens</i> (WALKER, 1856) * <i>Ochlerotatus</i> (<i>Protomacleaya</i>) <i>terrens</i>		1				1
<i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>) <i>albopictus</i> (SKUSE, 1895)	1					1
<i>Anopheles</i> (<i>Kerteszia</i>) <i>cruzei</i> DYAR e KNAB, 1908	11	155		5		171
<i>Coquillettidia</i> (<i>Rhynchotaenia</i>) <i>albicosta</i> (CHAGAS, 1908)				1		1
<i>Coquillettidia</i> (<i>Rhynchotaenia</i>) <i>albifera</i> (PRADO, 1931)			2			2
<i>Coquillettidia</i> (<i>Rhynchotaenia</i>) <i>chrysonotum/albifera</i> (PERYASSÚ, 1922)	1	1				2
<i>Coquillettidia</i> (<i>Rhynchotaenia</i>) <i>venezuelensis</i> (THEOBALD, 1912)	1			2	2	5
<i>Culex</i> (<i>Carrollia</i>) <i>iridescens</i> (LUTZ, 1905)		1	1			2
<i>Culex</i> (<i>Carrollia</i>) <i>chidesteri</i> DYAR, 1921	5	18	12	2		37
<i>Culex</i> (<i>Culex</i>) <i>dolosus/eduardoi</i> (LYNCH ARRIBÁLZAGA, 1891)		5		2		7
<i>Culex</i> (<i>Culex</i>) <i>nigripalpus</i> THEOBALD, 1901	3	9		4		16
<i>Culex</i> (<i>Culex</i>) <i>quinquefasciatus</i> SAY, 1823	1	29		1		31
<i>Culex</i> (<i>Culex</i>) sp	6	62	32	9		109
<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) <i>delpontei</i> DURET, 1969		1				1
<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) <i>ribeirensis</i> FORATTINI e SALLUM, 1985	1	1	6			8
<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) sp		5				5
<i>Culex</i> (<i>Melanoconion</i>) <i>vaxus</i> DYAR, 1920	4	32				36
<i>Culex</i> grupo <i>coronator</i> DYAR e KNAB, 1906	1					1
<i>Limatus</i> <i>durhamii</i> THEOBALD, 1901	3	17	2	39		61

Táxons	Pontos de Coleta					
	APA Capivari-Monos					
	B	C	E	S	*	N
<i>Mansonia (Mansonia) indubitans</i> DYAR e SHANNON, 1925	2		2	7		11
<i>Mansonia (Mansonia) titillans</i> (WALKER, 1848)				1		1
<i>Runchomyia (Runchomyia) reversa</i> (LANE e CERQUEIRA, 1942)	4	35	7	9		55
<i>Sabethes (Sabethes) purpureus</i> (THEOBALD, 1907)		1				1
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i> (LUTZ, 1905)	17	2			1	20
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) edwardsi</i> (LANE e CERQUEIRA, 1942)			5			5
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) incaudata</i> ROOT, 1928		9	1			10
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) pallidoventer</i> (THEOBALD, 1907)	1	4				5
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) palmata</i> (LANE e CERQUEIRA, 1942)				2		2
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) pilicauda</i> ROOT, 1928	3	4	1	2		10
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) sp</i>	1	6		4		11
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) theobaldi</i> (LANE e CERQUEIRA, 1942)	6	26	15	6	5	58
<i>Wyeomyia (Prosopolepis) confusa</i> (LUTZ, 1905)		81	18	31	4	134
<i>Wyeomyia (Spilonympha) mystes</i> DYAR, 1924		1				1
<i>Wyeomyia roucouyana/chalcocephala</i> DYAR e KNAB, 1906			2			2
N Total	74	525	111	131	13	854

Apêndice 2. Lista de espécies coletadas no Parque Estadual da Cantareira por número de indivíduos em cada ponto de estudo. Coletas realizadas no período de março de 2015 a abril de 2017.

Táxons	Pontos de Coleta			
	PEC			
	PG	TB	TP	Total
<i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> (RONDANI, 1848) * <i>Ochlerotatus (Ochlerotatus) scapularis</i>		4		4
<i>Aedes (Protomacleaya) terrens</i> (WALKER, 1856) * <i>Ochlerotatus (Protomacleaya) terrens</i>	1			1
<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (SKUSE, 1895)		2		2
<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia) chrysonotum</i> (PERYASSÚ, 1922)			1	1
<i>Culex (Carrollia) iridescens</i> (LUTZ, 1905)			1	1
<i>Culex (Carrollia) chidesteri</i> DYAR, 1921	1	1	5	7
<i>Culex (Culex) dolosus/eduardoi</i> (LYNCH ARRIBÁLZAGA, 1891)		1	1	2
<i>Culex (Culex) nigripalpus</i> THEOBALD, 1901	1	2	3	6
<i>Culex (Culex) sp</i>	4	2	10	16
<i>Culex (Melanoconion) ribeirensis</i> FORATTINI e SALLUM, 1985	6			6
<i>Culex (Melanoconion) vaxus</i> DYAR, 1920	23			23
<i>Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus</i> (DYAR e SHANNON, 1924)	1	1	2	4
<i>Limatus durhamii</i> THEOBALD, 1901	7	16	3	26
<i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> (VON HUMBOLDT, 1819)			1	1
<i>Runchomyia (Runchomyia) reversa</i> (LANE e CERQUEIRA, 1942)	3		31	34
<i>Sabethes (Peytonulus) identicus</i> DYAR e KNAB, 1907	1		2	3
<i>Sabethes (Sabethes) gymnothorax</i> HARBACH e PETERSEN, 1992	1			1
<i>Sabethes (Sabethes) purpureus</i> (THEOBALD, 1907)			2	2
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i> (LUTZ], 1905)		1	7	8
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) davisi</i> (LUTZ, 1904)			1	1
<i>Wyeomyia (Phoniomyia) theobaldi</i> (LANE e CERQUEIRA, 1942)	1			1
<i>Wyeomyia (Prosopolepis) confusa</i> (LUTZ, 1905)	72	36	76	184
<i>Wyeomyia (Hystatomyia) cenonus</i> DYAR e KNAB 1915			3	3
<i>Wyeomyia (Spilonympha) mystes</i> DYAR, 1924			1	1
N Total	122	66	150	338

Apêndice 3. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no ponto de coleta Borracharia na APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Apêndice 4. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no ponto de coleta Cachoeira na APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Apêndice 5. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no ponto de coleta Embura na APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Apêndice 6. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no ponto de coleta Siloé na APA Capivari-Monos, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Apêndice 7. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no ponto de coleta Pedra Grande no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Apêndice 8. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no ponto de coleta Trilha da Bica no Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Apêndice 9. Abundância de espécimes de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados no ponto de coleta Trilha do Pinheirinho no Parque Estadual da Cantareira, município de Mairiporã, no período de março de 2016 a abril de 2017.

Apêndice 10. Comparação entre as duas Unidades de Conservação com relação à abundância de táxons de mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados em função da técnica de amostragem (armadilhas CDC copa e solo), no período de março de 2016 a abril de 2017.

[illegible]

Apêndice 12. Identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene NS5 de DENV-2 geradas com o software *BioEdit* 7.0.0 (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas Flavi_143 e Flavi_168 (destacadas em rosa claro) foram detectadas em mosquitos dos táxons *Cx. (Mel.) vaxus* e *Cx. (Cux.)* sp coletados no ponto Cachoeira na APA Capivari-Monos, no período de março de 2016 a abril de 2017, município de São Paulo. As sequências de DENV-1 (azul), DENV-2 (rosa), DENV-3 (verde) e DENV-4 (amarelo) de referência no quadro e foram obtidas a partir do *GenBank* e estão representadas segundo o número de acesso. As informações do isolamento viral de cada cepa estão descritas no quadro 4.

	Flavi_143	Flavi_168	KP188560	KF955510	GUI131878	GUI131905	GUI131953	FJ687432	KJ189367	JN819419	KF704357	KU094070	KM204118
Flavi_143		93,9%	50,0%	40,2%	59,0%	55,9%	59,0%	48,2%	52,3%	85,5%	96,3%	96,3%	96,3%
Flavi_168			45,1%	36,5%	54,2%	51,1%	54,2%	43,5%	47,6%	79,5%	90,3%	91,5%	91,5%
KP188560				77,7%	43,3%	44,0%	43,3%	40,0%	47,6%	49,3%	50,6%	49,3%	49,3%
KF955510					44,5%	43,3%	44,5%	38,8%	44,0%	39,7%	40,9%	41,4%	41,4%
GUI131878						82,7%	100,0%	54,1%	53,5%	54,7%	57,1%	57,1%	57,1%
GUI131905							82,7%	54,1%	52,3%	54,7%	55,9%	55,9%	55,9%
GUI131953								54,1%	53,5%	54,7%	57,1%	57,1%	57,1%
FJ687432									81,1%	50,5%	48,2%	47,0%	47,0%
KJ189367										53,5%	52,3%	51,1%	51,1%
JN819419											89,1%	86,7%	86,7%
KF704357												97,5%	97,5%
KU094070													100,0%
KM204118													

■ Amonstras analisadas
■ DENV-1
■ DENV-2
■ DENV-3
■ DENV-4

Apêndice 13. Identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene NS5 de ZIKV gerada com o software *BioEdit* 7.0.0 (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas Flavi_148, Flavi_150 e Flavi_157 (destacadas em amarelo claro) foram detectadas em mosquitos das espécies *Li. durhami* coletado no ponto Siloé, *An. (Ker.) cruzii* no ponto Cachoeira e *Wy. (Prl.) confusa* coletado no ponto Siloé, respectivamente, na APA Capivari-Monos, no período de março de 2016 a abril de 2017, município de São Paulo. As sequências de ZIKV (azul, laranja e roxo) de referência foram obtidas a partir do *GenBank* e estão representadas segundo o número de acesso. As informações do isolamento viral de cada cepa estão descritas no quadro 4.

	Flavi 148	Flavi 150	Flavi 157	KY014307	MK049247	MK049248	MK049249	MK049250	KU729218	KU014307	MH063264	MH063264	MF794971	KX893855	MF510857	KY785468	KU681082	NC012532	KU497555	MC770183	EU545988	KU963574
Flavi 148		99,6%	99,6%	98,1%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	98,1%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	84,6%	97,0%	95,1%	83,1%	97,3%	97,0%	96,6%	82,7%
Flavi 150			99,6%	98,1%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	98,1%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	84,6%	97,0%	95,1%	83,1%	97,3%	97,0%	96,6%	82,7%
Flavi 157				98,1%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	98,1%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	84,6%	97,0%	95,1%	83,1%	97,3%	97,0%	96,6%	82,7%
KY014307					99,6%	99,2%	99,2%	99,2%	99,6%	98,8%	98,8%	99,2%	99,2%	99,2%	85,7%	98,8%	97,0%	85,0%	99,2%	98,8%	97,3%	83,8%
KU729218					99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,2%	99,2%	99,6%	99,6%	99,6%	86,1%	99,2%	97,3%	85,3%	99,6%	99,2%	97,7%	84,2%
MK049247					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
MK049249					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
MF783073					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
MH063264					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
MF794971					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
KX893855					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
MF510857					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
KY785468					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
KU681082					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
NC012532					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
KU497555					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
MC770183					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
EU545988					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%
KU963574					100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,6%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	86,1%	99,6%	97,7%	85,7%	100,0%	99,6%	98,1%	84,6%

■ Amonstras analisadas ■ África ■ Américas ■ Ásia

Apêndice 14. Identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene NS5 de ZIKV gerada com o software *BioEdit* 7.0.0 (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas Flavi_148, Flavi_150 e Flavi_157 (destacadas em amarelo) foram detectadas em mosquitos das espécies *Li. durhami* coletado no ponto Siloé, *An. (Ker.) cruzii* no ponto Cachoeira e *Wy. (Prl.) confusa* coletado no ponto Siloé, respectivamente, na APA Capivari-Monos, no período de março de 2016 a abril de 2017, município de São Paulo. As sequências de ZIKV (azul, laranja e roxo) de referência foram obtidas a partir do *GenBank* e estão representadas segundo o número de acesso. As informações do isolamento viral de cada cepa estão descritas no quadro 4.

	Flavi 148	Flavi 150	Flavi 157	KY014307	KU729218	MK049247	MK049249	MF783073	MH063364	MF794971	KX893855	MF510857	KY785468	KU681082	NC012532	KU497555	MG770183	EU545988	KU963574
Flavi 148		100,0%	98,8%	94,1%	93,0%	91,8%	91,8%	91,8%	90,6%	91,8%	91,8%	57,4%	90,6%	86,0%	56,8%	91,8%	90,6%	89,4%	54,0%
Flavi 150			98,8%	94,1%	93,0%	91,8%	91,8%	91,8%	90,6%	91,8%	91,8%	57,4%	90,6%	86,0%	56,8%	91,8%	90,6%	89,4%	54,0%
Flavi 157				94,1%	93,0%	91,8%	91,8%	91,8%	90,6%	91,8%	91,8%	57,4%	90,6%	86,0%	56,8%	91,8%	90,6%	89,4%	54,0%
KY014307					98,8%	97,6%	97,6%	97,6%	96,5%	60,9%	97,6%	60,9%	96,5%	91,8%	62,5%	97,6%	96,5%	91,8%	57,4%
KU729218						98,8%	98,8%	98,8%	97,6%	62,0%	98,8%	62,0%	97,6%	93,0%	63,6%	98,8%	97,6%	93,0%	58,6%
MK049247							100,0%	100,0%	98,8%	62,0%	100,0%	62,0%	98,8%	94,1%	64,7%	100,0%	98,8%	94,1%	59,7%
MK049249								100,0%	98,8%	62,0%	100,0%	62,0%	98,8%	94,1%	64,7%	100,0%	98,8%	94,1%	59,7%
MF783073									98,8%	62,0%	100,0%	62,0%	98,8%	94,1%	64,7%	100,0%	98,8%	94,1%	59,7%
MH063364										98,8%	98,8%	60,9%	100,0%	93,0%	63,6%	98,8%	97,6%	93,0%	60,9%
MF794971											100,0%	62,0%	98,8%	94,1%	64,7%	100,0%	98,8%	94,1%	59,7%
KX893855												62,0%	98,8%	94,1%	64,7%	100,0%	98,8%	94,1%	59,7%
MF510857													60,9%	57,4%	80,4%	62,0%	62,0%	60,9%	89,5%
KY785468														93,0%	63,6%	98,8%	97,6%	93,0%	60,9%
KU681082															98,1%	94,1%	93,0%	93,0%	55,8%
NC012532																	64,7%	62,5%	80,4%
KU497555																		94,1%	59,7%
MG770183																			93,0%
EU545988																			57,4%
KU963574																			

■ Amonstras analisadas

■ África

■ Américas

■ Ásia

CURRICULO LATTES

Karolina Morales Barrio Nuevo

Bolsista de Mestrado do CNPq

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8220815231313335>
- Última atualização do currículo em 05/02/2019

Bióloga formada pela Universidade Paulista - UNIP (Bacharelado e Licenciatura). Atualmente é aluna de Mestrado da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP), tendo o Instituto Adolfo Lutz (IAL) como colaborador no projeto de mestrado (Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial). Pesquisa relacionada com mosquitos infectados por flavivírus. Bolsista CNPq. Realizou o Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) na FSP/USP na área de Entomologia Médica e Soroepidemiologia no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP). Bolsista pela FUNDAP na CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, no setor de Comunidades Aquáticas. Trabalhou com a comunidade bentônica e a qualidade ambiental. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Karolina Morales Barrio Nuevo

Nome em citações bibliográficas

Barrio-Nuevo, K.M.; BARRIO-NUEVO, K. M.; BARRIO-NUEVO, KM

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública
Pacaembu
01246904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617714
URL da Homepage: <http://novahygeia.fsp.usp.br/site/>

Formação acadêmica/titulação

2017

Mestrado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Identificação de infecção por *Flavivirus* em mosquitos (Diptera: Culicidae) no Parque Estadual da Cantareira e na Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos, Estado de São Paulo, Orientador: Dr. Mauro Toledo Marrelli.
Coorientador: Dr. Renato Pereira de Souza.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: Culicidae; *Flavivirus*; APA Capivari-Monos; Parque Estadual da Cantareira; Isolamento Viral; RT-qPCR.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Entomologia.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Epidemiologia.
Setores de atividade: Atividades de atenção à saúde humana.

2016 - 2017

Aperfeiçoamento em Entomologia Médica e Soroepidemiologia. (Carga Horária: 2000h).
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP/USP, Brasil.
Título: Análise do Uso Simultâneo de Múltiplas Técnicas de Coleta para Inventário e Estudo da Diversidade de Mosquitos (Diptera: Culicidae).. Ano de finalização: 2017.
Orientador: Mauro Toledo Marrelli.
Bolsista do(a): Secretaria de Estado da Saúde, SES/SP, Brasil.

2012 - 2015

Mauro Toledo Marrelli

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6872138193111416>
- Última atualização do currículo em 26/10/2018

Professor Associado do Depto. de Epidemiologia da FSP-USP (desde 2011). Possui Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Mackenzie (1990). Aperfeiçoamento em Protozoologia pelo Instituto de Medicina Tropical (FM-USP, 1992). Mestrado em Parasitologia, pelo ICB, Universidade de São Paulo (1995) e doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) (ICB-USP, 2000). Pós-doutorado pela Case Western Reserve University (Cleveland-OH) (2002), e pela Johns Hopkins School of Public Health (Johns Hopkins University) (Baltimore-MD) (2005). Tem experiência na área de Parasitologia e Epidemiologia de doenças transmitidas por vetores, atuando principalmente nos seguintes temas: ecologia e biologia molecular de vetores, marcadores moleculares em entomologia, controles alternativos de vetores. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Mauro Toledo Marrelli

Nome em citações bibliográficas

MARRELLI, M. T.;MARRELLI, MAURO TOLEDO;MARRELLI, MAURO;Marrelli, MT;Marrelli, Mauro Toledo;Marrelli, Mauro T.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Av. Dr. Arnaldo 715
Cerqueira César
01246904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617922

Formação acadêmica/titulação

1996 - 2000

Doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)pgbmp@icb.usp.br (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Anopheles oswaldoi (Diptera, Culicidae): Análise do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico e da susceptibilidade à infecção com Plasmodium vivax, Ano de obtenção: 2000.
Orientador: Osvaldo Marinotti.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

1993 - 1995

Mestrado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) pgbmp@icb.usp.br (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Anticorpos anti-Pfs2400 de gametócitos de Plasmodium falciparum em populações da Região Amazônica, Ano de Obtenção: 1996.
Orientador: JK.Kloetzel.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

1992 - 1993

Aperfeiçoamento em Instituto de Medicina Tropical.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Ano de finalização: 1993.
Orientador: JK.Kloetzel.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

1986 - 1989

Graduação em Bacharelado Em Ciencias Biologicas.
Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil.