**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
Departamento de Epidemiologia**

**Paridade, desenvolvimento ovariano e transmissão vertical do
vírus dengue em fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*
(Diptera: Culicidae), na cidade de São Paulo.**

Pâmela dos Santos Andrade

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

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientador: Profa. Dra. Tamara Nunes de Lima-
Camara**

São Paulo

2018

**Paridade, desenvolvimento ovariano e transmissão vertical do
vírus dengue em fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*
(Diptera: Culicidae), na cidade de São Paulo.**

Pâmela dos Santos Andrade

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

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientador: Profa. Dra. Tamara Nunes de Lima-
Camara**

Versão Revisada

São Paulo

2018

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.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Santos Andrade, Pâmela

Paridade, desenvolvimento ovariano e transmissão vertical do vírus dengue em fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), na cidade de São Paulo / Pâmela Santos Andrade; orientadora Tamara Nunes de Lima Camara. -- São Paulo, 2018.

75 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Paridade. 2. Discordância gonotrófica. 3. Transmissão Vertical de vírus. 4. *Aedes aegypti*. 5. *Aedes albopictus*. I. Nunes de Lima-Camara, Tamara, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho a minha mãe, a
mulher mais forte que já conheci, e
quem acreditou em meus sonhos
desde criança.*

Agradecimentos

Aos meus pais Vanda e Cristiano, as minhas irmãs Tâmara e Taciane, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, e ao meu pequeno sobrinho curioso Pedro Henrique.

Ao meu namorado que sempre foi o meu maior incentivador e companheiro, sempre acreditou em mim, mais do que eu mesma.

Ao meu cunhado Cláudio, meus primos Anderson e Adisson, a minha querida tia Lúcia, e todos os familiares que me apoiaram nesta etapa.

À minhas amigas especiais Gisele Alves e Gislaine Alves, e toda sua família que aprendi a amar.

Aos grandes professores Mauro e Julia do ensino médio, me fizeram ter certeza que a biologia era o caminho certo a seguir.

A todos os professores da minha graduação em biologia, que me deram base e ensinamentos preciosos que me transformaram.

À professora Dr^a. Carmen Taipei Lagos, foi minha professora de zoologia dos invertebrados, e indicou a Faculdade de Saúde Pública da USP, para a continuação dos meus estudos, ótimo conselho.

Aos meus bons e grandes amigos da graduação Juliana Borges, Juliana Rissaldi, Ana Flávia Baroni, Laura Brasil, Cristina Leite, Karla Moya, Michele Garzon, José, Gabriel Borali, José Gabriel, Vinícius Damasceno e Silvio Baptista(Fominhas).

À minha orientadora Dr^a Tamara Nunes de Lima-Camara, que desde a entrevista para o aprimoramento profissional apostou em mim, agradeço por toda a dedicação, incentivo e ensino, além de uma ótima professora, foi amiga.

Ao Paulo Roberto Urbinatti por toda ajuda no dia a dia do laboratório e trabalhos de campo, pelas conversas e dicas.

À Rosa Maria Marques Sá de Almeida que além da ajuda no laboratório e trabalhos de campo, se tornou uma grande amiga.

Aos meus amigos de laboratório Ronan Coelho, Filipe Pancetti, Marta Ribeiro, Bruno Nakazato, Thais Azevedo, Thais Souza e Victor Lima agradeço a todos pela ajuda no trabalho, pelas nossas conversas e risadas.

Aos membros da banca examinadora, Dr^a Licia Natal e Dr^a Nildimar Honório, pelo tempo disponibilizado para leitura e sugestões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da minha bolsa de estudos durante ao mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento dos projetos de pesquisa, dos quais resultou esta dissertação.

A todos que fizeram parte da minha caminhada, meus sinceros agradecimentos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

Resumo

ANDRADE, PS. Paridade, desenvolvimento ovariano e transmissão vertical do vírus dengue em fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), na cidade de São Paulo. [Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2018.

No Brasil, a transmissão dos quatro sorotipos do vírus dengue ao homem ocorre através da picada da fêmea infectada de *Aedes aegypti*, também considerado vetor principal de outros arbovírus, como chikungunya e Zika. Além dessa espécie, o *Aedes albopictus* é considerado vetor potencial desses arbovírus. Populações brasileiras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* demonstraram a capacidade de realizar alguns repastos sanguíneos em diferentes hospedeiros dentro de um único ciclo de oviposição, o que chamamos de discordância gonotrófica. Paralelamente, a vigilância do DENV a partir de sua detecção em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* que nunca se alimentaram de sangue é essencial para uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão vertical desse agente etiológico. O objetivo desse estudo foi avaliar a paridade, a presença de sangue no estômago e o desenvolvimento ovariano de fêmeas de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* coletadas no Parque Esporte para Todos da Universidade de São Paulo - Cidade Universitária e na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, bem como detectar DENV em fêmeas dessas espécies, oriundas de ovos coletados no Parque Municipal do Piqueri, São Paulo. Fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* capturadas tiveram o abdômen e ovários avaliados, através da técnica de dissecação. A investigação do RNA viral foi feita através de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). Foram encontrados 27% e 34% de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* paridas, respectivamente, bem como 77% e 60% de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente, com sangue no estômago. Foi constatado que 36% das fêmeas de *Ae. aegypti* estavam em discordância gonotrófica, enquanto essa taxa para *Ae. albopictus* foi de 27%. A transmissão vertical não foi detectada nas populações estudadas. O campus da Faculdade de Saúde Pública e o Parque dos Esportes mostraram-se favoráveis para a manutenção e longevidade das duas espécies estudadas. Apesar da transmissão vertical natural não ter sido detectada em nosso estudo, a investigação desse fenômeno é essencial para a compreensão da dinâmica de transmissão de arbovírus na natureza.

Palavras-Chave: Culicídeos Vetores, paridade, discordância gonotrófica, RT-PCR.

Abstract

ANDRADE, PS. Parity ovarian development and vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in the city of São Paulo. [Dissertation (Public Health)]. São Paulo: Faculty of Public Health, University of São Paulo; 2018.

In Brazil, the transmission of the four serotypes of the dengue virus to human is transmitted out through the bite of the infected female of *Aedes aegypti*, it is also considered a vector of the main etiological agents of other arboviruses, such as chikungunya and Zika. In addition, *Aedes albopictus* is considered a potential arbovirus vector. Brazilian populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* have already demonstrated an ability to perform some blood supply in different hosts within a single oviposition cycle, which we call gonotrophic discordance. At the same time, surveillance of the DENV from its detection in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* that has never fed on blood is essential for a better understanding of the dynamics of vertical transmission of etiologic agent. The objective was to evaluate the parity, the presence of blood in the stomach and the ovarian development of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* collected in the Parque Esporte para todos of Universidade de São Paulo – Cidade Universitária and Faculdade de Saúde Pública of Universidade de São Paulo, as well as detecting DENV in females of these species, from eggs collected in the Parque Municipal do Piqueri, São Paulo. Females of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* captured, from the results obtained, through the technique of dissection. The investigation of the virus was done through Reverse Transcription followed by Polymerase Chain Reaction. We found 27% and 34% of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* parous, 77% and 60% of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, respectively, with blood in the stomach. It was found that 36% of *Ae. aegypti* was in gonotrophic discordance, while that rate for *Ae. albopictus* was 27%. Vertical transmission was not detected in the selections studied. The campus of the Faculdade de Saúde Pública and the Parque Esporte para todos were favorable to the maintenance and longevity of the two species studied. Vertical nature transmission was not detected in our study, an investigation is an essential event for understanding the transmission of arbovirus data in nature.

Keywords: Culicides Vectors, parity, gonotrophic discordance, RT-PCR.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	10
	1.1 Culicídeos Vetores	10
	1.1.1. <i>Ae. aegypti</i>	10
	1.1.2. <i>Ae. albopictus</i>	13
	1.2 Ciclo Gonotrófico	14
	1.3 Paridade e Concordância Gonotrófica	16
	1.4 Principais arboviroses circulantes do Brasil	17
	1.4.1 Dengue	17
	1.4.2 Chikungunya	20
	1.4.3 Zika	21
	1.4.4 Febre Amarela	22
	1.5 Transmissão Vertical	26
	1.6 Justificativa	29
2	OBJETIVOS	30
	2.1 Geral	30
	2.2 Específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
	3.1 Áreas de Estudo	31
	3.2 Atividades no Campo	33
	3.3 Atividades no Laboratório	35
	3.3.1 Identificação dos Mosquitos	35
	3.3.2 Dissecção do estômago e ovários	36
	3.3.3 Detecção do vírus Dengue em Fêmeas	38
	3.3.3.1 Extração do RNA	38
	3.3.3.2 Purificação do RNA	38
	3.3.3.3 RT-PCR	39
	3.3.3.4 Sequenciamento de Nucleotídeo	41
	3.4 Análise dos Dados	42
4	RESULTADOS	43
	4.1 Paridade e Discordância Gonotrófica	43
	4.2 Transmissão Vertical	47
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS	60
	CURRÍCULO LATTES	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Culicídeos Vetores

Pertencente ao Filo Arthropoda e à ordem Diptera, a família Culicidae é composta por mosquitos que, quando adultos, são alados, possuem o segundo par de asas modificado em alar, além de antenas e pernas longas. Dentre muitas outras características dessa família, destaca-se que a maioria das fêmeas se alimenta de sangue, tornando-se uma possível fonte transmissora de agentes etiológicos ao homem, demonstrando, assim, a grande relevância para a saúde pública (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Os culicídeos apresentam desenvolvimento holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto terrestre/alar (FUNASA, 2001).

A família Culicidae está dividida em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae. Ambas possuem importância para a saúde pública. Na subfamília Anophelinae, o gênero *Anopheles* tem mosquitos responsáveis pela transmissão de plasmódios que podem causar malária (PITTENDRIGH, 1948; FORATTINI, 2002). Na Subfamília Culicinae, que possui maior número de representantes, também ocorrem mosquitos vetores e dentre os muitos de importância para a saúde pública mundial e brasileira (FORATTINI, 2002), focamos nestas duas espécies: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse).

1.1.1 *Aedes aegypti*

Provavelmente oriundo da região etiópica, tendo sido originalmente descrito no Egito, o mosquito *Ae. aegypti* acompanhou o homem em sua longa e ininterrupta migração pelo mundo e permaneceu onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação. Hoje, essa espécie de mosquito é considerada cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais do mundo,

limitando-se a altitudes de 1.000 metros, e temperaturas baixas (NELSON, 1986; CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FUNASA, 2001).

Distribuído em todos os estados brasileiros (Figura 1), *Ae. aegypti* é considerado o principal vetor dos quatro sorotipos do vírus dengue (GUBLER, 2002), bem como dos vírus chikungunya e Zika (NUNES et al., 2015; VASCONCELOSS, 2015). Adicionalmente, *Ae. aegypti* foi o principal responsável pela circulação do vírus causador da febre amarela urbana no Brasil, no começo do século XX (BENCHIMOL, 2001). Essa espécie possui hábitos diurnos, apresentando atividades diárias, como cópula, alimentação e oviposição, ocorrendo principalmente no amanhecer e durante o crepúsculo vespertino.

Com elevada frequência, as fêmeas dessa espécie colocam seus ovos em criadouros artificiais, como pneus usados, garrafas, latas, potes, vasos de planta e reservatórios de água parada (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI e BRITO, 2003). Entretanto, no Brasil e em outros países americanos, o *Ae. aegypti* tem sido reportado criando-se em recipientes naturais, como bromélias usadas com fim ornamental, buracos em árvore, escavação em rocha e bambu (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; VAREJÃO et al., 2005; LIMA-CAMARA et al., 2016; BERMUDI, 2017). Fêmeas de *Ae. aegypti* parecem ser capazes de se adaptarem quanto à escolha de sítios de oviposição, podendo até depositar seus ovos em água mais turva e poluída (CLEMENTS, 1999; CHITOLINA et al., 2016). Além disso, os ovos dessa espécie de *Aedes* mantêm-se viáveis por até 492 dias após a postura, o que chamamos de quiescência. Tal capacidade lhes confere vantagem para manutenção da população nos períodos secos, sendo também uma adaptação para a dispersão passiva, pois os ovos postos, por exemplo, em pneus usados, podem ser levados para outros locais, onde eclodirão em contato com água (SILVA et al., 1998; SILVA E SILVA, 1999).

Figura 1. Distribuição do *Ae. aegypti* nos municípios brasileiros em 2006.

Extraído de: MISTÉRIO DA SAÚDE, 2006.

O *Ae. aegypti* é conhecido nas Américas por seu alto grau de antropofilia, e por normalmente estar associado à presença humana, pois é no interior das casas, ou próximo a elas, que as fêmeas de *Ae. aegypti* encontram abrigo e hospedeiros para o repasto sanguíneo (TAUIL, 2001; FORATTINI, 2002).

As fêmeas grávidas podem depositar seus ovos em vários recipientes diferentes dentro de um único ciclo de oviposição, num fenômeno conhecido como “oviposição aos saltos” (EDMAN et al., 1998). Adicionalmente, parece ser frequente que as fêmeas de *Ae. aegypti* suguem sangue em mais de um hospedeiro vertebrado dentro de um único ciclo de oviposição. Esses comportamentos são importantes para a epidemiologia das doenças que envolvem esse mosquito, como a dengue, a chikungunya e a Zika, uma vez que podem auxiliar a expansão do vetor e aumentar a chance de aquisição e disseminação de patógenos (HONÓRIO et al., 2003; LIMA-CAMARA et al., 2007).

1.1.2 *Aedes albopictus*

Aedes albopictus é uma espécie originária do sudeste da Ásia e, assim como *Ae. aegypti*, é encontrado em áreas tropicais e subtropicais do mundo, bem como em regiões de clima temperado. O primeiro registro do *Ae. albopictus* no Brasil foi no final da década de 1980, em 1986, no estado do Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986). Aos poucos, foi invadindo estados vizinhos, como Espírito Santo e São Paulo (BRITO et al., 1986; GOMES e MARQUES, 1988).

Observa-se crescente e acelerada expansão do *Ae. albopictus* desde sua introdução no país, sendo que, em 2002, apenas 7 estados brasileiros ainda não haviam relatado infestação por essa espécie: Amapá, Roraima, Acre, Tocantins, Piauí, Ceará e Sergipe (SANTOS, 2003). Porém, no início de 2015, este cenário havia mudado, com registro do *Ae. albopictus* também nos estados do Ceará, Tocantins, Roraima, Piauí e Sergipe (CARVALHO et al., 2014; PANCETTI et al., 2015).

No Brasil, *Ae. albopictus* apresenta elevada frequência em ambientes rurais, semi silvestres e silvestres, sendo comumente encontrado em áreas onde há elevada cobertura vegetal e baixa concentração de pessoas. Entretanto, essa espécie também é frequentemente capturada em áreas consideradas periurbanas, onde há a presença de vegetação e habitações humanas (BRAKS et al., 2003; LIMA-CAMARA et al., 2006). Adicionalmente, *Ae. albopictus* é mais resistente ao frio em comparação com o *Ae. aegypti*, o que justifica seu encontro em países temperados da Europa (ROIZ et al., 2007; CAMINADE et al., 2012).

Os criadouros do *Ae. albopictus* são representados principalmente por recipientes naturais, como bromélias, ocos de árvore e internódios de bambus, mas esta espécie também pode ter suas formas imaturas encontradas em criadouros artificiais, semelhantes aos do *Ae. aegypti* (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BARRERA, 1996; FORATTINI, et al, 1998, FUNASA, 2001).

Com maior valência ecológica, podendo se alimentar não só de sangue humano, como também de outros mamíferos e até aves, a relação do papel do *Ae. albopictus* na transmissão do vírus dengue ao homem é limitada, pois ainda não foi incriminado como vetor natural no Brasil (FUNASA, 2001; DEGALLIER et

al., 2003). Entretanto, foi comprovado que, em condições de laboratório, as populações brasileiras de *Ae. albopictus* têm a competência de se infectar não só com o vírus dengue mas também o amarelo e transmiti-los com sucesso (MILLER e BALLINGER, 1988; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2004). Adicionalmente, populações brasileiras de *Ae. albopictus* também mostraram competência vetorial para se infectarem e transmitirem os vírus chikungunya (VEGA-RÚA et al., 2014), Zika (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

A capacidade vetorial de um mosquito envolve alguns aspectos de sua biologia e comportamento, como antropofilia, endofilia, longevidade e presença de discordância gonotrófica. Estudando o ciclo gonotrófico de fêmeas vetores podemos diagnosticar a longevidade e discordância gonotrófica.

1.2 Ciclo Gonotrófico

Denominamos ciclo gonotrófico o período que compreende a procura de um hospedeiro vertebrado pela fêmea do mosquito, passando pela realização do repasto sanguíneo, digestão do sangue ingerido, maturação dos ovários e, finalmente, a oviposição (CHARLWOOD et al., 1980).

Normalmente, no segundo ou terceiro dia após a emergência, as fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* quando inseminadas voam à procura de um hospedeiro a fim de realizarem um repasto sanguíneo (MAC DONALD, 1956). O repasto sanguíneo é essencial para que as fêmeas dessas espécies consigam desenvolver seus ovos, pois o sangue contém diversos aminoácidos indispensáveis para a vitelogênese (CLEMENTS, 1992; HARRINGTON et al., 2001). Após o repasto sanguíneo, inicia-se o processo de digestão do sangue ingerido e, concomitantemente, de maturação dos ovários. Conforme a digestão vai avançando, a coloração do sangue ingerido, inicialmente vermelho, vai se tornando marrom. Uma vez que o sangue foi completamente digerido, a fêmea encontra-se grávida e, geralmente, pronta para ovipor. (KLOWDEN e LEA, 1979; LIMA-CAMARA et al., 2007).

O aparelho reprodutor feminino dos mosquitos consiste de um par de ovários, situados na porção posterior do abdômen, conectados por ovidutos

laterais a um oviduto comum, que se abre na vagina (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) (Figura 2). No interior de cada ovário, existem ovaríolos em números variados, sendo que foram estimados entre 50 e 150 para *Ae. aegypti* (COLLESS e CHELLAPAH, 1960). Cada ovaríolo consiste de um germário anterior seguido de um vitelário, envolvidos pela membrana ovariolar e pela membrana ovariana. O germário contém células ainda pouco diferenciadas. O vitelário possui 2 ou 3 folículos, sendo cada qual formado por um oócito, 7 trofócitos e um epitélio folicular circundante (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 2. Esquema do aparelho reprodutor feminino de mosquito. A: aparelho reprodutor feminino - 1: vagina; 2: glândula acessória; 3: espermatéca; 4: oviduto lateral; 5: ovário. B: ovaríolo - 1: membrana ovariolar; 2: germário; 3: segundo folículo; 4: trofócitos do terceiro folículo; 5: epitélio folicular; 6: oócito repleto de vitelo; 7: oviduto interno.

Extraído de: CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994.

No processo de maturação, os ovaríolos passam por vários estágios, que foram classificados de acordo com a quantidade de vitelo presente. O estágio N não possui vitelo e só fêmeas que nunca fizeram repasto sanguíneo e oviposição são encontradas neste estágio. Posteriormente, os ovaríolos passam por estágios iniciais (I e I-II), estágio intermediário (II), e estágios finais (III, IV e V), onde a quantidade de vitelo toma quase todo o ovo (MER, 1936; CHRISTOPHERS, 1960).

1.3 Paridade e Concordância Gonotrófica

Podemos diagnosticar se uma fêmea de mosquito realizou oviposição alguma vez ou não, o que chamamos de paridade, a partir da observação das traqueíolas que oxigenam os ovários. Os ovários dos mosquitos possuem rico suprimento de oxigênio, fornecido por uma rede de traqueíolas. As fêmeas são consideradas nulíparas, ou seja, nunca realizaram oviposição, quando possuem traqueíolas com extremidades enoveladas (Figura 3A), enquanto as que completaram pelo menos um ciclo de oviposição apresentam traqueíolas com extremidades distendidas e são denominadas paridas (Figura 3B) (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A partir do estágio III de desenvolvimento, os folículos ovarianos apresentam volume aumentado, o que causa a extensão das extremidades das traqueíolas. Portanto, não é possível determinar com segurança se uma fêmea é nulípara ou parida quando ela apresenta ovários em estágios avançados de maturação (III a V) (DETINOVA, 1962).

Figura 3. A: Ovário de uma fêmea nulípara, apresentando traqueíolas com extremidades enoveladas. B: Ovário de uma fêmea parida, apresentando traqueíolas com extremidades distendidas.

Extraído de: CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994.

Para uma fêmea de mosquito colocar o conjunto de ovos produzido durante um ciclo gonotrófico, é aparentemente suficiente que ela realize apenas um

repasto sanguíneo completo. Quando isso acontece, diz ter havido concordância gonotrófica. Entretanto, fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* de diferentes lugares do mundo, inclusive o Brasil, apresentaram o que chamamos de discordância gonotrófica, ou seja, sugaram o sangue de mais de uma pessoa dentro de um único ciclo de oviposição (SCOTT ET al., 1993; SCOTT et al., 2000, BARATA et al., 2001; LIMA-CAMARA et al., 2007). A importância epidemiológica da existência de discordância gonotrófica nesses mosquitos é que, ao realizarem mais de uma alimentação sanguínea em um único ciclo de oviposição, fêmeas dessas espécies aumentam suas chances de se infectarem e transmitirem os vírus que podem albergar, como dengue, chikungunya e Zika.

A análise da relação dos estágios de maturação dos ovários com a presença e coloração ou ausência de sangue no estômago é uma das maneiras de se inferir se as fêmeas estão apresentando ou não discordância gonotrófica, o que representa uma importante informação para a entomologia médica. Paralelamente, o conhecimento da paridade em uma população de mosquitos é de suma importância epidemiológica, pois a partir dos achados do estado das fêmeas (nulíparas ou paridas), podemos avaliar as condições que favorecem a sobrevivência e longevidade dessas espécies. Quando aplicado a insetos vetores de patógenos que causam doenças, essas informações podem subsidiar a avaliação dos programas de controle, pois propicia o conhecimento sobre sua capacidade de se infectar e transmitir o vírus (BARATA et al., 2001; FERNANDEZ e FORATTINI, 2003; LIMA-CAMARA et al., 2007).

1.4 Principais arboviroses circulantes no Brasil

1.4.1 Dengue

A dengue é uma arbovirose causada por quatro sorotipos virais antigenicamente distintos, designados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, pertencentes à Família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus* (FORATTINI, 2002; TAUIL, 2002).

Nas Américas, o ciclo da dengue é essencialmente urbano, tendo como elementos fundamentais dessa dinâmica de transmissão o agente etiológico

viral, o mosquito *Ae. aegypti* e o ser humano. Tal ciclo assume aspecto domiciliado, sendo mantido por essa espécie de mosquito de hábitos diurnos e com elevado grau de antropofilia (FORATTINI, 2002).

No Brasil, os primeiros casos de dengue foram relatados a partir de critério clínico, com referências de epidemias em São Paulo, em 1916, e em Niterói, Rio de Janeiro, em 1923. Porém, somente em 1981- 1982, houve uma epidemia na cidade de Boa Vista, Roraima, com confirmação de diagnóstico clínico e laboratorial e isolamento dos sorotipos 1 e 4 (OSANAI, 1984). Apesar da epidemia, esses sorotipos isolados não se espalharam pelo território brasileiro, sendo controlados com êxito em Boa Vista, através de medidas de combate às formas aladas e larvárias do vetor, por parte da Superintendência de Campanhas de saúde pública (SUCAM) (OSANAI, 1984).

Em 1986, o sorotipo DENV-1 foi isolado no município de Nova Iguaçu, no Rio de Janeiro, numa região de grande concentração populacional, problemas de infraestrutura urbana e com grande fluxo de pessoas de outros estados, facilitando, assim, a rápida dispersão do vírus e causando uma epidemia explosiva (SCHATZMAYR et al., 1986; NOGUEIRA et al., 2001). Em 1990, foi isolado pela primeira vez o DENV-2 do dengue, no município de Niterói, no Rio de Janeiro, provocando, pela primeira vez, uma epidemia de dengue hemorrágica no Brasil (NOGUEIRA et al., 1990).

O sorotipo DENV-3 foi encontrado circulando no país pela primeira vez no final de 2000, novamente no município de Nova Iguaçu, no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 2001, NOGUEIRA et al., 2005), enquanto o sorotipo DENV-4 foi isolado no norte do Brasil, no estado de Roraima, em 2010, sendo reintroduzido em território nacional (TEMPORÃO et al., 2011) (Figura 4). Dessa forma, atualmente, todos os sorotipos do vírus dengue encontram-se circulando no Brasil.

Figura 4. Histórico dos anos e locais de introdução e reintrodução dos sorotipos do DENV no Brasil.

Fonte: ANDRADE, 2017.

Em 2015, o Brasil vivenciou uma grande epidemia de dengue, sendo registrados 1.638.058 casos prováveis de dengue no país. Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis em relação ao total do país, seguida da região Nordeste (MS – SECRETARIA DA VIGILÂNCIA E SAÚDE, 2016). Recordando que houve introdução de dois novos vírus - Chikungunya e Zika, no Brasil nos anos de 2014 e 2015. Estes provocam doenças com sintomas parecidos com dengue, podendo então muitos casos de zika e chikungunya ser notificado como casos de dengue, fazendo o número de casos de prováveis de dengue no ano de 2015 ser alto.

Em 2016, o número de casos prováveis teve uma ligeira redução e passou para 1.483.623, enquanto que, em 2017, foram notificados 251.711 casos prováveis (MS – SECRETARIA DA VIGILÂNCIA E SAÚDE, 2018). Até a semana epidemiológica 25 de 2018, foram notificados 171.582 casos prováveis, com a região Centro-Oeste apresentando maior número de casos prováveis (64.563), seguida da região sudeste (51.172), em relação ao total do país (MS – SECRETARIA DA VIGILÂNCIA E SAÚDE, 2018).

1.4.2 Chikungunya

A chikungunya é causada por um vírus de mesmo nome (CHIKV), pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. CHIKV foi isolado pela primeira vez na década de 1950, na região que hoje corresponde à Tanzânia, durante um surto atribuído, inicialmente, ao vírus dengue (DONALISIO e FREITAS, 2014). Chikungunya tem seus sintomas muito parecidos com os da dengue, porém produz uma síndrome febril de início súbito e debilitante e, em virtude da intensidade dos sintomas articulares, originou-se ao nome da doença que, no idioma africano Makonde, significa “andar curvado”. A artralgia parece afetar até 80% dos pacientes e persiste durante meses e até mesmo anos (PIALOUX et al., 2007).

Em outubro de 2013, o CHIKV chegou às Américas pelo Caribe, resultando em milhares de infecções. No Brasil, a transmissão autóctone foi detectada em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque (Amapá). Ao longo de 2014, foram confirmados 2.772 casos de chikungunya, distribuídos em seis Unidades

Federativas: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1). Em 2015, no Amapá, foi identificado o genótipo asiático e, na Bahia, foi identificado o genótipo africano East/Central/South Africa (ECSA) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; TEIXEIRA et al., 2015).

Em 2016, o número de casos prováveis de chikungunya foi de 277.882, enquanto que, em 2017, foram notificados 185.854 casos prováveis. Em 2018, até a semana 25, foram notificados 53.089 casos prováveis (MS – SECRETARIA DA VIGILÂNCIA E SAÚDE, 2018).

1.4.3 Zika

Outra arbovirose transmitida pelo *Ae. aegypti* e que tem o *Ae. albopictus* como vetor potencial no Brasil é a doença aguda pelo vírus Zika. O agente etiológico dessa doença é o vírus Zika (ZIKV), da Família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*. Apesar de ter sido isolado pela primeira vez no Brasil recentemente, no começo de 2015, promoveu grandes problemas para a saúde pública brasileira.

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em macaco *Rhesus*, na Floresta Zika, em Uganda, em 1947, durante Programa de Vigilância de Febre Amarela (DICK et al., 1952). Foi isolado pela primeira vez no Brasil em março de 2015, na cidade de Camaçari – Bahia, em pacientes com sintomas parecidos com os da dengue (CAMPOS et al., 2015). Logo em seguida, foi identificado em várias regiões do Brasil, mostrando grande capacidade de dispersão (VASCONCELOS, 2015).

A doença aguda pelo vírus Zika parecia ser uma doença de sintomas leves, porém, na Polinésia Francesa e no Brasil, registraram-se quadros mais severos para o homem, incluindo comprometimento do Sistema Nervoso Central (Síndrome de Guillain-Barré e meningite) (ZANLUCA et al., 2015; CAMPOS, 2015). Além da transmissão pela picada do mosquito infectado, o ZIKV mostrou-se capaz de ser transmitido ao homem diretamente por relação sexual, secreções (MUSSO et al., 2015; GOURINAT, et al., 2015) e de mãe para feto (transmissão vertical). Este último tipo de transmissão possibilitou o vírus entrar

em contato com o feto na gestação. Com isso, ZIKV mostrou-se agressivo na interação, causando o que foi inicialmente chamado de microcefalia e, hoje, conhecido como Síndrome Congênita do Zika, já que se sabe de muitas outras possibilidades de danos ao bebê (CALVET et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; EICKMANN et al., 2016).

Em 2016, foram notificados 216.207 casos prováveis doença aguda pelo vírus Zika no Brasil. No ano de 2017, esse número foi de 17.594 casos prováveis e, em 2018, até a SE 25, foram notificados 5.401 casos prováveis doença aguda pelo vírus Zika (MS – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018).

1.4.4 Febre Amarela

O vírus da Febre Amarela (YFV) pertence ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* (WANG et al., 1996), assim como DENV e ZIKV. A transmissão do vírus amarílico no Brasil pode ocorrer em dois tipos de ciclos: o urbano e o silvestre (Figura 5).

O ciclo silvestre ocorre em regiões com grande cobertura vegetal, envolvendo hospedeiros vertebrados, que são os primatas não humanos, mosquitos vetores competentes, sendo os principais no Brasil, do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, e o próprio vírus amarílico (DEGALLIER et al., 1992; TAUIL, 2010). O ciclo urbano ocorre em áreas antropizadas, envolvendo humanos, o mosquito *Ae. aegypti*, de hábitos urbanos, e o vírus. Geralmente, é o homem infectado que leva o vírus da área silvestre, onde ele foi um hospedeiro acidental, para área urbana, tornando-se, assim, um disseminador do vírus na sua fase virêmica (MONATH, 2001; FORATTINI, 2002).

Figura 5. Ciclo de Transmissão da Febre amarela: **Febre Amarela Silvestre:** ocorre em florestas tropicais. É uma zoonose que envolve primatas não humanos suscetíveis e mosquitos competentes. Acidentalmente, o homem entra neste ciclo e é infectado. **Febre Amarela Urbana:** nas Américas, ocorre em área urbana e na África, na savana seca. O ciclo envolve o homem suscetível e o mosquito competente. **Febre Amarela Silvestre (apenas na África):** ocorrem em zonas vegetativas e úmidas, e envolve primatas não humanos e também o humano - não sendo esse contato acidental - e outros diversos mosquitos vetores competentes.

Extraído de: Adaptado de MONATH, 2001.

O vírus amarelo teve sua provável introdução no Brasil através de barcos que vieram da África e chegaram a Recife, no ano de 1685. A partir de então, foi responsável por grandes epidemias no país (FRANCO, 1969; TEIXEIRA, 2001).

Com letalidade alta, assim que foi descoberto que a febre amarela era uma doença causada por um vírus, cujo vetor era um mosquito, a doença foi amplamente combatida. Com a principal ideia de detectar casos de febre amarela e eliminar focos de *Ae. aegypti*, (PENA, 2003; BRAGA e VALLE, 2007), Oswaldo Cruz, então nomeado Diretor-Geral de Saúde Pública, no início do século XX, teve como seu principal objetivo de programa de trabalho combater a febre amarela (FRANCO, 1969). Oswaldo Cruz foi responsável pela reestruturação da saúde pública no Brasil, não só combatendo a febre amarela, mas também a varíola e a peste (PORTO, 2003). Com ações de profilaxia, onde os profissionais da saúde podiam entrar nas casas sem a permissão de seus donos, e divisão da cidade em zonas, fez a campanha de combate à doença ser pouco aceita pela população e imprensa. No entanto Oswaldo Cruz obteve sucesso, de modo que houve uma redução de 469 óbitos no 1º semestre de 1903 para 39 em igual período de 1904 (FIUSA, 1985).

Mais tarde, em 1937, com a implementação da vacina, desenvolvida a partir do vírus atenuado pelas passagens em embriões de galinha - feito da mesma maneira até hoje, o último caso de febre amarela urbana no Brasil foi registrado em 1942, na cidade de Sena Madureira, no Acre (TEIXEIRA, 2001; FUNASA, 2001; COSTA et al., 2011; JÚNIOR, 2017). Em 1955, o Brasil teve êxito no objetivo de erradicar o *Ae. aegypti* e em 1958, recebeu o certificado da OPAS de erradicação da espécie (FRANCO, 1969). No final da década de 1960, o mosquito voltou a circular em território brasileiro e, atualmente, é encontrado em todas as unidades federativas do país (TAUIL, 2010)

A partir de 2007, houve uma maior preocupação com a re-emergência da febre amarela urbana. Notou-se a expansão da doença para áreas além das consideradas endêmicas, mais precisamente em direção ao sul e sudeste do Brasil, onde a vacinação não era recomendada. Dessa forma o vírus amarelo chegou à região sudeste do Brasil (ROMANO et al., 2011; MS, 2017) (Figura 6).

Figura 6. Série histórica do número de casos humanos confirmados para Febre Amarela (gráfico de barras) e a letalidade (gráfico de linha), segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, 1980 a junho de 2017.

Extraído de: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017.

O vírus, provavelmente, alcançou essas regiões a partir de corredores ecológicos, onde encontrou o ambiente favorável para sua manutenção e expansão territorial – hospedeiros suscetíveis e vetores competentes. De 1º de julho de 2017 a 28 de fevereiro de 2018, foram confirmados 723 casos de febre amarela silvestre no Brasil, com 237 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A maior gravidade foi nos estados de Minas Gerais, com 314 casos confirmados e 103 óbitos, e São Paulo, com 307 casos confirmados e 95 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Autoridades governamentais, com intuito de deter o avanço da doença, indicaram a vacina fracionada, com dose de 1/5, principalmente para os estados de São Paulo e Rio de Janeiro (JUNIOR, 2017). A vacina da febre amarela foi fracionada para conter epidemias da Angola e República do Congo, e mostrou ser eficaz, pelo menos por um período de tempo, sendo considerada uma ferramenta importante para evitar a expansão das áreas de circulação do vírus (MARTINS et al., 2013; WHO, 2016; JUNIOR, 2017).

1.5 Transmissão Vertical

A maneira mais comum e conhecida de uma fêmea de mosquito infectar-se com um arbovírus é durante o repasto sanguíneo, ou seja, quando se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado. Nesse tipo de infecção, conhecida como transmissão horizontal, a fêmea do mosquito ingere partículas virais junto com o sangue do hospedeiro virêmico. O vírus, por sua vez, ultrapassa barreiras mecânicas, relacionadas ao sistema digestório do mosquito, e até mesmo imunológicas, até alcançar a glândula salivar do vetor. O período que compreende a ingestão do sangue de um hospedeiro infectado até a chegada das partículas virais nas glândulas salivares é denominado Período de Incubação Extrínseco (PIE), que leva cerca de 7 a 14 dias, dependendo de alguns fatores, como a temperatura, por exemplo, (WATTS et al., 1987; GUBLER 1998). Uma vez que o vírus alcança a glândula salivar da fêmea do mosquito, torna-se capaz de transmiti-lo até o final de sua vida.

Outra maneira que os mosquitos têm de se infectar por um arbovírus é através de um fenômeno conhecido como transmissão vertical (Figura 7). Nesse caso, os arbovírus são passados pelas fêmeas infectadas para parte de sua prole (KHIN e THAN, 1983), fenômeno este registrado pela primeira vez em mosquitos na espécie *Aedes triseriatus* (THOMPSON e BEATY, 1977).

Existem duas maneiras da transmissão vertical: transmissão transovo, quando a fêmea de mosquito infecta parte da prole na oviposição, e o vírus permanece apenas na superfície do ovo; e transmissão transovariana, quando a fêmea infectada passa o vírus para parte de sua prole, através da infecção das células do folículo embrionário (ROSEN, 1988).

Figura 7. Ciclo de transmissão do DENV – **Transmissão horizontal:** O ciclo inicia-se quando a fêmea de *Ae. aegypti* se alimenta do sangue de uma pessoa infectada, adquirindo o vírus. A partir de então, ele pode transmitir o vírus para outras pessoas através da picada. **Transmissão vertical:** O ciclo também se inicia quando a fêmea de o *Ae. aegypti* se alimenta de uma pessoa infectada, então a fêmea infectada repassa o vírus para parte de sua prole nas células do folículo embrionário ou na oviposição.

FONTE: ANDRADE, 2018.

A transmissão vertical foi evidenciada em algumas populações de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* no Brasil e em outros países da América, tanto em condições de laboratório quanto em condições naturais (JOSHI et al., 2002; LE GOFF et al., 2011; MARTINS et al., 2012; BUCKNER et al., 2013; CABEZAS et al., 2015; CECÍLIO et al., 2015). Em laboratório, por exemplo, foi evidenciada a transmissão vertical do sorotipo DENV-1 em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* da Flórida, Estados Unidos, com taxas de transmissão de 11.11% e 8.33%, respectivamente (BUCKNER et al., 2013). Também foi verificada a transmissão vertical do sorotipo DENV-2 em populações brasileiras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em condições de laboratório (CASTRO et al., 2004).

No Brasil, em condições naturais, foi isolado o sorotipo DENV-1 em larvas de *Ae. albopictus* pela primeira vez, sugerindo a ocorrência de transmissão vertical nessa espécie (SERUFO et al., 1993). Também em Minas Gerais, foi isolado DENV em larvas de *Ae. aegypti*, demonstrando a presença de transmissão vertical (CECÍLIO et al., 2015). Na cidade de Santos, no estado de São Paulo, verificaram transmissão vertical do sorotipo DENV-3 em larvas de *Ae. albopictus*, e do sorotipo DENV-1 em fêmeas de *Ae. aegypti* (FIGUEIREDO et al., 2010). No Ceará, foram isolados DENV-2 e DENV-3 em fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* que nunca se alimentaram de sangue, apontando para a presença de transmissão vertical nas populações dessas espécies (MARTINS et al., 2012).

Acredita-se que a transmissão vertical represente uma importante forma de manutenção da circulação do DENV em situações de períodos interepidêmicos, densidade populacional do vetor baixa ou ausência de chuva (KHIN e THAN, 1983; ROSEN et al., 1983; JOSHI et al., 2002). Dessa maneira, o estudo da ocorrência de transmissão vertical em populações de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* em condições naturais é de grande importância para a compreensão da dinâmica de transmissão dos vírus dengue, uma vez que permite uma vigilância virológica que busca investigar a circulação e a manutenção dos quatro sorotipos desses vírus na natureza. Adicionalmente, com a recente entrada dos arbovírus chikungunya e Zika e a re-emergência da febre amarela no Brasil, transmitidos pelo *Ae. aegypti* e potencialmente pelo *Ae. albopictus*,

faz-se extremamente necessária a contínua vigilância virológica e entomológica dessas duas espécies no país.

1.6 Justificativa

A análise da relação dos estágios de maturação dos ovários com a presença e coloração ou ausência de sangue no estômago é uma das maneiras de se inferir se as fêmeas estão apresentando ou não discordância gonotrófica. Paralelamente, o conhecimento da paridade em uma população de mosquitos é de suma importância epidemiológica, pois a partir dos achados do estado das fêmeas (nulíparas ou paridas), podemos avaliar as condições que favorecem a sobrevivência e longevidade dessas espécies (BARATA et al., 2001; LIMA-CAMARA et al., 2007).

Acredita-se que a transmissão vertical represente uma importante forma de manutenção da circulação do vírus dengue em situações de períodos interepidêmicos, densidade populacional do vetor baixa ou ausência de chuva (KHIN E THAN, 1983; ROSEN et al., 1983).

A verdadeira contribuição do estudo da paridade e discordância gonotrófica em fêmeas transmissoras de patógenos, é que nos trás informações importantes sobre a população. Quando a população estudada é encontrada com grande taxa de paridade e discordância gonotrófica, se faz importante o trabalho no local de captura, como retirar todos os possíveis criadouros e eliminar os mosquitos adultos. Quando somamos ao estudo da transmissão vertical, identificamos se estas populações são capazes de transmitir possíveis vírus que podem albergar para as futuras gerações, fazendo com que o vírus sobreviva na natureza.

Em resumo podemos identificar possíveis áreas de maior risco de infecção de doenças transmitidas por mosquitos. Adicionalmente, com a entrada dos arbovírus chikungunya e Zika, ambos transmitidos pelo *Ae. aegypti* e potencialmente pelo *Ae. albopictus*, faz-se extremamente necessária a contínua vigilância virológica e entomológica dessas duas espécies no país.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a paridade, o desenvolvimento ovariano e a presença de transmissão vertical do vírus dengue em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na cidade de São Paulo.

2.2 Específicos

- ❖ Avaliar a frequência de fêmeas paridas e nulíparas, bem como os estágios de desenvolvimento dos ovários em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*;
- ❖ Relacionar o estágio da digestão do sangue contido no estômago das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* com aquele de maturação de seus ovários;
- ❖ Investigar a ocorrência de transmissão vertical do vírus dengue em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de Estudo

Para a determinação da paridade, do desenvolvimento dos ovários e do conteúdo estomacal das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, realizamos coletas no Parque Esportes para Todos da USP – Cidade Universitária (área 1), e no campus da Faculdade de Saúde Pública da USP (área 2), São Paulo, SP.

O Parque Esporte para Todos da USP está situado dentro da Cidade Universitária, no bairro do Butantã, Zona Oeste de São Paulo, SP (Figura 8). É composto por uma trilha de cerca de 1000 metros, incrustada em um remanescente de mata atlântica, possuindo diversos espaços de lazer, com equipamentos para o auxílio de alongamento, bebedouros, bicicletário e sinalização para corrida e caminhada. O parque oferece a oportunidade de contato com uma grande diversidade de flora e fauna (CEPEUSP, 2016). Dessa forma, é uma área arborizada, que favorece a presença de algumas espécies de mosquitos, como o *Ae. albopictus* (HAWLEY, 1988).

Figura 8. Mapa da Cidade Universitária da USP, Zona Oeste da cidade de São Paulo - SP, destacando o Parque Esportes para Todos da USP.

Extraído de: GOOGLE EARTH, 2018.

O campus da Faculdade de Saúde Pública da USP está situado no bairro do Cerqueira César, também na Zona Oeste de São Paulo, SP (Figura 9). Trata-se de uma área edificada de 19.400,97m², com grande circulação de alunos, professores e funcionários, que conta também com a presença do Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza. Além disso, o campus da Faculdade de Saúde Pública da USP está muito próximo dos cemitérios Araçá e Redentor, que podem representar importantes locais de criação do *Ae. aegypti* e do *Ae. albopictus* (VEZZANI, 2007). A presença de *Ae. aegypti* no campus foi registrada (LIMA-CAMARA et al., 2016; BERMUDI et al., 2017).

Figura 9. Destaque da Faculdade de Saúde Pública da USP, localizada na Zona Oeste da cidade de São Paulo – SP.

Extraído de: GOOGLE EARTH, 2018.

Para a avaliação da ocorrência de transmissão vertical do DENV em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, foram utilizados adultos criados a partir de ovos coletados no Parque Municipal do Piqueri (Figura 10), situado na Zona Leste da cidade de São Paulo. O parque tem uma área total de 97.200 m², com vegetação composta principalmente por eucaliptal, alameda de sibipirunas, bambuzal e bosques heterogêneos. Conta ainda com aproximadamente 90 espécies de animais, sendo 79 de aves, com o ouriço-cacheiro representando o

principal mamífero do parque (PMSP, 2018). O parque conta com pista de cooper, bicicletário, quadras poliesportivas, aparelhos de ginástica, palco para apresentações e estacionamento, além de ter uma frequência de público/mês estimada em 36 mil pessoas (PMSP, 2018). A presença de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* neste local foi confirmada em estudos anteriores (MEDEIROS-SOUZA, 2013; 2014).

Figura 10. Destaque do Parque do Piqueri, localizado na Zona Leste de São Paulo, SP.

Extraído de: GOOGLE EARTH, 2018.

3.2 Atividades no Campo

No Parque Esportes para Todos, as capturas foram realizadas mensalmente, no período de 2 anos (janeiro de 2015 a dezembro de 2016), em toda área do parque – pista de corrida, bosque, local de alongamento e banheiros. Enquanto que as capturas no campus da Faculdade de Saúde Pública foram realizadas mensalmente, no período de 20 meses (março de 2016 a outubro de 2017), dentro do centro de saúde onde há grande circulação de pessoas, creche, guarida dos guardas, corredores do prédio principal e áreas onde identificávamos a presença de mosquitos. Os mosquitos foram capturados

com o auxílio de aspirador de Nasci, que consiste de uma câmara de captura, composta por tubo PVC e micromotor de uso geral, preso ao corpo do aparelho através de duas alças de suporte. Estas são feitas de tiras de alumínio, preparadas para encaixar o motor na parte central. O micromotor é alimentado por uma bateria de 12 volts, através dos fios de alimentação (NACI, 1981). O tempo de aspiração foi de 1 hora e 30 minutos por dia de captura. As aspirações nas duas áreas de estudo foram realizadas em dias diferentes.

Todo o material coletado no Parque Esportes para Todos e no campus da Faculdade de Saúde Pública foram levados ao Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Para a avaliação da ocorrência de transmissão vertical do dengue em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, foram utilizados adultos oriundos de ovos coletados em armadilhas de oviposição (ovitampas) (Figura 11), durante a primavera 2014 e o outono e primavera de 2015 e outono de 2016, escolhemos as estações da primavera e outono por favorecer as duas espécies por causa da temperatura. A ovitampa é constituída de um vaso preto, com capacidade de aproximadamente 500 ml, onde é colocada uma palheta de madeira rugosa, que serve de anteparo para as fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* colocarem seus ovos (MARQUES et al., 1993; MENEZES, 2014).

Figura 11. Exemplo da armadilha para ovos (ovitampa). Utilizada na coleta de ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no parque do Piqueri.

Extraído de: MENEZES, 2014.

No Parque do Piqueri, foram instaladas 36 ovitrampas, durante 6 semanas consecutivas das primaveras de 2014 e 2015 e 6 semanas consecutivas dos outonos de 2015 e 2016, havendo substituição semanal das palhetas. Todas as palhetas coletadas semanalmente eram levadas ao Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.

3.3 Atividades no Laboratório

3.3.1 Identificação dos Mosquitos

Os mosquitos capturados através do aspirador de Nasci no Parque Esportes para Todos na Cidade Universitária da USP e no Campus da Faculdade de Saúde Pública da USP, foram anestesiados em gelo, identificados e separados por espécie e sexo. As fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram rapidamente armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml – identificados por local, data de captura e espécie - e mantidas em freezer -20°C para posterior análise dos ovários e conteúdo estomacal. A identificação das espécies foi realizada através da chave dicotômica proposta por CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994).

As palhetas semanalmente trocadas no Parque do Piqueri, eram deixadas para secar em temperatura ambiente, avaliadas sob lupa estereoscópica, e as positivas tinham os ovos contados. Após a contagem dos ovos, todas as palhetas positivas foram individualmente colocadas em bacias contendo água e ração para peixe Tetraamin®, a fim de que as larvas eclodissem. Todas as larvas em estágio L4 foram identificadas e separadas por espécie: *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Após emergirem das pupas, as fêmeas adultas foram mortas por congelamento e separadas em *pools* de 10 indivíduos em microtubos de polipropileno de 1,5 ml – identificados por ano e estação de captura - e congelados em freezer - 80°C.

3.3.2 Dissecção do estômago e ovários

Com intuito de realizar os estudos de paridade e desenvolvimento ovariano, realizou-se dissecção do estômago e ovários das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Estas foram colocadas sobre uma lâmina de vidro, contendo duas ou três gotas de solução salina NaCl 0.85%, e levadas à lupa estereoscópica, seguindo as técnicas propostas por CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994). Dessa forma, um estilete foi espetado no tórax da fêmea e outro nos últimos segmentos abdominais. Com uma leve tração, os ovários e estômago foram puxados para a solução salina. O estômago foi observado para verificarmos a presença de sangue. Em caso positivo, o grau de digestão de sangue foi avaliado a partir de sua coloração: vermelho (início da digestão) e marrom (final da digestão) (LIMA-CAMARA et al., 2007).

Após a observação do conteúdo do estômago, uma lamínula foi colocada sobre a gota de salina contendo os ovários e a lâmina foi levada ao microscópio óptico, para que a paridade da fêmea e o grau de maturação de seus ovários fossem determinados, seguindo o modelo de CHRISTOPHERS (1911 apud CHRISTOPHERS, 1960) e MER (1936) (Figura 12).

Para determinarmos a presença de concordância ou discordância gonotrófica nas fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, relacionamos os estágios de maturação dos ovários com a coloração do sangue encontrado no intestino médio (LIMA-CAMARA et al, 2007).

Figura 12. Classificação dos estágios de maturação dos folículos ovarianos segundo Christophers e Mer.

Extraído de: CHRISTOPHERS, 1960.

3.3.3 Detecção do vírus Dengue em Fêmeas

Para o estudo da transmissão vertical, foi feita a detecção dos sorotipos do DENV em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, para isso foi utilizada a RT-PCR, de acordo com o protocolo descrito por LANCIOTTI et al. (1992). Este protocolo detecta, simultaneamente, os quatro sorotipos em um procedimento semi-nested, gerando produtos amplificados, com tamanhos específicos em pares de base (pb) para cada um dos sorotipos de dengue.

3.3.3.1 Extração do RNA

Inicialmente, o RNA viral de cada *pool* de 10 mosquitos foi extraído. Para isso, fizemos a maceração de cada *pool* em 1 ml de meio Leibovitz 15 (L15), com posterior centrifugação de 15 minutos, a 6000 rpm. Um total de 140 µl do sobrenadante foi usado para a extração do RNA viral, realizada com o auxílio do Kit QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA). De acordo com protocolo descrito pelo fabricante, foi adicionado o tampão AVL e passado pelo vórtex pulsado. O produto foi deixado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após, foi adicionado etanol e misturado por vórtex pulsado. A solução anterior foi adicionada em uma coluna de 2 ml inclusa no KIT, então foi centrifugado, e repetido o passo anterior. Após, foi adicionado o tampão AWI, centrifugado, trocado o tubo de recolha e adicionado o tampão AWA. Então foi centrifugado a velocidade máxima. O produto foi colocado em um microtubo de polipropileno de 1,5 ml e adicionado o tampão AVE, e deixado em temperatura ambiente, após centrifugado. O RNA viral extraído contido no microtubo de polipropileno de 1,5 ml foi armazenado imediatamente no freezer -80°C.

3.3.3.2 Purificação do RNA

Para a purificação das amostras, utilizamos o Kit DNase I. Esta etapa elimina cadeia de DNA simples e dupla, deixando apenas o RNA purificado, para a etapa de amplificação. Seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, a partir de 6 µl do RNA extraído, foi adicionado DNase I Reaction buffer + DNase I Amp

Grade + água ultrapura. Essa solução foi deixada em temperatura ambiente por 15 minutos. Após, foi adicionado EDTA e aquecemos a 65°C, em banho-maria por 10 minutos. Foi reservado o produto refrigerado para a primeira etapa da RT-PCR.

3.3.3.3 RT-PCR

Em uma primeira etapa, o RNA viral foi convertido em cDNA e ocorreu a amplificação do fragmento de 511 pb com o emprego dos primers D1 e D2 (Quadro 1), específicos para os 4 sorotipos do DENV.

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar os sorotipos do vírus dengue, de acordo com protocolo descrito por LANCIOTTI et al., 1992.

Primer	Sequência (5'-3')	Posição no Genoma	Tamanho, do produto Amplificado (em pares de bases)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG	134-161	511
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644	511
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482 (D1 e TS1)
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119 (D1 e TS2)
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290 (D1 e TS3)
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392 (D1 e TS4)

Fonte: LANCIOTTI et al., 1992.

Nesta reação, o Kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen) foi utilizado. A reação apresentou volume final de 50 µl (Quadro 2). Os parâmetros para o termociclador foram: 1 ciclo de 30 minutos à 50°C e 2 minutos à 94°C, seguidos por 35 ciclos de desnaturação (94°C, 15s), anelamento dos oligonucleotídeos (60°C, 30s) e extensão (72°C, 30s). Como controle positivo da RT-PCR, foi utilizado RNA do DENV-3 e, como controle negativo da PCR, utilizou-se água ultrapura.

Quadro 2. Reagentes e volumes utilizados para a primeira etapa da RT-PCR para a detecção dos 4 sorotipos DENV, em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Reagente	Concentração	Volume (µl)
RNA da Amostra	-	10
Reaction Mix	2 x	25
Primer sense (D1)	10 µm	1,3
Primer anti-sense (D2)	10 µm	1,3
Enzima Taq Mix	-	2
H ₂ O Ultrapura	-	10,4
Total		50 µl

Posteriormente, na segunda etapa da PCR, agora do tipo semi-nested, os produtos obtidos na primeira etapa foram submetidos a 25 ciclos de desnaturação (95°C, 30s), anelamento dos oligonucleotídeos (60°C, 30s), e extensão (72°C, 1 min), utilizando o primer consensual D1 e os iniciadores específicos para cada sorotipo TS1, TS2, TS3 e TS4 (Quadro 1 e 3), bem como a enzima Go Taq Green Master Mix (Promega).

Quadro 3. Reagentes e volumes utilizados para a segunda etapa da PCR, para a detecção dos 4 sorotipos DENV, em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Reagente	Concentração	Volume (µl)
Amostra cDNA	-	05
Primer sense (D1)	10 µm	2,5
Primer TS1	20 µm	2,5
Primer TS2	20 µm	2,5
Primer TS3	20 µm	2,5
Primer TS4	20 µm	2,5
Enzima Go Taq Green Master Mix	1x	25
Nuclease-Free Water	-	7,5
Total		50 µl

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, acrescido de 5 µl de corante Gel-Red, por 45 minutos a 100 volts (V). Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 100 pb, para a melhor identificação do peso molecular dos produtos de PCR, quando presentes. Todos os géis foram visualizados no revelador, sob luz ultravioleta.

3.3.3.4 Sequenciamento de Nucleotídeos

Esta etapa foi feita em colaboração com a Dra. Tatiana Ometto e o Dr. Luciano Matsumiya Thomazelli, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As amostras que apresentaram bandas foram levadas para o laboratório de Virologia do ICB II – USP e foi seguido o seguinte protocolo para o sequenciamento: Os produtos resultantes da PCR foram purificados com Exosap-IT (GE) seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi então sequenciado pelo método de Sanger usando o Kit de sequenciamento Big Dye Terminator (ABI), os primers específicos para cada sorotipo do DENV (Tabela 1)

e as reações de sequenciamento realizadas no equipamento ABI 3100 Automated DNA Sequencer (ABI). Os fragmentos de DNA dupla fita foram sequenciados em ambas as direções para gerar uma sequência consenso para cada amostra. A edição da sequência nucleotídica, a análise, a previsão das sequências de aminoácidos e os alinhamentos foram conduzidos utilizando-se a versão 6.0.7 do software Bioedit Sequence Alignment Editor. Todas as sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas usando ClustalW (THOMPSON et al., 1997) e os polimorfismos de sequência dentro da região amplificada foram identificados por comparação com uma variedade de sequências disponíveis no GenBank.

3.4 Análise dos Dados

Tabulamos os dados de paridade, estágios de desenvolvimento ovariano, presença/ ausência e grau de digestão do sangue no estômago de cada fêmea em planilhas do Excel. As fêmeas de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* com discordância e concordância gonotrófica foram comparadas segundo espécie através do teste do Qui-Quadrado ou Prova Exata de Fisher.

A Taxa Mínima de Infecção (MIR), para o vírus dengue foi calculada da seguinte forma: $n^{\circ} \text{ de pools} + / n^{\circ} \text{ total de mosquitos} \times 1000$ (SAVAGE et al, 1993).

4. RESULTADOS

4.1 Paridade e Desenvolvimento Ovariano

Um total de 674 mosquitos foram capturados, sendo 2 *Ae. aegypti* (0,62%) e 322 *Ae. albopictus* (99,38%) na área 1 (Parque Esportes para todos da Cidade – maior cobertura vegetal); e 347 de *Ae. aegypti* (99,14%) e 3 de *Ae. albopictus* (0,86%) na área 2 (Campus da Faculdade de Saúde Pública – área urbanizada). Dos 325 *Ae. albopictus* capturados em ambas as áreas, 139 eram fêmeas e 186 eram machos, enquanto que dos 349 *Ae. aegypti* capturados, 152 eram fêmeas e 197 eram machos. Para a dissecação dos ovários e estômagos, foram utilizadas 143 fêmeas de *Ae. aegypti* (94%) e 120 fêmeas de *Ae. albopictus* (86%).

Das 143 fêmeas de *Ae. aegypti* dissecadas, avaliou-se o conteúdo estomacal de 143 (100%), a paridade de 125 (87%) e o estágio de desenvolvimento do ovário de 128 (89%).

Em relação à paridade, 40% (50/125) foram nulíparas, 27% (34/125) paridas e 33% (41/125) estavam em estágios avançados de maturação (III a V) (Figura 13), quando não é possível a determinação da paridade, pela grande quantidade de vitelo nos folículos ovarianos, que causa a extensão das traqueíolas.

Figura 13. Relação da paridade das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* capturadas na área 1 (Parque Esporte para Todos) e 2 (Campus da Faculdade de Saúde Pública) da Cidade de São Paulo- SP

* Não foi possível determinar a paridade destas fêmeas, pois se encontravam nos estágios de maturação dos ovários de III a V.

Para *Ae. albopictus*, das 120 fêmeas dissecadas, foi avaliado o estômago das 120 (100%), a paridade de 108 (90%) e o estágio de desenvolvimento do ovário de 107 (89%).

Em relação à paridade, 39% (42/108) das fêmeas foram nulíparas, 34% (37/108) paridas e 27% (29/108) estavam com ovários em estágios avançados de maturação (III a V) (Figura 13).

A análise do conteúdo estomacal das 143 fêmeas de *Ae. aegypti* dissecadas mostrou que 23% (33/143) estavam sem sangue no intestino médio, enquanto 77% continham sangue (110/143), sendo 72% (79/110) de coloração vermelha, 21% (23/110) na coloração marrom e 7% (8/110) nas colorações vermelho e marrom.

A maior parte das fêmeas de *Ae. aegypti* que continha sangue vermelho em seu intestino médio encontrava-se nos estágios iniciais de maturação dos ovários (64%; 46/72), mas algumas fêmeas com sangue vermelho no estômago estavam nos estágios finais de maturação (36%; 26/72). Paralelamente, algumas fêmeas com sangue marrom no intestino médio encontravam-se nos estágios finais de maturação dos ovários (44%; 7/16), enquanto que quantidade similar de fêmeas (50%; 8/16) apresentou sangue marrom no estômago e ovários nos estágios iniciais de maturação e uma fêmea (6%; 1/16) com sangue marrom no estágio V. As fêmeas com sangue na coloração vermelha e marrom no estômago estavam, em maioria, com ovários em estágios finais de maturação (71%; 5/7). Grande parte das fêmeas de *Ae. aegypti* sem sangue no intestino médio estavam com os ovários nos estágios iniciais de maturação (85%; 28/33), quatro nos estágios III e IV (12%; 4/33) e uma (3%; 1/33) no estágio V (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação do intestino médio e dos estágios dos ovários de fêmeas de *Ae. aegypti*. Relação entre o estágio de maturação dos ovários e a coloração do sangue encontrada no intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti*, coletados nas áreas 1 (Parque Esportes para Todos) e 2 (Campus Faculdade de Saúde Pública) da cidade de São Paulo, SP.

	N	I	I-II	II	III	III-IV	IV	V	Total
Sem Sangue	16	6	3	3	3	-	1	1	33
Vermelho	-	17	10	19	17	3	4	2	72
Marrom	-	3	3	2	3	1	3	1	16
Vermelho e Marrom	-	-	-	2	3	1	1	-	7
Total	16	26	16	26	26	5	9	4	128

Para as fêmeas de *Ae. albopictus*, 40% (48/120) não continham sangue no intestino médio, enquanto 60% (72/120) continham sangue no intestino médio, sendo 61% (44/72) de sangue com coloração vermelha, 38% (27/72) com a coloração marrom e 1% (1/72) com sangue vermelho e marrom.

Na relação entre os estágios de maturação dos ovários com a coloração do sangue encontrado no intestino médio das fêmeas de *Ae. albopictus*, verificamos que a maioria das fêmeas que continha sangue vermelho em seu intestino médio encontrava-se nos estágios iniciais de maturação dos ovários (74%; 29/39), enquanto algumas fêmeas (26%; 10/39) que continham sangue vermelho no estômago, apresentaram ovários nos estágios finais de maturação. Oito fêmeas (34%; 8/24) estavam com sangue marrom no intestino médio e com ovários em estágios finais de maturação (III e IV), porém um número maior de fêmeas com sangue marrom no estômago (58%; 14/24) estavam com ovários em estágios iniciais de desenvolvimento e duas fêmeas (8%; 2/24) estavam com ovários no estágio V. Das fêmeas de *Ae. albopictus* sem sangue no intestino médio, a maioria (79%; 34/43) estavam com ovários em estágios iniciais e sete (16%; 7/43) no estágio V de desenvolvimento, porém duas fêmeas (5%; 2/43) encontravam-se sem sangue no estômago e ovários nos estágios III e IV. A fêmea encontrada com sangue no estômago na coloração vermelha e marrom estava com ovário em estágio inicial de maturação (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação do intestino médio e dos estágios dos ovários de fêmeas de *Ae. albopictus*. Relação entre o estágio de maturação dos ovários e a coloração do sangue encontrada no intestino médio de fêmeas de *Ae. albopictus*, coletados nas áreas 1 (Parque Esportes para Todos) e 2 (Campus Faculdade de Saúde Pública) da cidade de São Paulo, SP.

	N	I	I-II	II	III	IV	V	Total
Sem Sangue	13	13	6	2	1	1	7	43
Vermelho	-	13	9	7	7	2	1	39
Marrom	-	4	3	7	6	2	2	24
Vermelho e Marrom	-	-	1	-	-	-	-	1
Total	13	30	19	16	14	5	10	107

Encontrou-se discordância gonotrófica em 36% (46/128) das fêmeas da espécie *Ae. aegypti* e 27% (29/107) para *Ae. albopictus*. A comparação entre as duas espécies e a presença de discordância gonotrófica, realizado pelo teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson, indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as espécies, para $p\text{ value} > 0,05$ ($p = 0,147$ e Yule = - 0,20).

4.2 Transmissão Vertical

Para detecção de transmissão vertical em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, foram analisadas três mil fêmeas. Para a espécie *Ae. aegypti*, foram analisadas 700 fêmeas da Primavera de 2014, 410 da Primavera de 2015, 180 do Outono de 2015 e 230 do Outono de 2016. Para *Ae. albopictus*, as fêmeas analisadas foram das coletas referentes à Primavera de 2014 ($n = 470$) e Outono de 2015 ($n = 1010$) (Figura 15).

Figura 14. Número de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletadas no parque do Piqueri – SP, analisadas para detecção da transmissão vertical natural do DENV, segundo estações e anos de coleta.

Todas as 3.000 fêmeas foram separadas por espécie, em microtubos de polipropileno de 1,5 ml, contendo 10 indivíduos em cada, resultando em 300 *pools* analisados. Destes, 8 *pools* (3 da primavera de 2014, 3 da primavera de 2015, de fêmeas de *Ae. aegypti* e 2 do Outono de 2015, de fêmeas de *Ae. albopictus*) apresentaram uma banda de aproximadamente 120 pb na visualização do resultado no gel na luz ultravioleta (Figura 16). A presença dessa banda sugeriu a detecção de amostras de fêmeas de mosquitos infectadas verticalmente com DENV-2.

Para certificarmos que as bandas reveladas eram de DENV-2, fizemos o sequenciamento de nucleotídeos de todas essas amostras no Instituto de Ciências Biomédicas II, da Universidade de São Paulo. Os resultados do sequenciamento foram negativos para qualquer sorotipo do DENV.

Figura 15. Visualização do gel de agarose sob luz ultravioleta, com as amostras que apresentaram banda de aproximadamente 120 pb. Coluna 1: peso molecular; Colunas 2,3,4,5,6,7,8 e 9: *pools* de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, que apresentaram bandas; Coluna 10: controle negativo; Coluna 11: controle positivo DENV-3 (290 pb).

5. DISCUSSÃO

Aedes aegypti e *Ae. albopictus* são mosquitos de grande importância no mundo, pois são considerados vetores de arbovirus, como DENV, ZIKV e CHIKV, principalmente em países de climas tropical e subtropical (NELSON, 1986; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HAYES, 2002; VEZZANI, 2007). Adicionalmente, *Ae. albopictus* foi incriminado como vetor de CHIKV em países temperados, como Itália e França (NELSON, 1986; BONILAURI et al., 2008; HONÓRIO et al., 2017) bem como de DENV e ZIKV nos continentes asiático e africano, respectivamente (HAWLEY, 1988; GRARD et al., 2014).

No Brasil, *Ae. aegypti* é uma espécie amplamente distribuída e altamente associada ao homem, habitando o interior de residências de áreas urbanas e suburbanas, além de ser o principal vetor dos DENV, ZIKV e CHIKV (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; VEGA-RÚA et al., 2014). Logo o *Ae. albopictus* está presente em quase todos os estados brasileiros (CARVALHO et al., 2014; PANCETTI et al., 2015), mas é mais frequente em ambientes rurais e silvestres (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BRAKS, 2003; LIMA-CAMARA, 2006). Entretanto, esse mosquito é considerado vetor potencial dos vírus da febre amarela (MILLER e BALLINGER, 1988), dengue (CASTRO et al., 2004), Zika (CHOUIN-CARNEIRO, 2016) e chikungunya (VEGA-RÚA et al., 2014).

Para a avaliação da paridade, presença de sangue no estômago e desenvolvimento ovariano, realizamos capturas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em duas áreas da cidade de São Paulo, SP. A maior parte de *Ae. albopictus* foi capturada na área 1 (Parque Esporte para Todos), onde há relativa cobertura vegetal, enquanto *Ae. aegypti* foi predominante na área 2 (Campus da Faculdade de Saúde Pública), que é edificada e possui grande circulação de pessoas.

Para ambas as espécies, o número de machos foi maior em relação ao de fêmeas nessas duas áreas de captura. Essa observação pode estar associada à proximidade dos criadouros, uma vez que a dispersão dos machos parece ser mais limitada (HAWLEY, 1988; VALERIO et al., 2012; LIMA-CAMARA et al.,

2016). Além disso, encontramos uma elevada percentagem de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* nulíparas (40% e 39%, respectivamente), o que ressalta a possibilidade de criadouros nas áreas de captura. De fato, na área 2, onde a grande maioria de *Ae. aegypti* foi capturado, foi registrada a presença dessa espécie em criadouros naturais e artificiais (LIMA-CAMARA, 2016; BERMUDI et al., 2017). Entretanto, uma parte das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* estavam paridas (27% e 43%, respectivamente) ou estavam em estágio avançado de desenvolvimento do ovário (33% e 27%, respectivamente), o que demonstra que ambas as áreas de capturas, tanto com maior cobertura vegetal para *Ae. albopictus*, quanto mais urbanizada para *Ae. aegypti* são propícias para a manutenção e longevidade dessas espécies.

Resultados similares foram encontrados por KAKITANI e FORATTINI (2000), estudando a espécie de mosquito *Anopheles albirtarsis* l.s., considerado vetor de malária em algumas áreas do Brasil (FORATTINI, 2002). Em estudo realizado no interior do estado de São Paulo, na Fazenda Experimental do Instituto Agronômico de Campinas, os autores escolheram o local de coleta com a característica de considerável modificação ambiental. Foram dissecadas 2612 espécimes, encontrando 69,4% de fêmeas nulíparas de *An. albirtarsis* l.s., sugerindo a presença de criadouros próximos aos locais de coleta (KAKITANI e FORATTINI 2000).

Para fêmeas de *Ae. aegypti*, BARATA et al. (2001) realizaram capturas no intra e peridomicílio, em dois setores selecionados na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo, sendo um de nível social econômico baixo e outro com nível social médio. Foram coletadas 189 fêmeas de *Ae. aegypti*, sendo que 148 foram dissecadas. Foram encontradas 27% de fêmeas nulíparas e 10.1% de paridas, sugerindo que estas populações não seriam tão longevas. Adicionalmente, LIMA-CAMARA et al. (2007) realizaram coletas em 21 distritos de 2 municípios do estado do Rio de Janeiro, e coletaram 1431 fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, verificando um número muito maior de fêmeas paridas (48.1% e 86%, respectivamente) do que de nulíparas (3.7% e 0.8%, respectivamente). Essa observação indicou que estas populações eram mais longevas,

aumentando as chances de terem sido infectadas e de estarem transmitindo patógenos ao homem (LIMA-CAMARA et al. 2007).

Para estudo com a espécie de mosquito *Aedes scapularis*, TELLES DE DEUS e KAKITANI (2006) realizaram capturas quinzenais no Vale do Ribeira, utilizando a técnica de aspiração. As fêmeas selvagens capturadas, foram dissecadas, 655 (55,5%) foram consideradas uníparas pelos autores, o que retrata que a fêmeas ovipuseram apenas uma vez, 46 (3,9%) fêmeas foram consideradas bípara, o que retrata que estas fêmeas ovipuseram duas vezes, e 418 (35,4%) fêmeas encontradas eram nulíparas.

Fora do Brasil, SCOTT et al. (2000) observaram uma baixa taxa de paridade em fêmeas de *Ae. aegypti* capturadas na Tailândia (19%) e Porto Rico (32%). Em Tucson, no estado do Arizona, EUA, HOECK et al. (2003) encontraram 44% das fêmeas de *Ae. aegypti* paridas. Para *Ae. albopictus*, GOTTFRIED et al. (2002) reportaram uma taxa de paridade de 80.2 – 85.8% em dois locais do leste do estado do Tennessee, EUA; enquanto em Macao, China, foi encontrada uma frequência de paridade para essa espécie de 52.8% (ALMEIDA et al., 2005). Uma baixa taxa de paridade (11%) para fêmeas de *Ae. albopictus* foi verificada no Sudoeste da Louisiana, EUA (WILLIS e NASCI, 1994).

O estudo da paridade de fêmeas de vetores pode fornecer uma importante estimativa do contato vetor/hospedeiro. Quanto maior a taxa de paridade em uma população de vetores, maior ocorrência de contato com o hospedeiro vertebrado por meio do repasto sanguíneo, e isto implica diretamente no aumento de chances de transmissão de patógenos que esses mosquitos albergam (KAKITANI e FORATTINI, 2000; BARATA et al., 2001; LIMA-CAMARA et al., 2007).

O contato frequente com o hospedeiro vertebrado de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* nas áreas de captura foi confirmado pela maior frequência de fêmeas dessas espécies com sangue no intestino médio (77% e 60%, respectivamente), o que reforça as condições favoráveis para a manutenção dessas espécies nesses locais. A presença de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* sem

sangue no estômago (23% e 40%, respectivamente) pode estar associada à recente emergência de criadouro, à uma recente oviposição (LIMA-CAMARA et al., 2007), ou mesmo a um estágio final de maturação dos ovários (estágio V), quando a fêmea se encontra grávida e pronta para depositar seus ovos (KLOWDEN e LEA, 1979).

Em relação aos estágios dos ovários, a maioria das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* capturadas nesse estudo estava em estágios iniciais de maturação dos ovários (66% e 73%, respectivamente). O mesmo não foi observado por BARATA et al (2001) no estado de São Paulo, onde encontraram 62.9% de fêmeas de *Ae. aegypti* com ovários em estágios finais de maturação. Resultado similar foi reportado por LIMA-CAMARA et al. (2007) no estado do Rio de Janeiro, onde encontraram a maioria das fêmeas de *Ae. aegypti* em estágios finais de maturação, porém a maior parte das fêmeas de *Ae. albopictus* com ovários em estágios iniciais de desenvolvimento, como observado em nosso estudo. FERNANDEZ e FORATTINI (2003), também encontraram maior porcentagem de fêmeas de *Ae. albopictus* em estágios finais de desenvolvimento, no estado de São Paulo, bem como SCOTT et al. (2000), que coletaram elevado número de fêmeas de *Ae. aegypti* grávidas na Tailândia (56%) e Porto Rico (69%).

Com relação à presença de discordância gonotrófica, podemos inferir que ela estava presente em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* que apresentaram sangue de coloração vermelha no estômago e ovários em estágios finais de desenvolvimento (a partir do estágio III), pois denota a realização de um repasto sanguíneo recente. Discordância gonotrófica também pode ser inferida para as fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* que estavam com sangue marrom no intestino médio e ovários em estágios iniciais de maturação (até estágio II), pois o sangue em estágio avançado de digestão não será suficiente para que a fêmea complete o desenvolvimento dos ovários, necessitando de um novo repasto sanguíneo (LIMA-CAMARA et al., 2007). O mesmo fenômeno pode ser interpretado para fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* com sangue marrom no estômago e ovários em estágio V de maturação, quando são consideradas grávidas e prontas para depositarem seus

ovos. Fêmeas dessas espécies que não apresentaram sangue no estômago e ovários em estágios III e IV de maturação também necessitarão de um repasto sanguíneo para completarem a maturação de seus ovários (LIMA-CAMARA et al., 2007).

BARATA et al. em 2001, evidenciaram discordância gonotrófica em *Ae. aegypti*, encontraram 28% de fêmeas em estágios finais de maturação dos ovários e sangue de coloração vermelha no estômago. FERNANDEZ e FORATTINI (2003) comprovaram a discordância gonotrófica em *Ae. albopictus*. Os autores coletaram larvas de no Vale do Ribeira e no Vale do Paraíba, São Paulo, SP. As larvas foram criadas em laboratório, as fêmeas quando adultas, foram individualizadas, acompanhadas, e notou-se 38% das fêmeas do Vale do Ribeira e 32% das fêmeas do Vale do Paraíba fizeram dois ou mais repastos sanguíneos antes de ovipôr.

LIMA-CAMARA et al., (2007) evidenciaram discordância gonotrófica em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletadas no Rio de Janeiro, sugerindo que este comportamento aumenta o contato humano/vetor, contribuindo para a manutenção da endemidade da dengue no estado. A partir de técnicas histológicas, SCOTT et al. (1993) reportaram múltiplos repastos sanguíneos em fêmeas de *Ae. aegypti* selvagens (50%), capturadas em Porto Rico, o que também aponta para a presença de discordância gonotrófica. Para *Ae. scapularis*, em condições de laboratório, TELLES DE DEUS e KAKITANI (2000) reportaram que 55% das fêmeas se alimentaram mais de uma vez antes de depositarem seus ovos, indicando discordância gonotrófica nessa espécie.

A realização de múltiplas alimentações em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi reportada tanto em fêmeas com corpo pequeno como em grandes, podendo estar associada às necessidades energéticas de ambos os tamanhos (BRIEGEL, 1990; CHAMBER e KLOWDEN, 1990; XUE et al., 1995; FARJANA e TUNO, 2013). De qualquer forma, o comportamento de fazer vários repastos sanguíneos em um único ciclo de oviposição aumenta as chances das fêmeas de mosquitos vetores se infectarem e transmitirem um patógeno. Somado a uma alta taxa de paridade, que sugere maior longevidade na natureza, essas

espécies seriam importantes para a manutenção e disseminação de vírus que causam doenças.

A capacidade vetorial de um mosquito envolve alguns fatores relacionados à competência dele se infectar e transmitir com sucesso o patógeno que alberga, bem como aspectos de sua biologia e comportamento, como antropofilia, endofilia, longevidade e presença de discordância gonotrófica. Apesar de serem elementos importantes da capacidade vetorial, poucos trabalhos destinam-se a estudar a longevidade e discordância gonotrófica de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no Brasil e no mundo. No presente estudo, apesar de ter corrido um número menor de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em relação ao observado em estudos anteriores, verificamos que 36% e 27% das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente, estavam em discordância gonotrófica, o que somado à alta taxa de paridade observada nessas fêmeas, indica o frequente contato dessas espécies com o hospedeiro vertebrado e as condições favoráveis que garantem a sobrevivência nas áreas de estudo.

Além do *Ae. aegypti* ter importante papel na transmissão de arbovírus causadores de doenças humanas, como dengue, Zika e chikungunya em diversos países do mundo, *Ae. albopictus* ainda não foi incriminado como vetor no Brasil, mas mostra grande potencial para ser um mosquito transmissor desses patógenos, além de poder ser um possível elo de arbovírus que circulam nos ambientes silvestres para o meio urbano, como o vírus da febre amarela (GOMES et al., 1999; SANTOS, 2003; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2003).

O principal mecanismo para mosquitos se infectarem com arbovírus é através da transmissão horizontal (homem-mosquito-homem). Porém, outro tipo de transmissão, denominada transmissão vertical, isto é, quando uma fêmea infectada passa o vírus para parte da sua prole via transovariana ou transovo, mostrou ser um mecanismo importante para a manutenção do vírus na natureza. Tal fenômeno explicaria como diversos tipos de arbovírus mantêm sua circulação em períodos interepidêmicos, quando há baixa densidade populacional e períodos secos (KHIN e THAN, 1983; ROSEN et al., 1983; ROSEN, 1988; JOSHI, 2002). A transmissão vertical já foi demonstrada em condições de laboratório e na natureza com várias espécies de mosquitos

vetores, como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Estudos em laboratório demonstraram que o DENV pode ser passado para a prole por até 7 gerações de *Ae. aegypti* (JOSHI, 2002). Adicionalmente, foi evidenciada a transmissão vertical do sorotipo DENV-1 em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* da Flórida, Estados Unidos, em condições de laboratório, com taxas de transmissão de 11.11% e 8.33%, respectivamente (BUCKNER et al., 2013).

Na natureza, a transmissão vertical foi detectada algumas vezes, com diferentes sorotipos do vírus dengue. A primeira vez que a transmissão vertical foi detectada em condições naturais no Brasil foi em Minas Gerais, 1993, quando SERUFO et al., (1993) encontraram larvas de *Ae. albopictus* infectadas com DENV-1. A partir de então, muitos estudos validaram a ocorrência do fenômeno da transmissão vertical natural no território brasileiro.

Novamente em Minas Gerais, foram coletados ovos de *Aedes*, próximo de casas de pacientes com suspeita ou confirmação de infecção pelo DENV. A partir desses ovos, as larvas foram criadas, identificadas e separadas em 72 *pools* de *Ae. albopictus*. Desses, 35 foram positivos para os sorotipos DENV-1 e DENV-2 (CECÍLIO et al., 2015). Também em Minas Gerais, na cidade de Belo Horizonte, ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram coletados e as larvas identificadas e avaliadas. Um total de 163 larvas de *Ae. aegypti* (37.4%) e 5 de *Ae. albopictus* (50%) foram encontradas infectadas com os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, bem como com co-infecção por DENV-1/2 e DENV-2/3 (PESSANHA et al., 2011).

Em 2012, a transmissão vertical foi detectada pela primeira vez em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em Fortaleza, Ceará. A partir da análise de 47 *pools* de fêmeas de mosquitos adultos, oriundos de ovos coletados em 40 localidades da cidade. Foi detectado DENV-2 em 1 *pool* de *Ae. aegypti*, DENV-3 em 1 *pool* de *Ae. albopictus* e 1 *pool* de *Ae. albopictus* com DENV-2 e DENV-3 (Martins et al., 2012). Em 2015, em Cuiabá (Mato Grosso), foram analisados 758 *Ae. aegypti* adultos, coletados através de armadilhas ovitrampas. Quando adultos, foram separados em 50 *pools*, sendo que 8 foram positivos para DENV-4 (5 *pools* de machos e 3 de fêmeas), demonstrando transmissão vertical nessa região (CRUZ et al., 2015).

A transmissão vertical em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* também foi evidenciada em outros países do mundo. Em Rangum – Mianmar, por exemplo, foi detectado DENV-2 em 3 *pools* de larvas e 2 *pools* de machos adultos de *Ae. aegypti*, a partir de coleta de larvas em 9 comunidades da cidade (KHIN e THAN, 1983). O sorotipo DENV-4 foi isolado de *Ae. aegypti* adultos, criados em laboratório a partir de ovos e larvas coletados em 10 localidade de Trinidad e Tobago (HULL et al., 1984). No estado de Oaxaca, México, foi detectado o DENV-2, DENV-3 e DENV-4 em adultos de *Ae. aegypti*, coletados a partir de larvas em duas localidades do estado (GUNTHER et al., 2007).

Entretanto, em outros estudos, a presença de transmissão vertical não foi confirmada na natureza. Na Índia, por exemplo, no estado de Maharashtra, 281 machos e 323 fêmeas, criados a partir de larvas coletadas em campo, foram negativos para o DENV (ILKAL et al., 1991). Na Tailândia, HUTAMAI et al. (2007) coletaram imaturos, totalizando 9.975 espécimes de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em 17 localidades, onde houve epidemias de dengue nos anos anteriores. Nenhum *pool* foi encontrado positivo para o DENV, e os autores sugeriram que a transmissão vertical poderia estar acontecendo em baixos valores na população, e que este mecanismo poderia não desempenhar um papel significativo na epidemiologia da doença na Tailândia.

No Brasil, em Roraima, ZEIDLER et al., (2008) analisaram a transmissão vertical natural em larvas, criadas a partir de ovos de *Ae. aegypti*, coletados em um bairro com alto índice de dengue e alto índice de infestação predial. Dos 44 *pools* testados, nenhum foi encontrado positivo para vírus o DENV. Os autores sugerem que a transmissão vertical do vírus ocorre a uma frequência muito baixa e, por isso, a manutenção do DENV na natureza pode não depender essencialmente desse fenômeno.

No presente estudo, não encontramos evidências de transmissão vertical natural nas populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* do Parque do Piqueri, o que não significa que ela não esteja ocorrendo. Em geral, a transmissão vertical é encontrada em baixas taxas no campo, conforme foi demonstrado em estudos anteriores (KHIN e THAN, 1983; GUNTHER et al., 2007; MARTINS et al, 2012).

Em nosso estudo, utilizamos 1520 mosquitos da espécie *Ae. aegypti* e 1480 mosquitos da espécie *Ae. albopictus*. Trata-se de quantidades relevantes de espécimes para análise. Além de que no local de coleta, o bairro do Tatuapé - zona leste de São Paulo houve um grande aumento nos casos de dengue nos anos de 2015 e 2016, reforçando a circulação do vírus no ambiente, nos anos que coletamos os ovos.

Há necessidade de mais estudos sobre a transmissão vertical e também sobre os possíveis mecanismos de manutenção dos vírus na natureza na cidade de São Paulo, que se trata da cidade mais populosa do Brasil (IBGE, 2014) e de uma das metrópoles mais populosas do mundo (DEMOGRAFIA WORLD URBAN AREAS, 2016), com grande fluxo de pessoas oriundas de diversos lugares do mundo. Adicionalmente, o estudo de transmissão vertical faz-se necessário não só para o vírus dengue, mas também para outros arbovírus de importância para a saúde pública, como Zika e chikungunya, isolados recentemente pela primeira vez no país.

Quando estudamos uma população de mosquitos e encontramos uma taxa importante de paridade que nos mostra a longevidade da população, a presença de discordância gonotrófica que nos informa que as fêmeas estão fazendo vários repastos sanguíneos, juntamente com a capacidade de transmissão de patógenos, pode-se distinguir áreas importantes para possíveis transmissões de arbovírus.

Analisando o comportamento vetorial como a taxa de paridade e a presença de discordância gonotrófica de mosquitos vetores como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, juntamente com a capacidade de transmissão vertical de patógenos, nos traz informações importantes que podem ser usadas para o serviço de controle entomológico e virológico. Fazendo então a junção desses estudos um parâmetro útil para identificar áreas de maior suscetibilidade de contração de arbovírus.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* apresentaram uma alta taxa de paridade;
- ❖ A alta taxa de paridade observada nas fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* indica longevidade dessas espécies nos locais de captura;
- ❖ A maior parte das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, em ambas as áreas de captura, foram encontradas em estágios iniciais de maturação dos ovários (N-II);
- ❖ A maioria das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram encontradas com sangue em seu intestino médio, indicando haver relevante oferta de hospedeiros para realização de repasto sanguíneo;
- ❖ Houve discordância gonotrófica em ambas as espécies, o que favorece a infecção e transmissão de patógenos pelas fêmeas desses mosquitos;
- ❖ Não foi detectada transmissão vertical natural de DENV em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, nas populações do Parque do Piqueri - SP, nos anos e estações estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida APG, Baptista CAGCC, Sousa MTLM, Novo HC, Ramos NA, Panella M, et al. Bioecology and vectorial capacity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in macao, China, in relation to Dengue virus transmission. *J Med Entomol*. 2005; 42:419-28.
- Barata EAMF, Costa AIP, Chiaravalloti FN, Glasser CM, Barata JMS, Natal D. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2001;35(3):237-4.
- Barrera R. Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecological Entomology*. 1996; 21:117-27.
- Benchimol, JL. Febre Amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada [internet]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2001.470p. ISBN 978-85-7541-395-1.
- Bermudi PMM, Kowalski F, Menzato MM, Ferreira MC, Passos WBS, Oku VEJA, et al. Criadouro de *Aedes aegypti* em reservatório subterrâneo de água da chuva: um alerta. *Rev Saude Publica*. 2017; 51:122.
- Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, et al. Chikungunya Virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(5): 852–4. [https://doi: 10.3201/eid1405.071144](https://doi.org/10.3201/eid1405.071144).
- Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde* [Internet]. 2007 Jun [acesso em: 20 març 2018]; 16(2): 113-18. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000200006&lng=pt. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000200006>.
- Braks, MA, Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol*. 2003; 40:785-94.
- Briegel H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 1990;36 (3):165-72.
- Brito M, Marques GRAM, Marques CA, Tubaki RM. Primeiro encontro de *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) no Estado de São Paulo (Brasil). *Rev Saúde Pública*.1986; 20:489.
- Buckner EA, Alto B, Lounibos L.P. Vertical transmission of Key West dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. *J Med Entomol*. 2013; 50(6):1291-7.

Cabezas C, Paquita GM, Valle J, Yañez P, Fachin L, Sinti C, Mamani E. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti*, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015; 32(1):191-2.

Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Inf Dis*. 2016; 16:653-60.

Caminade C, Medlock JM, Ducheyne E, McIntyre KM, Leach S, Baylis M, et al. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *J R Soc Interface*. 2012. doi:10.1098/rsif.2012.0138.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2015; 21(10), 1885-1886. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2110.150847>.

Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(6): 787–96.

Castro MG, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenço-de-Oliveira R. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:809-14.

Cecílio SG, Júnior WF, Tótola AH, Brito MCL, Ferreira JM, Magalhães JC. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae from southeastern Brazil. *J Vector Ecol*. 2015; 40(1):71-4.

CEPEUSP. 2016. Parque Esporte para Todos: espaço privilegiado da USP [Internet]. São Paulo [acesso em 29 fev 2018]. Disponível em: <http://www.cepe.usp.br/?news=parque-esporte-para-todos-espaco-privilegiado-da-usp>.

Chambers GM, Klowden MJ. Correlation of nutritional reserves with a critical weight for pupation in larval *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*. 1990; 6(3):394-9. PMID:2230767.

Charlwood JD, Rafael JA, Wilkes TJ. Métodos de determinar a idade fisiológica em Diptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. *Acta Amazônica*. 1980; 10 (2): 311-33.

Chitolina RF, Anjos FA, Lima TS, Castro EA, Costa-Ribeiro MCV. Raw Sewageas breeding site to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, culicidae). *Acta Tropica*. 2016; 164:290–6.

Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, Dupont-Rouzeyrol M, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Differential

Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. PLoS Negl Trop Diss. 2016; 10(3): e0004543. doi:10.1371/journal.pntd.0004543.

Christophers, S.R. *Aedes aegypti*: The Yellow Fever Mosquito. Crambridge University Press.1960. London. 739p.

Clements, A. N. The biology of mosquitoes: Development, nutrition and reproduction. London: Chapman & Hall. 1992;1:509.

Clements NA. *The biology of mosquitoes*. Wellinford: CABI Publications; 1999; 2.

Colles DH, Chellapah WT. Effects of bory weight and size of blood-meal upon egg production in *Aedes aegypti*. (Diptera, Culicidae). Ann Trop Med Parasit. 1960; 54:475-82.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.

Costa ZA, Romano AM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. Rev Pan-Amaz Saude [Internet]. 2011 mar [citado 23 de março de 2018] ; 2(1): 11-26. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000100002&lng=pt.

Cruz LCTA, Serra OP, Leal- Santos FA, Ribeiro ALM, Slhessarenko RD, Santos M A. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 em *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. Ver Soc Bras Med Trop. 2015; 48 (1): 18-25.

Degallier N, Rosa AT, Vasconcelos PF, Travassos da Rosa ES, Rodrigues SG, Sá Filho GC, Rosa JFST. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. Cien Cult. 1992;44(2/3):136-42.

Degallier N, Teixeira JMS, Soares SS, Pereira RD, Pinto SCF, Chaib AJM, Vasconcelos PFC, Oliveira E. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. Rev Saúde Públ. 2003,37:386-7.

Demographia World Urban Areas. 12th Annual Edition: 2016:04 [internet]. Disponível em: <http://cdn.plataformaurbana.cl/wp-content/uploads/2016/05/demographia-world-urban-areas.pdf>

Detinova TS. Methods of determining the physiological age of female. Age grouping methods in Diptera of medical importance. Geneva:1962. WHO; (WHO Monograph Series, 47).

Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus I. Isolation and serological specificity. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509-20. Doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4

Donalisio MR, Freitas ARR. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Rev Bras Epidemiol.* 2015; 18(1): 283-5. 2014. DOI: 10.1590/1980-5497201500010022

Edman JD, Scott TW, Costero A, Morrison AC, Harrington LC, Clark GG. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. *J Med Entomol.* 1998; 35:578–83.

Eickmann SH, Carvalho MDCG, Ramos RCF, Rocha MAW, Linden V, Silva PFS. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. *Cad Saúde Pública* [internet]. 2016 [acesso em 15 fev 2018]; 32(7): e00047716. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2016000700601&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00047716>.

Eryu W, Scott CW, Robert ES, Robert BT, Douglas MW, ALAN DTB. Genetic Variation in Yellow Fever Virus: Duplication in the 3' Noncoding Region of Strains from Africa. *Virology.* 1996; 225:274–81.

Farjana T, Tuno N. Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2013; 50 (4):838–46. <https://doi.org/10.1603/ME12146>.

Fernández Z, Forattini OP. Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e história reprodutiva. *Rev Saúde Pública.* 2003;37(3):285-91.

Figueiredo MLG, Gomes AC, Amarilla AA, Leandro AS, Orrico AS, Araujo MA, Castro JSM, Durigon EL, Aquino VH, Figueiredo LTM. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virol.* 2010;7: 152.

Fiusa LJT. Risco de urbanização da febre amarela no Brasil. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. 1985 [acesso em 23 mai 2018]; 1(3): 377-384. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1985000300010&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1985000300010>.

Forattini OP. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Ver Saúde públ.* 1986; 20:244-5.

Forattini OP, Marques GRAM, Kakitani I, Brito M, Sallum MAM. Significado epidemiológico dos criadouros de *Aedes albopictus* em bromélias. *Rev Saúde Pública.* 1998;32 (2).

Forattini OP. *Culicidologia Médica.* 2 Vol. São Paulo: Edusp. 2002.

Forattini OP, Brito M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. Rev Saúde Públ. 2003;37(5):676-7 .

Franco O. História da febre amarela no Brasil. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro. GB – Brasil. 1969

Funasa. Dengue: Instruções para o pessoal combater o vetor – manual de normas técnicas. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2001; 84 p.

Gomes AC, Marques GRAM. Encontro de criadouro natural de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública. 1988; 22:245.

Gomes AC, Bitencourt MD, Natal D, Pinto PLS, Mucci LF, Paulo MB, et al. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. Rev Saúde Pública. 1999; 33(1): 95-7.

Google Earth [aplicativo]. Disponível em: <<https://www.google.com/earth/>>.

Gottfried KL, Gerhardt RR, Nasci RS, Crabtree MB, Karabatsos N, Burkhalter KL, et al. Temporal abundance, parity, survival rates, and arbovirus isolation of field-collected container-inhabiting mosquitoes in eastern Tennessee. J Am Mosq Contr Assoc. 2002;18:164–72. PMID: 12322937

Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Rouzeyrol MD. Detection of Zika Virus in Urine. Emerg Infect Dis. 2015; 21(1): 84–6.

Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(2): e2681.

Gubler DJ. Dengue e Dengue Hemorrhagic Fever. Clinical Microbiology Reviews. Philadelphia. 1998;3 (11): 480-96.

Gubler DJ. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. Archives of Medical Research. 2002:330–42.

Gunther J, Martinez-Munoz JP, Perez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. Evidence of Vertical Transmission of Dengue Virus in Two Endemic Localities in the State of Oaxaca, Mexico. Intervirology. 2007; 50:347-52. DOI:10.1159/000107272.

Harrington LC, Edman JD, Scott TW. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? J Med Entomol. 2001;38:411-422.

Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. J Am Mosq Control Assoc Suppl. 1988; 1:1-39.

Hayes EB. Zika Virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(9):1347-1350. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1509.090442>.

Hoeck PAE, Ramberg FB, Merrill SA, Moll C, Hagedorn HH. Population and parity levels of *Aedes aegypti* collected in Tucson. *J Vector Ecol*. 2003; 28:65–73.

Honório NA, Silva WC, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic área in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem do Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98 (2): 191-198. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232011000100002>.

Honório NA, Câmara DCP, Calvet GA, Brasil P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2017; 31(5): 906-8. <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020515>.

Hull B, Tikasingh E, Souza M, Martinez R. Natural Transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* um Trinidad. *Am J Trop Med Hyg*. 1984; 33(6): 1248 – 50.

Hutamai S, Suwonkerd W, Suwannchote N, Somboon P, Prapanthadara L. A survey of dengue viral infection in *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* from re-epidemic areas in the north of Thailand using nucleic acid sequence based amplification assay. *Sout Asian J Trop Med Public Health*. 2007;38(3).

Ilkal MA, Dhanda V, Hassan MM, Mangala M, Mahadev PVM, Shetty PS, Guttikar SN, Banerjee K. Entomological investigations during outbreaks of dengue fever in certain villages in Maharashtra state. *The Indian Jour of Med Res*. 1991; 93:174-8. PMID:1937596.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [internet]. Brasil; 2014 [acesso em 29 mai 2018]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao.html>

Instituto Oswaldo Cruz. Dengue, vírus e vetor. [internet]. [acesso 15 feve 2018]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>.

Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. Persistence of dengue 3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(2):158-61.

Junior VLP. A febre amarela como nova ameaça sanitária. *Rev Med Saude*. 2017; 6(3): 272-3.

Kakitani I, Forattini OP. Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albiparvus* L. s. em área de agroecossistema irrigado. Rev Saúde pública. 2000; 34 (1):33-8.

Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32: 590–4.

Klowden MJ, Lea AO. Abdominal distention terminates subsequent host-seeking behavior of *Aedes aegypti* following a blood meal. J Insect Physiol. 1979; 25:583 – 5.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992; 30:545-51.

Le Goff G, Revollo J, Guerra M, Cruz M, Barja Simon Z, Roca Y, Vargas Florès, J, Hervé JP. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. Parasite. 2011; 18(3):277-80.

Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Frequência e Distribuição Espacial de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Brasil. 2006; 22: 2079-2084.

Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R. Parity and ovarian development of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in metropolitan Rio de Janeiro. Journal of Vector Ecology. 2007; 32, 34-40.

Lima-Camara TN, Urbinatti PR, Chiaravalloti-Neto F. Encontro de *Aedes aegypti* em criadouro natural de área urbana, São Paulo, SP, Brasil. Rev Saude Publica. 2016; 50:3.

Lourenço-De-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil and southern United States. Am J Trop Med Hyg. 2003; 69 (1):105-114.

MacDonald WW. *Aedes aegypti* in Malaya. II – larval and adult biology. Ann. Trop. Med. Parasit. 1956; 50:399-414.

Marques CCA, Marques GRAM, Brito M, Neto LGS, Ishibashi VC, Gomes FA. Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. Rev Saúde Públi. 1993; 27 (4): 237-41.

Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, Carvalho AFM, Simone SG, Dutra RF, Guedes MI. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. PLoS One. 2012;7(7): e41386.

Medeiros-Sousa AR, Ceretti WCJR, Urbinatti PR, Carvalho GC, Bicudo MP, Fernandes A, et al. Mosquito Fauna in Municipal Parks of São Paulo City, Brazil: A Preliminary Survey. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2013; 29(3):275-9.

Medeiros-Sousa AR. Estudos dos padrões de diversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parques urbanos da cidade de São Paulo, SP. [Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2014.

Menezes M. Fiocruz: Estudo compara métodos para medir infestação por *Aedes aegypti*. [Internet] 2014 [acesso em 28 Dez 2015]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2135&sid=32&tpl=priinterview>.

Mer GG. Experimental study on the development of the ovary in *Anopheles etutus*, Edw. (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*. 1936; 27: 351-9.

Miller BR, Ballinger ME. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988; 82: 476-7.

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até semana epidemiológica 12, 2015. [internet] 2015 [acesso 28 abril 2015]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/17/Boletim-Dengue-SE12-2015.pdf>

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2016; 47 (38).

Ministério da Saúde. Informe: monitoramento do período sazonal da febre amarela, Brasil 2017/2018. NUCOM/SVS/MS – 21 Nov. 2017

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2018; 32 (49).

Ministério da Saúde. Febre amarela: Ministério da Saúde atualiza casos no país. [Internet]. Brasil; 2018. [acesso em 26 jul 2018]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42655-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais>.

Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med*. 2016; 374:951-8.

Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases*. 2001; 1.

Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2015; 21(2): 359-61. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2102.141363>.

Nasci RS. A light weight battery powered aspirator for collecting resting mosquitos in the field. *Mosq News*. 1981; 41: 808-11.

Nelson MJ. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington, DC, Organización Panamericana de la Salud; 1986.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990; 85 (2): 253.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96: 925-6.

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AM, Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, Souza LJ, Guimarães FR, Araújo ES, Simone TS, Baran M, Teixeira G, Miagostovich MP. Dengue Virus type3, Brazil, 2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11 (9):1376-81.

Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos JM, Gilding N, Kraemer MU, Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 2015;13(102):1-11.

Oliveira MAS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brains abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 47:6-7.

Osanaí CH. A epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981-1982. Rio de Janeiro. [Dissertação]. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 1984.

Pancetti FGM, Honório NA, Urbinatti PR, Lima-Camara TN. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48(1):87-89.

Penna MLF. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cad Saúd Públi*, Rio de Janeiro.2003;19(1):305-9.

Pessanha JEM, Caiaffa WT, Cecilio AB, Lani FCM, Araujo SC, Nascimento JC, et al. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples os *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Ver Soc Bras Med Trop*, 2011; 44(1):103-5.

Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolos. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7:319-27.

Pittendrigh CS. The Bromeliad-Anopheles-Malaria Complex in Trinidad. I-The Bromeliad Flora. *Evolution*. 1948; 2:58-89.

PMSP - Prefeitura Municipal de São Paulo. Piqueri. [internet] 2018: [acesso em 15 abril 2018]. Disponível em: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/parques/regiao_leste/index.php?p=5761

Porto MY. Uma revolta popular contra a vacinação. *Cienc Cult*. [Internet]. 2003 Jan [aceso em 23 mai 2018]; 55(1): 53-54. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100032&lng=en.

Reinaldo M, Martins MLS, Maia RHG, Farias LAB, Camacho MS, Freire, RG, et al. 17DD yellow fever vaccine. A double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose response study. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013; 9:4, 1–10.

Roiz D, Eritja R, Melero-Alcibar R, Molina R, Marques E, Ruiz S, et al. Distribuição de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae) en España. *Boletín Socie Entom Arag*. 2007;1: 40, 523–6.

Romano APM, Ramos DG, Araújo FAA, Siqueira GAM, Ribeiro MPD, Leal SG et al. Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. *Epidemiol Serv Saúde* [Internet]. 2011 [acesso em 20 março 2018]; 20(1): 101-6. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742011000100011&lng=pt. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742011000100011>.

Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC. Transovarial transmission of dengue virus by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32: 1108–19.

Rosen L. Further observations on the mechanism of vertical transmisson of Flaviviruses by *Aedes* Mosquitoes. *The Amer Jour Trop Med Hyg*. 1998;39: 123 – 6. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.123>.

Santos RLC. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Rev. Saúde Pública*. 2003;37 (5).

Savage HM, Smith GC, Moore CG, Mitchell CJ, Townsend M, Marfin AA. Entomologic Investigations of na Epidemic of St. Louis Encephalitis in Pine Bluff, Arkansas, 1991. *The Amer Soc Trop Med Hyg*. 1993; 49(1): 38-45.

Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;245-6.

Scott TW, Clark GG, Lorenz LH, Amerasinghe PH, Reiter P, Edman JD. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *J Med Entomol*. 1993; 30:94-9.

Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, Kittayapong P, Edman JD. Longitudinal Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood Feeding Frequency. *Entom Society of Ame*. 2000; 37 (1): 89-101.

Serufo JC, Montes OHM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira MA, Nogueira RMR, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, state of Minas Gerais, Braz. *Mem Instit Osw Cruz*. 1993; 88: 503-4.

Silva HHG, Silva IG, Lira KS. Metodologia de Criação, Manutenção de Adultos e Estocagem de Ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em Laboratório. *Ver Patol Trop*. 1998; 27(1) 53-63.

Silva HHG, Silva IG. Influência do Período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Ver Soc Bras Med Trop*. 1999; 32(4).

Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2001;17:99-102.

Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2002;18(3):867-71.

Tauil P L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2010;44(3):555-8.

Teixeira LA. Da transmissão hídrica a culicidiana: a febre amarela na sociedade de medicina e cirurgia de São Paulo. *Revi Bras Hist*. 2001;21(41): 217-42. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-01882001000200012>.

Teixeira MJ, Andrade A, Costa MN, et al. East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerg Infec Dise*. 2015; 21(5):906-907. doi:10.3201/eid2105.141727.

Telles-de-Deus J, Kakitani I. Paridade de *Ochlerotatus scapularis*. *Rev Saúde Pública*. 2006; 40(3):505-12.

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Socorro S, Azevedo R, Teixeira NMR, Costa VPF. Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011;17: 938-40.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*. 1997; 25 (24): 4876–82. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Valerio L, Facchinelli L, Ramsey JM, Scott TW. Dispersal of Male *Aedes aegypti* in a Coastal Village in Southern Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 86(4):665–76. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0513>

Varejão JB, Santos CB, Rezende HR, Bevilacqua LC, Falqueto A.. *Aedes (Stegomyia) aegypti*. (Linnaeus, 1762) breeding sites in native bromeliads in Vitória City, ES. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(3):238-40.

Vasconcelos, PFC. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua*. 2015;6(2):9-10.

Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol*. 2014; 88(11):6294-306.

Vezzani D. Review: artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: a perfect match. *Trop Med Int Health*. 2007;12(2):299-313.

Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. Effect of Temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for Dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 36: 143–52.

Willis FS, Nasci RS. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population density and structure in Southwest Louisiana. *J Med Entomol*. 1994; 31:594–9.

WHO - World Health Organization. Fractional dose yellow fever vaccine as a dose-sparing option for outbreak response. [internet] Julho/2016 [acesso 23 março 2018]. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246236/WHO-YF-SAGE-16.1-eng.pdf;jsessionid=92F310B2178FD40D37318B52A01ABAA8?sequence=1>.

Xue R, Edman JD, Scott TW. Age and Body Size Effects on Blood Meal Size and Multiple Blood Feeding by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1995; 32 (4): 471–4.

Zanluca C, Melo VCA, Mosimann ALP, Santos GIV, Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2015;110(4):569-72.

Zeidler JD, Acosta POA, Barreto PP, Cordeiro JS. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. Rev Saúde Pública. 2008; 42(6): 986-97.

Pâmela dos Santos Andrade

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2924796763664683>
Última atualização do currículo em 16/10/2017

Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Fundação Santo André (2014). Atualmente é Mestranda da Faculdade de Saúde Pública da USP, na área de Entomologia em Saúde Pública. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase em Entomologia em Saúde Pública. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Pâmela dos Santos Andrade
Nome em citações bibliográficas ANDRADE, P. S.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2014 Graduação em Ciências Biológicas.
Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Brasil.
Título: A eficácia de métodos interativos na aprendizagem de ciências aos alunos do sexto ano sobre a biologia geral dos cnidários em especial as águas vivas.
Orientador: Nicolas Lavor de Albuquerque..
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Formação Complementar

2015 - 2016 Aprimoramento Profissional em Epidemiologia Médica e Soroepidemiologia.
Faculdade de Saúde Pública da USP, FSP, Brasil.

Atuação Profissional

Faculdade de Saúde Pública da USP, FSP, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2016 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aprimorando Fundap, Carga horária: 40

Projetos de pesquisa

2016 - Atual Paridade, desenvolvimento ovariano e infecção por vírus Dengue de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), na cidade de São Paulo.
Descrição: Pesquisa sobre concordância gonotrófica, afim de verificar capacidade de transmissão do vírus dengue pelo *Aedes aegypti* e *Aedes*

Tamara Nunes de Lima Camara

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3278830962480974>
Última atualização do currículo em 26/02/2018

Graduada em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas e em Bacharelado de Zoologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2004). Possui Mestrado e Doutorado em Ciências pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária da Fundação Oswaldo Cruz -IOC- RJ. Pós-Doutorado realizado na Fiocruz- RJ. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase em Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores, atuando principalmente nas seguintes linhas de pesquisa: Biologia e Ecologia de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e Comportamento de Insetos Vetores. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Tamara Nunes de Lima Camara
Nome em citações bibliográficas	Lima-Camara T.N.;Lima-Camara TN;de Lima-Camara TN;Lima-Camara Tamara N;Lima-Camara, Tamara N.;LIMA-CAMARA, TAMARA NUNES

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617764 URL da Homepage: http://wwws.cnpq.br/cvlattesweb/PKG_MENU.menu?f_cod=2ADEE7F9C5112796A340FBA2C68AAA39
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2007 - 2011	Doutorado em Biologia Parasitária (Conceito CAPES 7). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil. Título: Análise dos ritmos biológicos de espécies vetoras do vírus dengue - <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> - (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório., Ano de obtenção: 2011. Orientador: Alexandre Afranio Peixoto. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: <i>Aedes aegypti</i> ; <i>Aedes albopictus</i> ; Ritmo Biológico.
2005 - 2007	Mestrado em Biologia Parasitária (Conceito CAPES 7). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil. Título: Estudo da atividade locomotora de mosquitos vetores (Diptera: Culicidae), sob condições controladas, Ano de Obtenção: 2007. Orientador: Alexandre Afrânio Peixoto. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: <i>Aedes aegypti</i> ; <i>Aedes albopictus</i> ; <i>Anopheles aquasalis</i> ; Ritmo Biológico.
2000 - 2004	Grande área: Ciências Biológicas Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. Título: Frequencia, paridade e desenvolvimento ovariano de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> (Diptera: Culicidae) em diferentes ambientes do Rio de Janeiro. Orientador: Ricardo Lourenço-de-Oliveira e Jorge Luiz Nessimian.