Instituto de Medicina Tropical

Universidade de São Paulo

Licia Natal Fernandes

**Identificação de infecção por *Flavivirus* em mosquitos
(Diptera: Culicidae) coletados em áreas verdes da cidade de
São Paulo.**

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade
de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Levi

São Paulo

2015

Instituto de Medicina Tropical
Universidade de São Paulo

Licia Natal Fernandes

**Identificação de infecção por *Flavivirus* em mosquitos
(Diptera: Culicidae) coletados em áreas verdes da cidade de
São Paulo.**

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade
de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Levi

São Paulo

2015

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da

Universidade de São Paulo

Fernandes, Licia Natal

Identificação de infecção por Flavivirus em mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados em áreas verdes da cidade de São Paulo / Licia Natal Fernandes. – São Paulo, 2015.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo - para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: José Eduardo Levi

DEDICATÓRIA

À minha querida família...

Em especial, aos meus pais... Delsio e Elvira.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Eduardo Levi, pela orientação do presente trabalho, por estar presente nas principais decisões tomadas, pela confiança em meu trabalho e pelas contribuições práticas e objetivas.

Ao Professor Mauro Toledo Marrelli, pela oportunidade que me deu de participar do Projeto “Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques municipais da cidade de São Paulo”, mais especificamente no trabalho com os flavivírus.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À Dra. Rosely dos Santos Malafronte pelo incentivo, paciência, compreensão, confiança, troca de ideias e revisão do texto.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Junior, pelo incentivo e confiança em meu trabalho.

À equipe de entomologia da Faculdade de Saúde Pública... Em especial ao Dr. Paulo Roberto Urbinatti, Dr. Walter Ceretti-Júnior e Antonio Ralph Medeiros-Sousa, pela grande ajuda na coleta de mosquitos, e à Dra. Márcia Bicudo de Paula e ao Aristídes Fernandes, pela infinita paciência, pelos preciosos ensinamentos e pela ajuda na identificação dos culicídeos.

À equipe do Departamento de Parques e Áreas Verdes-3 (DEPAVE-3) e à equipe do Laboratório de Fauna Sinantrópica do Centro de Controle de Zoonoses (em especial à Helena, ao Renildo e à Alessandra), pela importante participação na coleta dos mosquitos, pela grande disposição em ajudar e pela agradável companhia!

À Dra. Camila Malta Romano, pelas análises filogenéticas e por sempre estar disponível para ajudar na parte de bioinformática.

Ao Dr. Luiz Eloy Pereira, pelos proveitosos dias de treinamento em captura, conservação e transporte de mosquitos destinados ao isolamento de vírus, realizado em Iguape. Agradeço também à Camila e ao Jeferson pelos ensinamentos durante o trabalho de campo.

À Dra. Margarete de Lara Capurro-Guimarães, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por fornecer controles positivos para os testes laboratoriais.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do IMT, Marcelo Plaisant Geraldi, Renata Moscolini Romão e em especial à Cristina Mendes de Oliveira, por me ajudarem a me situar no Laboratório de Virologia e por me ensinarem técnicas laboratoriais. Obrigada pela paciência! À Alvina Clara Félix, Cristiane de campos Centrone e ao Felipe Scassi Salvador, pela ajuda em alguns experimentos. À Sônia, pelo cuidado com o Laboratório, deixando-o um local sempre limpo, organizado e agradável para o trabalho.

Ao Luciano Monteiro da Silva, pela disposição em ajudar a resolver questões importantes para a realização do presente trabalho.

Ao Centro de Estudos Samuel Pessoa, pelo apoio financeiro no final do trabalho e à Lucy, por viabilizar as questões práticas.

Ao amigo Antonio Charlys Costa, pela troca de ideias, ensinamentos, incentivo e disposição em ajudar.

Ao Carlos e à Angela, da Biblioteca do IMT, pela revisão da formatação do texto e das referências.

À Eliane, da secretaria do programa de pós-graduação do IMT, por ser sempre tão gentil e por todos os esclarecimentos que se fizeram necessários.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Protozoologia do IMT... Marilda, Júnior, Isabel, Ana Maria, Izilda e Andrés. Obrigada pelo incentivo, interesse, ajuda e conversas sobre meu trabalho de doutorado! Agradeço também ao Júnior pela revisão da introdução.

Às amigas da época do mestrado... Beth, Camila, Miriam, Cíntia, Luísa e Kel. Pela caminhada que continuamos trilhando juntas e que nos anima para nos mantermos firmes em nossos trabalhos!

Ao Dr. George Barbosa, pelas importantes conversas que tivemos sobre meu doutorado e pelas reflexões por meio das quais me encorajei para concluir o presente trabalho.

À minha querida amiga Michele Soares Gomes Gouvea, pela contribuição com muitas conversas e ideias sobre os experimentos laboratoriais, pela força, incentivo e inspiração.

Aos meus pais, Delsio e Elvira Natal, exemplos que quero seguir, por tudo o que me deram e por todo o apoio durante o período de doutorado! Ao meu pai agradeço também pela grande ajuda nas coletas de mosquitos, pela cuidadosa revisão do trabalho escrito e por pensar comigo na melhor forma de colocar algumas coisas no texto.

Ao Marcelo Fernandes, meu marido, por toda a força, incentivo, carinho, companheirismo e compreensão.

À Thaís, minha irmã e ao Andrei, meu cunhado, pela força e carinho.

À minha amiga Ana Luísa, pela torcida, interesse e carinho.

RESUMO

Fernandes LN. Identificação de infecção por *Flavivirus* em mosquitos (Diptera: Culicidae) coletados em áreas verdes da cidade de São Paulo (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Dos arbovírus transmitidos no Brasil, os *Flavivirus* apresentam destaque por causarem o maior número de infecções e doenças no homem e pela gravidade das doenças que provocam. A cidade de São Paulo possui áreas verdes, representadas por parques municipais em que existem lagos, aves e mamíferos. Esses locais são frequentados pela população e podem servir de refúgio para mosquitos que infestam a área urbana. Alguns trabalhos revelam a ocorrência de espécies de mosquitos conhecidas como vetoras de *Flavivirus* em tal cidade, o que pode favorecer o aparecimento de casos e transmissão de doenças causadas por este tipo de vírus. No entanto, a presença de *Flavivirus* infectando tais artrópodes não é conhecida. **Objetivo:** Identificar presença de *Flavivirus* em mosquitos (Diptera: Culicidae) provenientes de áreas verdes da cidade de São Paulo. **Método:** Sete parques municipais localizados em diferentes regiões da cidade foram selecionados para o estudo. Foram realizadas coletas de mosquitos mensais em cada parque no período de março de 2011 e fevereiro de 2012. As armadilhas utilizadas foram: aspirador, Shannon e CDC-CO₂. Os mosquitos foram transportados para o laboratório em gelo seco, identificados em mesa fria e agrupados em “pools” de até 10 fêmeas não ingurgitadas, segundo espécie, data e local de coleta. Fêmeas ingurgitadas foram armazenadas individualmente. As amostras foram submetidas à extração de ácidos nucleicos, seguida de RT-PCR em tempo real para amplificação de fragmento de aproximadamente 200pb do gene

NS5 de *Flavivirus*. Amostras positivas foram encaminhadas para sequenciamento e análises filogenéticas. **Resultados:** Dentre as 5.213 fêmeas não ingurgitadas (818 *pools*) e as 778 fêmeas ingurgitadas coletadas, ocorreu presença de onze gêneros de Culicídeos, sendo mais frequentes *Culex* e *Aedes*. Dezenove *pools* de fêmeas não ingurgitadas obtiveram resultado positivo para *Flavivirus*. Análises filogenéticas mostraram presença de RNA relacionado à *Aedes flavivirus* (AEFV) em dois *pools* de *Aedes* e à *Culex flavivirus* (CxFV) nos demais *pools*, todos de *Culex*. **Conclusões:** CxFV e AEFV estão presentes em mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*, respectivamente, coletados em parques municipais da cidade de São Paulo. Embora flavivírus patogênicos ao homem não tenham sido encontrados no presente trabalho, recomenda-se vigilância de flavivírus nas áreas estudadas, visto que elas possuem presença de mosquitos vetores e hospedeiros vertebrados, ou seja, elementos necessários para a transmissão destes vírus.

Descritores: *Flavivirus*. Mosquitos. Parques. Reação em cadeia por polimerase.

ABSTRACT

Fernandes LN. *Flavivirus* infecting mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in green spaces from the city of São Paulo. (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2015.

Introduction: Among the arboviruses transmitted in Brazil, *Flavivirus* are noteworthy once they cause the largest number of infections and diseases in humans and also because they can cause serious illnesses. In the city of São Paulo there are green spaces, represented by city parks in which lakes, birds and mammals are found. The population visits those places, which can also be a refuge for mosquitoes that infect the urban area. Some studies reveal the occurrence of mosquitoes species known to be vectors of *Flavivirus* in this city, what can contribute to the emergence of cases and transmission of diseases caused by this kind of virus. However, the presence of *Flavivirus* infecting those arthropods is not known. **Objective:** To Identify infection by *Flavivirus* in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in São Paulo's city parks. **Method:** Seven city parks located in different places of the city were selected for the study. Monthly mosquito collections were carried out in each park from March 2011 to February 2012. The traps employed were aspirator, Shannon and CDC-CO₂. The mosquitoes were transported to the laboratory on dry ice. Identification was performed in a chill table. Up to 10 non-engorged females were pooled according to specie, date and place of collection. Engorged females were stored individually. Nucleic acids were extracted and submitted to real time RT-PCR that amplifies a 200pb fragment of *NS5* gene of *Flavivirus*. Positive samples were sequenced and phylogenetic analyses were

performed. **Results:** Eleven genus of Culicidae were found among the 5,213 non engorged females (818 pools) and the 778 engorged females. *Culex* and *Aedes* were the most frequent collected genus. Nineteen non engorged female *pools* had positive results for the presence of *Flavivirus* RNA. Phylogenetic analyses showed the RNA found was related to *Aedes flavivirus* (AEFV) in two *pools* of *Aedes* and to *Culex flavivirus* (CxFV) in the other pools, all of them consisting of *Culex*. **Conclusion:** CxFV and AEFV are present in mosquitoes *Culex* and *Aedes*, respectively, collected in São Paulo's city parks. *Flavivirus* of medical importance were not detected. Although, once there are species of mosquitoes that can act as vectors of pathogenic *Flavivirus* and vertebrate hosts, which are required for the transmission cycle of those virus, surveillance is recommended in the studied areas.

Descriptors: *Flavivirus*. Mosquitoes. Parks. Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do genoma de <i>Flavivirus</i>	27
Figura 2	Mapa da cidade de São Paulo com setas indicando a localização dos sete parques municipais selecionados para o presente trabalho.....	56
Figura 3	Imagens de satélite mostrando sete fragmentos de área verde, representados pelos Parques municipais da cidade de São Paulo selecionados para o presente trabalho.....	60
Figura 4	Armadilhas utilizadas para a coleta de mosquitos.....	62
Figura 5	Curvas de amplificação geradas a partir da PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene <i>18S rRNA</i> de culicídeos.	79
Figura 6	Curvas de amplificação geradas a partir da PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene <i>18S rRNA</i> de culicídeos.	84
Figura 7	Curva de dissociação originada a partir de PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene <i>18S rRNA</i> de culicídeos.	84
Figura 8	Curvas de amplificação geradas a partir da PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene <i>NS5 de Flavivirus</i>	87
Figura 9	Curva de dissociação originada a partir de PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene <i>NS5 de Flavivirus</i>	87
Figura 10	Foto de gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real que amplifica fragmento de aproximadamente 200pb do gene <i>NS5 de Flavivirus</i>	88

Figura 11	Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real que amplifica fragmento de aproximadamente 200pb do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i>	90
Figura 12	Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> realizado após alterações no tratamento das amostras com DNase (concentração e tempo de incubação da enzima dobrados).....	91
Figura 13	Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> realizado após alterações no tratamento das amostras com DNase (concentração da enzima dobrada e tempo de incubação = 37°C/4h).....	93
Figura 14	Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i>	96
Figura 15	Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos com resultado positivo na PCR em tempo real do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> das amostras de fêmeas não ingurgitadas analisadas pelo “Protocolo 2”.....	99
Figura 16	Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos da semi-nested PCR do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> das amostras de fêmeas não ingurgitadas analisadas pelo “Protocolo 2”, positivas no gel do PCR em tempo real do gene <i>NS5</i>	99

Figura 17	Mapa da cidade de São Paulo com os locais de estudo apontados por setas pretas.....	102
Figura 18	Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de aproximadamente 200 nucleotídeos de sequências do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i>	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Informações sobre trabalhos de detecção de <i>Flavivirus</i> de insetos em culicídeos de diferentes países.....	45
Quadro 2	Informação sobre os iniciadores utilizados para detecção de cDNA de <i>Flavivirus</i> e culicídeos.....	70
Quadro 3	Número de exemplares e <i>pools</i> de fêmeas não ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo categoria taxonômica e local de coleta.....	74
Quadro 4	Número de exemplares e <i>pools</i> de fêmeas não ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo os gêneros.....	75
Quadro 5	Número de exemplares de fêmeas ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo categoria taxonômica e local de coleta.....	77
Quadro 6	Número de exemplares de fêmeas ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo os gêneros.....	77
Quadro 7	Resultados da PCR do gene <i>18S rRNA</i> segundo <i>pools</i> de culicídeos, diluição do cDNA e C_T/T_m	80
Quadro 8	Resultados da reação de PCR em tempo real do gene <i>18S rRNA</i> de mosquitos a partir de <i>pools</i> de fêmeas segundo tratamento recebido.....	81
Quadro 9	Resultados da PCR do gene <i>18S rRNA</i> segundo <i>pools</i> de culicídeos e C_T/T_m	83

Quadro 10	Resultados da PCR do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> segundo <i>pools</i> de culicídeos e C_T/T_m	86
Quadro 11	Resultados da PCR do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> segundo <i>pools</i> de fêmeas ingurgitadas de culicídeos e C_T/T_m obtidos nas reações realizadas com cDNA 1:100 e cDNA 1:1.000.....	89
Quadro 12	Resultados da PCR do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> segundo amostra utilizada, diluição da amostra e C_T/T_m	92
Quadro 13	Resultado da PCR <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> segundo amostras analisadas, protocolo de tratamento das amostras após extração de ácidos nucleicos, e C_T/T_m obtidos na reação.....	95
Quadro 14	Resultado da PCR em tempo real do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i> realizado após o tratamento de <i>pools</i> de fêmeas não ingurgitadas pelo “Protocolo 2”.....	98
Quadro 15	Características dos <i>pools</i> de fêmeas não ingurgitadas em que foram detectadas sequências de RNA de <i>Flavivirus</i> . As informações aparecem segundo categoria taxonômica dos mosquitos, número de exemplares por <i>pool</i> , local e data de coleta dos mosquitos, protocolo utilizado para detecção de RNA de flavivírus e RNA viral encontrado.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEFV	<i>Aedes flavivirus</i>
AeveFV	<i>Aedes vexans flavivirus</i>
APA	Área de proteção ambiental
BHK	<i>Baby Hamster kidney</i>
C	Capsídeo
°C	Grau Celsius
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
cDNA	DNA complementar
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
CFAV	Vírus agente de fusão celular
CO ₂	Gás carbônico
COI	Citocromo C oxidase
CPE	Efeito citopático
CSA	<i>Cell silent agente</i>
C _T	Ciclo limiar
CTFV	<i>Culex theileri flavivirus</i>
CxFV	<i>Culex flavivirus</i>
<i>cytb</i>	Citocromo b
DENV	Vírus da dengue
DENV1	Vírus da dengue sorotipo 1
DENV2	Vírus da dengue sorotipo 2
DENV3	Vírus da dengue sorotipo 3
DENV 4	Vírus da dengue sorotipo 4

DEPAVE	Departamento de Parques e Áreas Verdes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Enzima que tem a capacidade de digerir DNA genômico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
E	Envelope
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
FHD	Febre hemorrágica da dengue
<i>g</i>	Gravidade terrestre
h	Hora
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ILHV	Vírus Ilhéus
<i>ITS2</i>	<i>Internal transcribed spacer 2</i>
JEV	Vírus da encefalite japonesa
KB	Células epiteliais de carcinoma oral humano
km	Quilômetro
KRV	<i>Kamiti river virus</i>
m ²	Metro quadrado
min	Minuto
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MOF	<i>Mosquito only Flavivirus</i>
NAKV	<i>Nakiwogo virus</i>
NC	Genes não codificantes

ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NS1	(Gene de) proteína não estrutural 1
NS2A	(Gene de) proteína não estrutural 2 ^a
NS2B	(Gene de) proteína não estrutural 2B
NS3	(Gene de) proteína não estrutural 3
NS4A	(Gene de) proteína não estrutural 4 ^a
NS4B	(Gene de) proteína não estrutural 4B
NS5	(Gene de) proteína não estrutural 5
nt	Nucleotídeo
NS	Genes não estruturais
ORF	Open Reading Frame
OcFV	<i>Ochlerotatus flavivirus</i>
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	<i>Palm Creek virus</i>
pmol	Picomol
prM	Pré-membrana
QBV	<i>Quang Binh virus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROCV	Vírus Rocio
rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
s	Segundo
SCD	Síndrome do choque da dengue
SCxFV	Spanish <i>Culex</i> flavivirus

SJRP	São José do Rio Preto
SLEV	Vírus da encefalite de Saint Louis
SOcFV	Spanish <i>Ochlerotatus</i> flavivirus
SYBR Green	Fluoróforo não específico que se liga às duplas cadeias de DNA alvo conforme são sintetizadas e após ser excitado, emite luz proporcional ao número de cadeias duplas.
TBEV	Vírus da encefalite transmitido por carrapato
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
USUV	Vírus Usutu
WHO	World Health Organization
WNV	Vírus do oeste do Nilo
V	Volts
Vero	Células de rim de <i>Chlorocebus</i> sp.
YFV	Vírus da febre amarela
μl	Microlitro
μM	Micromolar
18S rRNA	<i>Small subunit (18S) ribosomal RNA</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Arbovírus.....	26
1.1.1 <i>Flavivirus</i>	26
1.1.1.1 Alguns <i>Flavivirus</i> de importância médica transmitidos por mosquitos.....	28
1.1.1.1.1 Vírus da dengue (DENV).....	30
1.1.1.1.2 Vírus da febre amarela (YFV).....	31
1.1.1.1.3 Vírus Ilhéus (ILHV).....	33
1.1.1.1.4 Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV).....	34
1.1.1.1.5 Vírus Rocio (ROCV).....	37
1.1.1.1.6 Vírus do oeste do Nilo (WNV).....	40
1.1.1.2 <i>Flavivirus</i> específicos de insetos.....	41
1.2 Importância da RT-PCR na detecção de <i>Flavivirus</i> em mosquito.....	48
1.3 Mosquitos da Cidade de São Paulo.....	50
1.4 Justificativa.....	52
2 OBJETIVOS.....	54
2.1 Objetivo geral.....	54
2.2 Objetivo específico.....	54
3 MATERIAL E MÉTODO.....	55
3.1 Área de estudo.....	55
3.1.1 Parque Anhanguera.....	56
3.1.2 Parque Santo Dias.....	57
3.1.3 Parque Shangrilá.....	58
3.1.4 Parque Ibirapuera.....	58

3.1.5 Parque do Carmo.....	59
3.1.6 Parque Chico Mendes.....	59
3.1.7 Parque Alfredo Volpi.....	60
3.2 Coleta e identificação de mosquitos.....	61
3.3 Detecção de RNA de flavivírus em mosquitos.....	63
3.3.1 Protocolo1.....	63
3.3.1.1 Extração de ácidos nucleicos.....	63
3.3.1.2 Tratamento das amostras com DNase.....	64
3.3.1.3 Transcrição Reversa.....	65
3.3.1.4 PCR em tempo real do gene <i>18S rRNA</i> de culicídeos.....	65
3.3.1.5 PCR em tempo real do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i>	66
3.3.2 Protocolo 2.....	67
3.3.3 Semi-nested PCR do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i>	68
3.3.4 Purificação do Produto de PCR.....	70
3.3.5 Sequenciamento e Análises filogenéticas.....	71
4 RESULTADOS.....	73
4.1 Mosquitos.....	73
4.1.1 Fêmeas não ingurgitadas.....	73
4.1.2 Fêmeas ingurgitadas.....	76
4.2 Detecção de RNA de <i>Flavivirus</i> em mosquitos.....	78
4.2.1 Protocolo 1.....	78
4.2.1.1 Fêmeas não ingurgitadas.....	78
4.2.1.1.1 PCR em tempo real do gene <i>18S rRNA</i> de culicídeos - Testes iniciais.....	78
4.2.1.1.2 PCR em tempo real do gene <i>18S rRNA</i> de culicídeos - Resultados obtidos a partir de <i>pools</i> de mosquitos.....	82

4.2.1.1.3 PCR em tempo real do gene <i>NS5</i> de <i>Flavivirus</i>	85
4.2.1.2 Fêmeas ingurgitadas.....	88
4.2.1.2.1 Testes iniciais.....	88
4.2.2 Protocolo 2.....	94
4.2.2.1 Teste inicial.....	94
4.2.2.2 Fêmeas não ingurgitadas.....	97
4.2.2.3 Fêmeas ingurgitadas.....	100
4.3 Sequenciamento de nucleotídeos.....	100
5 DISCUSSÃO.....	105
6 CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS.....	124
ANEXO A.....	141
ANEXO B.....	143
ANEXO C.....	145
ANEXO D.....	147
ANEXO E.....	149
ANEXO F.....	151
ANEXO G.....	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

O termo “arbovírus” (do inglês, *Arthropod Borne Virus*) significa vírus transmitido por artrópode. Os culicídeos, também conhecidos como mosquitos, são os principais vetores da maioria destes vírus, embora carrapatos e outros artrópodes hematófagos também participem do ciclo de transmissão de alguns. Os principais gêneros que compõe o grupo dos arbovírus são: *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* (Karabatsos, 1985).

1.1.1 *Flavivirus*

Dos arbovírus transmitidos no Brasil, os *Flavivirus* apresentam destaque por causarem o maior número de infecções e doenças no homem e pela gravidade das doenças que provocam (Travassos da Rosa et al., 1998).

O gênero *Flavivirus* pertence à família Flaviviridae e possui mais de 70 espécies (Gubler et al., 2007; Lindenbach et al., 2007). Alguns vírus deste gênero já foram isolados no Brasil, sendo estes: Bussuquara (BUS), Cacicaporé (CPC), Dengue (DEN) sorotipos 1, 2, 3 e 4, Rocio (ROC), Iguape (IGU), Ilhéus (ILH), Febre amarela (YF) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLE) (Figueiredo, 2000).

Os *Flavivirus* são esféricos, envelopados, possuem diâmetro de 40 a 60nm e projeções na superfície do envoltório. Seu genoma de aproximadamente 11.000 nucleotídeos consiste de RNA de fita simples, não segmentado, linear e de polaridade positiva. A única Open Reading Frame (ORF) consiste de dez genes, dentre os quais, três codificam proteínas estruturais (C - capsídeo, prM – pré-membrana e E - envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A ORF é flanqueada pelas regiões não codificantes 5' e 3', de respectivamente 100nt e 400 a 700nt (Lindenbach et al., 2007; Fonseca e Figueiredo, 2005) (Figura 1).

Figura 1. Esquema do genoma de *Flavivirus*. Na figura, NC = genes não codificantes e NS = genes não estruturais. Fonte: Johnson et al., 2010 (Adaptado).

De acordo com a classificação sorológica e os resultados de estudos filogenéticos, os *Flavivirus* podem ser divididos em três grupos: os que circulam entre vertebrados, sendo transmitidos por mosquitos ou carrapatos, os que possuem hospedeiro vertebrado, mas vetor artrópode não conhecido, e aqueles não classificados, dentre os quais se encontram *Flavivirus* que replicam apenas em mosquitos e que não apresentam um hospedeiro vertebrado, sendo conhecidos como vírus específicos de insetos ou ainda *Mosquito only Flavivirus* (MOF) (ICVT, 2005; Gubler et al., 2007).

1.1.1.1 Alguns *Flavivirus* de importância médica transmitidos por mosquitos

São dois os ciclos de transmissão que ocorrem entre os *Flavivirus*. O primeiro é aquele em que o vírus circula entre mosquitos e o ser humano, como ocorre com DENV e no ciclo urbano de YFV. No outro, a transmissão se dá entre mosquitos e um hospedeiro vertebrado. Neste último caso, o homem é um hospedeiro acidental. É o que ocorre no ciclo silvestre de YFV, com o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e SLEV (Weaver e Barret, 2004; Gould e Solomon, 2008).

Entre os culicídeos, após a emergência de uma fêmea adulta, ocorre a atração para a cópula. Cumprida esta etapa e estando fecundada necessitará de repasto sanguíneo, sendo atraída para algum vertebrado. O alimento sanguíneo contém matéria e energia para seu metabolismo e maturação de seus ovários (Fotattini et al., 2002). Com os ovários desenvolvidos será estimulada para o voo de oviposição. Tendo liberado seus ovos em alguma coleção aquática estagnada, após um tempo determinado, será atraída novamente para um novo repasto de sangue, podendo repetir o ciclo de “repasto-oviposição” algumas vezes em sua vida. Nos contatos hematofágicos, caso se alimente de sangue de hospedeiro vertebrado em fase de viremia, pode tornar-se infectada por um arbovírus, dentre os quais os *Flavivirus*. Em seu corpo, as células do intestino médio tornam-se infectadas e o mesmo ocorre com outros tecidos e glândulas salivares. O período de incubação extrínseco, que transcorre no interior do mosquito até que os vírus contaminem a saliva, é de 8 a 14 dias. Após este período, a fêmea, ao realizar o repasto seguinte, pode transmitir o vírus ao homem ou a outros vertebrados, tornando-se infectante no restante de sua vida. No novo hospedeiro inicia-se o

processo de replicação viral e o vírus atinge sua corrente sanguínea, espalhando-se pelo corpo (Karabatsos, 1985; Gluber et al., 2007).

Os *Flavivirus* são veiculados principalmente entre os vertebrados por meio de vetores hematófagos, sendo este processo conhecido como transmissão horizontal. Além desta forma há a transmissão vertical, que ocorre entre os artrópodes, podendo a fêmea passar o vírus para a sua progênie. Os ovariolos podem tornar-se infectados enquanto se desenvolvem (transmissão transovariana) ou ao passarem pelo oviduto durante a oviposição. Além das referidas estratégias existe a possibilidade de ocorrer a transmissão venérea, que se dá durante o acasalamento. A transmissão vertical é interpretada como um possível mecanismo que garante a persistência de arbovírus na natureza durante períodos desfavoráveis para a transmissão horizontal, entretanto, a extensão ou o significado epidemiológico deste fenômeno tem se mantido controverso (Karabatsos, 1985; Higgs e Beaty, 2005, Gluber et al., 2007; Bolling et al., 2011; Lequime e Lambrechts, 2014).

O ser humano infectado por um *Flavivirus* pode ser assintomático, ter sintomas brandos ou quadros graves, como encefalite ou hemorragias, dependendo do vírus que estiver causando a infecção (Weaver e Barret, 2004).

Além das variações dos sinais e sintomas que podem causar, entre os *Flavivirus* de importância médica que já foram isolados no Brasil, há diferenças relacionadas às formas de transmissão e às manifestações epidemiológicas que podem ser observadas, como descrito a seguir.

1.1.1.1.1 DENV

O vírus da dengue (DENV), arbovírus de maior importância em Saúde Pública no Brasil, apresenta quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV 4), que possuem como principal vetor o *Aedes aegypti*, de habitat urbano e de hábito domiciliado (Figueiredo, 1998, 2012).

O ciclo de transmissão urbana da doença se verifica quando a fêmea de *Ae. aegypti* é infectada, ao realizar o repasto sanguíneo no homem virêmico. Após o período de incubação extrínseco, de 8 a 12 dias, por meio da transmissão horizontal, passa a veicular o vírus para outro ser humano durante um novo repasto sanguíneo (Halstead, 2007).

As infecções provocadas pelo vírus da dengue podem ser assintomáticas ou causar diferentes quadros clínicos. Anteriormente classificados como dengue clássica, febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD), tais quadros receberam nova classificação e são chamados atualmente de dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (WHO, 2009).

Mundialmente, os vírus da dengue são endêmicos nas regiões tropicais das Américas, Ásia e África. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas em 100 países apresentam risco de contrair a infecção. A cada ano há entre 50 e 100 milhões de indivíduos infectados e cerca de 20 mil mortes (Halstead, 2007; WHO, 2008; Gould e Salomon, 2008).

Algumas epidemias atribuídas à dengue foram registradas no Brasil no início do Século XX (Figueiredo, 1998), entretanto, nenhum surto foi relatado entre os anos de 1923 e 1981, possivelmente devido ao sucesso da campanha de erradicação do mosquito *Ae. aegypti*, que ocorreu durante o combate à febre

amarela (Franco, 1961, 1976). No entanto, em 1982, ocorreu um surto de DENV1 e 4 em Roraima. Desde então, outros surtos de DENV1 foram registrados no Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e em alguns Estados do Nordeste. Em 1990, um surto de DENV2 atingiu o Rio de Janeiro e posteriormente o Nordeste e Região Amazônica. Entre 1986 e 1996, casos de dengue foram reportados e DENV1 e/ou DENV2 foram isolados em todas as regiões do Brasil. Pouco tempo depois, apresentou destaque o ano de 1998, no qual 530.578 casos foram registrados. Até tal ano, apesar da maior parte de casos terem sido benignos, 795 foram notificados com FHD/SCD e a letalidade, nestes casos de apresentação mais grave, ficou em torno de 5%. Em 2000, a ausência de resultados da nova tentativa de erradicação de *Aedes aegypti*, iniciada em 1996, já era observada. DENV3 foi introduzido no Rio de Janeiro em 2001 e causou epidemias por todo o Brasil, dentre elas a ocorrida no Mato Grosso do Sul, no ano de 2007. No ano seguinte, o Rio de Janeiro sofreu epidemia causada por DENV2 e em Manaus, DENV4 foi detectado. Tal sorotipo se disseminou para outras regiões do país e vem causando epidemias (Figueiredo, 2000, 2012; Figueiredo et al., 2008). Até mesmo a cidade de São Paulo, na qual nunca haviam sido registrados mais de 6.000 casos, apresentou mais de 15.000 confirmados em 2014 (São Paulo, 2014a).

1.1.1.1.2 YFV

O YFV trata-se de arbovírus de interesse em saúde pública, que, no Brasil, apresentou ciclo urbano, mas que atualmente se restringe ao ciclo silvestre. Neste, os mais importantes hospedeiros vertebrados são os primatas não humanos e o

vetor principal é o mosquito *Haemagogus janthinomys*. O gênero *Sabethes* aparece como possível vetor secundário e o homem como hospedeiro acidental. No ciclo urbano, não ativo atualmente, o mosquito *Aedes aegypti* transmite o vírus de pessoa a pessoa (Vasconcelos, 2005).

O indivíduo infectado pode apresentar quadro assintomático ou sintomas que variam de febre aguda branda ou moderada a casos de febre hemorrágica, falência hepática, insuficiência renal e morte. O período de incubação intrínseco da doença é de 3 a 7 dias (Fonseca e Figueiredo, 1996).

O vírus, provavelmente proveniente da África, chegou ao Brasil no período colonial, tendo o ciclo silvestre sido registrado pela primeira vez somente na terceira década do século passado. Desde o século XVII, diversos surtos de febre amarela urbana foram descritos no país. No entanto, a campanha de combate ao vetor *Ae. aegypti*, que teve início em 1903, resultou na redução do número de mortes pela doença. Apesar do reaparecimento da febre amarela no Rio de Janeiro, em 1928, o emprego da vacina que usa a cepa atenuada 17DD de YFV, desenvolvida em 1937 e testada primeiramente no Brasil, mostrou excelentes resultados (Franco 1961, 1976; Figueiredo, 2000). Desta forma, o último surto urbano de febre amarela no Brasil ocorreu em 1942, na região amazônica (Degállier et al., 1986). Desde então, registrou-se ocorrência de transmissão silvestre nas regiões Norte, Centro-Oeste e no estado do Maranhão, com pequeno número de casos e eventuais epidemias. A partir de 1998, assim como o número de casos, a área de transmissão do vírus se expandiu, e este passou a circular em áreas consideradas indenes anteriormente (Vasconcelos, 2003, 2010; Vasconcelos et al., 2003). Em 2008 foram registrados óbitos em primatas não humanos e notificados casos humanos e óbitos, em São Paulo e Rio Grande do Sul (Moreno et al., 2011; Taail, 2010).

O vírus é endêmico em regiões tropicais da África e da América, sendo Bolívia, Equador, Peru, Colômbia e Brasil os países mais afetados nas Américas. Anualmente, estima-se que, em regiões tropicais da África e América Latina, cerca de 200.000 pessoas sejam infectadas pelo vírus e que 30.000 casos sejam fatais (Gardner e Ryman, 2010).

1.1.1.1.3 ILHV

O vírus Ilhéus foi isolado, pela primeira vez, em 1944, a partir de mosquitos *Aedes* sp. e *Psorophora* sp. coletados em Ilhéus, Bahia, Brasil. Na ocasião estava ocorrendo uma investigação epidemiológica devido à febre amarela (Koprowski e Hughes, 1946; Laemmert e Hughes, 1947).

Há diversos relatos do isolamento deste vírus em outros países da América Latina. Em humanos, ILHV foi isolado em Trinidad (Spence et al., 1962), Panamá (Srihongse e Johnson, 1967), Colômbia (Prías-Landínez et al., 1968), Guiana Francesa (Panon et al., 1979), Equador (Johnson et al., 2007; Manock et al., 2009) e Bolívia (Venegas et al., 2012). Em mosquitos, há relatos de isolamento em Trinidad (Aitken et al., 1956), Guatemala (Rodaniche e Galindo, 1957), Panamá (Rodaniche e Galindo, 1961) e Amazônia Peruana (Turell et al., 2005).

No Brasil, mais especificamente no Pantanal, há evidências recentes de circulação de ILHV. Anticorpos contra o vírus foram encontrados em equinos (Pauvolid-Corrêa et al., 2011) e o vírus foi isolado em *Aedes scapularis* (Pauvolid-Corrêa et al., 2013).

Um relato de importância para essa tese é o de Pereira et al. (2001). Estes autores realizaram uma pesquisa no Parque Ecológico do Tietê, localizado na periferia da cidade de São Paulo, cidade esta onde os mosquitos do presente trabalho foram coletados. Na ocasião, ILHV foi isolado de aves provenientes deste Parque. Não só aves, mas também saguis e quatis apresentaram anticorpos contra o vírus Ilhéus. Uma vez que esse local é frequentado para atividades de lazer e educação, os autores alertaram para o risco de infecção humana. Além disso, o fato do vírus ter sido detectado em ave migratória indica possibilidade de introdução do mesmo em outras áreas.

O vírus Ilhéus tem, como hospedeiros vertebrados, morcegos, aves silvestres, macacos e equinos. O vetor primário é o mosquito *Psorophora ferox*, mas *Aedes serratus* e outras espécies do gênero *Psorophora* atuam como vetores secundários. Em humanos, a infecção parece estar relacionada com a exposição a áreas silvestres e geralmente os casos são esporádicos (Travassos da Rosa et al., 1997, Vasconcelos et al., 1998).

As infecções podem ser assintomáticas, mas quando sintomáticas, as manifestações, que duram de 3 a 5 dias, são: febre, cefaleia, calafrio, fotofobia, artralgia, mialgia e astenia. Quadros de encefalite também são relatados (Pinheiro et al., 1986; Travassos da Rosa et al., 1997).

1.1.1.1.4 SLEV

O SLEV foi isolado pela primeira vez em 1933, a partir de tecido cerebral de indivíduos falecidos durante epidemia ocorrida em Saint Louis, Missouri, EUA, na

qual foram reportados cerca de 1000 casos de encefalite (Reisen et al., 2003). Atualmente, o vírus está distribuído nas Américas, do Canadá até a Argentina. Na América do Norte, aproximadamente 50 indivíduos são afetados pela doença a cada ano (Gould e Solomon, 2008).

No Brasil, o vírus foi isolado em um *pool* de mosquitos da espécie *Sabethes belisarioi*, coletados ao longo da Rodovia Belém-Brasília (Causey et al., 1964). Em 1971 e 1978, o vírus foi isolado a partir de sangue de dois pacientes da Amazônia, que apresentavam febre e icterícia (Pinheiro et al., 1981; Tsai e Mitchell, 1986). Ademais, evidências sorológicas em aves e humanos indicavam a ampla distribuição do vírus na mesma região, apesar da ausência de surtos da doença em humanos (Pinheiro et al., 1986).

Evidências recentes mostram que o vírus continua circulando no país. Em 2007, anticorpos neutralizantes contra SLEV foram encontrados em amostras de sangue de equinos sem sinais clínicos do sul do Pantanal (Pauvolid-Corrêa et al., 2010). Dois anos depois, o vírus foi isolado de amostra de cérebro de um cavalo de região rural de Minas Gerais, animal este morto após apresentar sinais neurológicos (Rosa et al., 2013).

No estado de São Paulo, o vírus foi isolado a partir de aves, roedores e camundongo sentinela entre os anos de 1967 e 1979 (de Souza Lopes et al., 1979). Há diversos relatos de detecção de anticorpos neutralizantes em humanos nas áreas em que o vírus foi isolado (de Souza Lopes et al., 1979) e no Vale do Ribeira (Iversson et al., 1981; Coimbra et al., 1997; Romano Lieber e Iversson et al., 2000). Por fim, anticorpos também foram encontrados em aves silvestres capturadas na Mata Atlântica (Ferreira et al., 1994) e Vale do Ribeira (de Souza et al., 1979). Relatos recentes também são encontrados na literatura, como descrito nos parágrafos a seguir.

Em 2004, uma paciente atendida por um hospital na cidade de São Paulo, residente nesta cidade, apresentou sintomas semelhantes aos da dengue. No entanto, a avaliação laboratorial do soro revelou infecção causada por SLEV. Nesta oportunidade, o vírus foi isolado pela primeira vez a partir do sangue de um ser humano no estado de São Paulo. Os autores concluíram que o local provável de infecção foi no município de São Pedro, onde a paciente havia estado alguns dias antes de apresentar os sintomas (Rocco et al., 2005).

Em outro estudo, amostras humanas coletadas durante uma epidemia de dengue ocorrida em São José do Rio Preto, em 2006, foram analisadas (Mondini et al., 2007a). Das cinquenta e quatro amostras analisadas por multiplex RT-PCR, utilizadas para a detecção de alguns *Flavivirus* que ocorrem no Brasil, seis foram positivas para SLEV, sendo quatro de plasma e duas de líquido. As amostras de líquido foram sequenciadas e apresentaram similaridade com uma cepa de SLEV isolada na Argentina. Esse estudo mostrou a ocorrência de um surto simultâneo de SLEV e DENV3 em uma área urbana no estado de São Paulo. Na mesma cidade, presença simultânea de SLEV e DENV3 foi detectada por meio de PCR e sequenciamento em soro de fase aguda de paciente com suspeita de dengue (Mondini et al., 2007b).

Por fim, em abril de 2008, um homem de 74 anos residente em Ribeirão Preto teve o diagnóstico clínico de dengue. O paciente não havia se ausentado da localidade em que residia nos 15 dias anteriores ao aparecimento dos sintomas. Anticorpos das classes IgG e IgM anti DENV foram detectados no soro do paciente por ELISA. No entanto, a pesquisa do antígeno NS1 e a RT-PCR apresentaram resultado negativo para tal vírus. A pesquisa de outros *Flavivirus* foi realizada por meio de ELISA, teste de neutralização em camundongos e RT-PCR seguida de sequenciamento e a infecção por SLEV foi confirmada (Maia et al., 2014).

Acredita-se que aves silvestres e mosquitos do gênero *Culex* estejam envolvidos no ciclo de transmissão deste vírus, como hospedeiros reservatórios e vetores, respectivamente. O homem e outros mamíferos são considerados hospedeiros acidentais (Reisen et al., 2003, Gubler et al., 2007).

As infecções podem originar quadros assintomáticos ou ainda: febre, cefaleia, mialgia, náuseas, vômitos e sonolência. Em casos mais graves, que geralmente aparecem em pessoas com mais de 60 anos ou imunodeprimidos, sinais neurológicos focais e encefalite podem se manifestar, sendo a letalidade de 7 a 24% (Tsai e Mitchell, 1986; Reina, 2006).

1.1.1.1.5 ROCV

No período de 1975 a 1978 ocorreu uma epidemia de encefalite humana, que se iniciou na Baixada Santista e disseminou-se para o Vale do Ribeira, estado de São Paulo. Acredita-se que já haviam ocorrido casos da doença na região nos anos de 1973 e 1974 e que não foram diagnosticados, pois se tratava de doença desconhecida até então (Tibira, 1975; Iversson, 1980).

Durante a epidemia, um *Flavivirus* ainda não conhecido foi isolado de tecido do sistema nervoso central de nove casos fatais e de um camundongo sentinela. Tal vírus ficou conhecido por Rocio e foi incriminado como o agente etiológico responsável pela epidemia (Lopes et al., 1978).

A participação das aves no ciclo de transmissão do vírus foi sugerida após o isolamento do mesmo a partir de uma ave silvestre, *Zenotrichia capensis* (Lopes et

al., 1978). Além disso, anticorpos contra ROCV foram encontrados em aves silvestres (Ferreira et al., 1994).

O isolamento do vírus a partir de um *pool* de mosquitos da espécie *Psorophora ferox* apontou a mesma como possível vetora de ROCV (Lopes et al., 1981). Além deste encontro, estudos de ecologia de culicídeos sugeriram que *Aedes scapularis* teria atuado como vetor deste arbovírus (Forattini et al., 1978a, b, 1995).

Nos anos da epidemia foram reportados 1.021 casos, cerca de 100 mortes e 200 sobreviventes apresentaram sequela (Tiriba et al., 1976; Iversson, 1988, Iversson e Tiriba, 1991). A partir de 1978, os casos de encefalite diminuíram e na época, acreditava-se que a doença permaneceria endêmica nos anos seguintes (Iversson, 1980).

Após o período epidêmico, alguns estudos soroepidemiológicos foram realizados na região do Vale do Ribeira. Em todos estes estudos, os autores identificaram baixa proporção de indivíduos com anticorpos contra o arbovírus Rocio, sendo maior a proporção de pessoas com anticorpos contra outros arbovírus. Por esta razão, os autores concluíram que outros arbovírus teriam circulado anteriormente nesta localidade, sem terem sido diagnosticados e que provavelmente alguns dos casos epidêmicos de encefalite supostamente causados por ROCV teriam ocorrido devido a estes outros arbovírus, como Saint Louis e o Vírus da Encefalite Equina do Leste (Iversson et al., 1980, 1981 e 1982).

Com base nos resultados de tais estudos, Iversson et al. (1982) não associaram o término da epidemia ao esgotamento de indivíduos suscetíveis na população humana. Estes autores comentaram que, na época dos picos epidêmicos, foi realizado o controle vetorial, representado pelas ações contra as formas imaturas e adultas de mosquitos. Estas intervenções foram feitas no meio

urbano, acrescidas de aplicações contra os mosquitos adultos nas residências com registros de caso na zona rural; de tal forma que admitiram a possibilidade de ter havido algum efeito, impedindo maior disseminação da doença.

No esforço para se conhecer os determinantes que atuaram na emergência desta nova doença, passaram a indagar sobre a existência de mecanismos, tais como alterações no clima e na cobertura da vegetação, que pudessem ter interferido nos vetores e reservatórios do vírus. Comentaram ainda que também não havia informações sobre mudanças na virulência e no neurotropismo do vírus. Assim, o fim da epidemia deixou muitas questões sem respostas.

A partir de 1980, não ocorreram novos diagnósticos de casos da doença. No entanto, novas evidências de atividade de ROCV pelo país foram relatadas. Anticorpos contra o vírus Rocio foram encontrados em soro humano de residentes do Vale do Ribeira (Iversson et al., 1989; Romano-Lieber e Iversson, 2000), de Ribeirão Preto (Figueiredo, 1985) e da Bahia (Tavares-Neto et al., 1986; Straatmann et al., 1997).

Indivíduos infectados e que desenvolvem o quadro clínico apresentam sintomas como febre elevada (de início súbito), cefaléia, anorexia, náuseas, vômito e mialgia. O agravamento pela encefalite aparece mais tarde, junto a outros sintomas, tais como: convulsões, distúrbios dos reflexos superficiais, flacidez motora, irritação meníngea e síndrome cerebelar. Distensão abdominal e retenção urinária também podem aparecer em alguns casos. Segundo assinalaram Travassos da Rosa et al., 1998, a doença pode ocasionar sequelas neurológicas irreversíveis.

1.1.1.1.6 WNV

West Nile virus ou vírus do Oeste do Nilo foi isolado pela primeira vez em 1937, do sangue de uma mulher, nas margens ocidentais do Rio Nilo, em Uganda (Smithburn et al., 1940).

Nas Américas, o primeiro relato de isolamento ocorreu em Nova Iorque. Em agosto de 1999, epidemia de uma doença que causava febre e até mesmo encefalite ocorreu na cidade (Nash et al., 2001). Nos meses anteriores, havia relatos de encefalite viral circulando em aves de um zoológico da cidade e, semanas antes dos primeiros casos humanos, alto número de morte de corvos havia sido registrado. Na ocasião, suspeitou-se que poderia se tratar de SLEV, no entanto, estudos revelaram que o agente etiológico era WNV (Komar, 2000).

A partir de então, o vírus, que possui aves como hospedeiros reservatórios e mosquitos do gênero *Culex* como vetores, disseminou-se rapidamente para outras regiões da América (Hayes e Gubler, 2006). Na América do Sul há evidências sorológicas de circulação de WNV em aves de Trinidad e Argentina (Komar e Clark, 2006; Diaz et al., 2008) e em cavalos da Colômbia, Venezuela e Argentina (Mattar et al., 2005; Bosch et al., 2007; Diaz et al., 2008).

No Brasil, também há indícios recentes de circulação do vírus (Pauvolid-Corrêa et al., 2011; Melandri et al., 2012; Ometto et al., 2013), embora este não tenha sido isolado.

Os indivíduos infectados desenvolvem, na maior parte dos casos, quadros assintomáticos e 20 a 30% apresentam febre. A cada 200 indivíduos infectados, um apresenta envolvimento do sistema nervoso central e a cada 1000, há um caso de encefalite fatal. A forma grave da doença geralmente aparece em indivíduos

imunocomprometidos ou com mais de 50 anos. O período de incubação varia de 2 a 14 dias (CDC, 2004; Chancey et al., 2015).

Entre humanos a transmissão também pode ocorrer por transplante de órgãos, transfusões sanguíneas e aleitamento materno (Gould e Solomon, 2008).

1.1.1.2 *Flavivirus* específicos de insetos

Em 1975, Stollar e Thomas relataram a existência de um agente presente em uma linhagem de células de *Ae. aegypti* (Peleg) que causava fusão em células de *Ae. albopictus*. Na ocasião, observou-se que o agente não provocava efeito citopático (CPE) em células de *Aedes aegypti*, embora pudesse replicar nelas. Em células de mamíferos (BHK, Vero e KB) não foi detectada replicação do agente. No referido estudo, não foi realizada identificação precisa do vírus, porém algumas características (tamanho, estrutura e padrão da curva de crescimento) indicavam tratar-se de um *Flavivirus*, que ficou conhecido como agente de fusão celular (CFA) (Stollar e Thomas, 1975).

Anos mais tarde, o sequenciamento completo dos nucleotídeos de CFA foi realizado. No estudo observou-se que o genoma deste vírus era semelhante ao dos demais *Flavivirus*. Apesar das proteínas estruturais do agente em questão apresentarem baixa identidade com as dos outros *Flavivirus*, o mesmo não foi observado entre as proteínas não estruturais (NS3 e NS5), as quais apresentaram alta identidade com as de outros membros do gênero. Os autores sugeriram tratar-se de um vírus específico de inseto, presente em embriões a partir dos quais a

linhagem de células de *Ae. aegypti* foi estabelecida. Este foi o primeiro MOF a ser isolado (Cammisa-Parks et al., 1992).

Posteriormente, CFAV foi encontrado infectando naturalmente os mosquitos *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex sp.* de Porto Rico (Cook et al., 2006) e *Ae. aegypti* de Bangkok, Tailândia (Kihara et al., 2007) (Quadro 1).

Em 1999, larvas e pupas de mosquitos foram coletadas em criadouros na periferia de uma cidade em expansão no Quênia. Os 3.659 adultos oriundos das formas imaturas foram agrupados em 120 *pools* segundo espécie e local de coleta. O isolamento viral ocorreu a partir do macerado de dois *pools* de *Aedes macintoshi*, que foram inoculados em cultura de células C6/36. Nestas células foi possível observar efeito citopático. No entanto, CPE não foi detectado nas células Vero em que os macerados foram inoculados. Os autores também não observaram sinais de doença em camundongos recém-nascidos, após a inoculação do sobrenadante de cultura nos mesmos. Extração de RNA viral a partir do sobrenadante de cultura das células C6/36 foi realizada e seguida de RT-PCR para *Flavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*, porém só ocorreu amplificação quando os iniciadores de *Flavivirus* foram utilizados. Os fragmentos de cerca de 850 pb amplificados foram sequenciados e apresentaram diferença de apenas dois nucleotídeos entre si. Não houve diferença entre os aminoácidos. A homologia entre estas sequências e uma sequência de CFAV do GenBank foi de 81%. O teste de neutralização com redução em placa mostrou evidências de que o vírus em questão era um novo MOF, nomeado *Kamiti River Virus* (KRV) (Sang et al., 2003). Este foi o primeiro isolamento de um vírus próximo a CFAV em mosquitos coletados no campo, o que indica a presença de vírus desse grupo na natureza.

Crabtree et al. (2003) realizaram a caracterização fenotípica e genotípica de KRV. Observaram que KRV replicou-se e causou CPE em células C6/36 de *Aedes*

albopictus, assim como CFAV, porém não ocorreu a formação de sincício. O agente também foi capaz de replicar em células de *Aedes aegypti* e *Aedes pseudoscutellaris*, porém sem causar CPE. Em relação ao genoma, observou-se que o tamanho e a organização eram semelhantes aos de outros *Flavivirus*. A comparação da sequência de nucleotídeos mostrou baixa identidade com sequências de outros *Flavivirus*, sendo a maior identidade com CFAV.

Entre os anos de 2003 e 2004, culicídeos foram coletados em seis regiões do Japão e uma da Indonésia. Mosquitos de cada região foram separados em *pools* segundo espécie e os respectivos macerados foram inoculados em cultura de diferentes linhagens de células. Observou-se CPE moderado em algumas culturas de células C6/36. Não houve CPE em células de mamíferos (Vero e BHK-21). Partículas de 50nm de diâmetro semelhantes à *Flavivirus* foram observadas por microscopia eletrônica em células infectadas. O resultado da RT-PCR com iniciadores de *Flavivirus* (NS3 e NS5) foi positivo apenas quando a reação foi realizada a partir do sobrenadante de cultura de células infectadas de *Aedes albopictus*, sendo negativo quando o sobrenadante da cultura de células de mamíferos foi utilizado. A análise das sequências amplificadas revelou homologia com sequências de CFAV e KRV. Assim, o vírus foi nomeado CxFV, uma vez que foi isolado a partir de 7 *pools* de *Cx. pipiens* e de um de *Cx. tritaeniorhynchus*, provenientes do Japão, e de um *pool* de *Cx. quinquefasciatus* da Indonésia. O genoma completo do vírus foi sequenciado e observou-se que era característico de *Flavivirus*. Análise filogenética mostrou que CxFV agrupa-se com CFAV e KRV. Estes dados sugeriram ser este um novo MOF, possivelmente relacionado aos mosquitos *Culex* (Hoshino et al., 2007).

Nos anos seguintes, CxFV foi encontrado infectando naturalmente culicídeos de várias regiões do mundo. O vírus foi isolado ou detectado em

mosquitos da Guatemala (Morales-Betoulle et al. 2008), México (Farfan Ale et al., 2009, Saiyasombat et al., 2010), EUA (Kim et al., 2009, Blitvich et al., 2009), Trinidad (Kim et al., 2009), Uganda (Cook et al., 2009) e São José do Rio Preto, SP, Brasil (Machado et al., 2012) (Quadro 1).

Outro vírus foi isolado a partir de homogeneizados de *Ae. albopictus* e *Ae. flavopictus* coletados em quatro localidades do Japão e uma da Indonésia. Assim como os demais vírus mencionados nos parágrafos anteriores, este também replicou apenas em células de mosquitos, nas quais causou CPE brando. Em células de mamíferos (Vero e BHK-21) não foi observada replicação. O genoma característico de *Flavivirus* e o resultado da análise filogenética, que agrupou este vírus com KRV e CFAV, indicaram tratar-se de um novo *Flavivirus* de inseto associado à *Aedes*, nomeado *Aedes flavivirus* (AEFV) (Hoshino et al., 2009). Anos mais tarde este vírus foi encontrado na Itália (Calzolari et al., 2010a e b, Calzolari et al., 2012 e Rizzo et al., 2014).

Quadro 1. Informações sobre trabalhos de detecção de *Flavivirus* específicos de insetos em culicídeos de diferentes países.

<i>Flavivirus</i>	Local de detecção/ isolamento	Ano	Mosquito hospedeiro	Autor
CFAV	Porto Rico	2002	<i>Aedes aegypti</i> <i>Ae. albopictus</i> <i>Culex</i> sp.	Cook et al., 2006
	Tailândia (Bangkok)	2006	<i>Ae. aegypti</i>	Kihara et al., 2007
KRV	Quênia	1999	<i>Ae. macintoshi</i>	Sang et al., 2003
CxFV	Japão	2003 e 2004	<i>Cx. pipiens</i>	Hoshino et al., 2007
	Indonésia		<i>Cx. tritaeniorhynchus</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i>	
	Guatemala	2006	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Morales-Betoulle et al., 2008
	México	2007	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Farfan-Ale et al., 2009
	EUA (Texas)	2008	<i>Cx. restuans</i>	Kim et al., 2009
	EUA (Texas)		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	
	Trinidad		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	
	EUA (Iowa)	2007	<i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. tarsalis</i>	Blitvich et al., 2009
	Uganda	2008	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Cook et al., 2009
	México	2008	<i>Cx. interrogator</i>	Saiyasombat et al., 2010
	SJRP (SP)	2007 e 2008	<i>Culex</i> sp.	Machado et al., 2012
QBV	Vietnam	2002	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Crabtree et al., 2009
NAKV	Uganda	2008	<i>Mansonia africana nigerrima</i>	Cook et al., 2009
AEFV	Japão	2003 e 2004	<i>Ae. albopictus</i> <i>Ae. flavopictus</i>	Hoshino et al., 2009

Continua

Quadro 1. Informações sobre trabalhos de detecção de *Flavivirus* específicos de insetos em culicídeos de diferentes países.

Continuação

<i>Flavivirus</i>	Local de detecção/ isolamento	Ano	Mosquito hospedeiro	Autor
AEFV*	Itália	2007 e 2008	<i>Ae. albopictus</i>	Calzolari et al., 2010a
	Itália	2009	<i>Ae. albopictus</i>	Calzolari et al., 2010b
AEFV	Itália	2011 e 2012	<i>Ae. albopictus</i>	Rizzo et al., 2014
OcFV*	Itália	2007 e 2008	<i>Ae. caspius</i>	Calzolari et al., 2010a
	Itália	2009	<i>Ae. caspius/Cx. pipiens</i>	Calzolari et al., 2010b
AeveFV*	Itália	2007 e 2008	<i>Ae. vexans</i>	Calzolari et al., 2010a
MOF	Canadá	2003 a 2005	Principalmente <i>Cx. tarsalis</i>	Pabbaraju et al., 2009
	Espanha	2001 a 2005	<i>Cx. theileri</i> <i>Ochlerotatus caspius</i> <i>Ae. vexans</i> <i>Cx. pipiens</i> outros	Aranda et al., 2009.
PCV	Austrália	2010	<i>Coquillettidia xanthogaster</i>	Hobson-Peters et al., 2013
SOcFV	Espanha	2001 a 2007	<i>Oc. caspius</i>	Vázquez et al., 2012
SCxFV	Espanha	2001 a 2007	<i>Cx. pipiens</i> <i>Cx. theileri</i>	Vázquez et al., 2012
CTFV	Portugal	2009 e 2010	<i>Cx. theileri</i>	Parreira et al., 2012

No quadro, * = nomenclatura adotada posteriormente em trabalho de revisão (Calzolari et al., 2012), QBV = *Quang Binh virus*, NAKV = *Nakiwogo virus*, OcFV = *Ochlerotatus flavivirus*, AeveFV = *Aedes vexans flavivirus*, MOF = *mosquito only flavivirus*, PCV = *Palm Creek virus*, SOcFV = *Spanish Ochlerotatus flavivirus*, SCxFV = *Spanish Culex flavivirus*, CTFV = *Culex theileri flavivirus*.

Nos estudos em que CxFV foi detectado, análises filogenéticas do vírus foram realizadas a partir do genoma completo, do gene da proteína E ou de fragmentos do gene *NS5*. Em alguns casos, mais de uma destas estratégias foi utilizada. Em análises de diferentes estudos, CxFV foi agrupado em um mesmo clado com os demais *Flavivirus* de insetos, CFAV e KRV (Farfan Ale et al., 2009; Blitvich et al., 2009; Machado et al., 2012). Com base nos dados obtidos, acredita-se que sejam três espécies diferentes, uma vez que a distância genética entre tais vírus é semelhante à encontrada entre outras espécies de *Flavivirus* (Kim et al., 2009).

Dentre os isolados de CxFV, agrupam-se em um clado (apresentam maior identidade) aqueles do Japão, Indonésia e EUA. Em outro clado ficam os isolados de Trinidad, Guatemala, México, Uganda e Brasil (Kim et al., 2009; Blitvich et al., 2009; Cook et al., 2009; Machado et al., 2012). Para alguns autores, estes dois grupos podem representar dois genótipos de CxFV. No entanto, para que isso seja confirmado, cepas de CxFV de outras localidades devem ser identificadas e analisadas (Kim et al., 2009).

Outros *Flavivirus* que replicaram apenas em células de mosquitos e agruparam-se, após análises filogenéticas, com aqueles específicos de insetos foram descobertos recentemente. Tais vírus e os respectivos locais de isolamento dos mesmos são: *Quang Binh virus* (QBV) no Vietnã (Crabtree et al., 2009), *Nakiwogo virus* (NAKV) em Uganda (Cook et al., 2009), *Ochlerotatus flavivirus* (OcfV) (Calzolari et al., 2010a, b) e *Aedes vexans flavivirus* (AeveFV) (Calzolari et al., 2010 a) na Itália, *Calbertado virus* (CLBOV) nos EUA e Canadá (Bolling et al., 2011), *Spanish Ochlerotatus flavivirus* (SOcfV) e *Spanish Culex flavivirus* (SCxFV) na Espanha (Vázquez et al., 2012), *Culex theileri flavivirus* (CTFV) em Portugal

(Parreira et al., 2012) e *Palm Creek virus* (PCV) na Austrália (Hobson-Peters et al., 2013).

Além dos *Flavivirus* específicos de insetos, há também relato de sequência de DNA relacionada à CFAV integrada ao genoma de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* coletados em campo e mantidos em laboratório (Crochu et al., 2004). O fragmento ficou conhecido como CSA (*Cell Silent Agent*). Os autores sugeriram que esta integração teria ocorrido após infecção de mosquito por um *Flavivirus* ainda não conhecido, relacionado à CFAV. Outro relato semelhante foi o de Roiz et al., 2009. Estes autores encontraram sequência integrada de *Flavivirus* específico de inseto no genoma de *Aedes albopictus* coletado no norte da Itália. A sequência apresentou relação mais próxima com KRV e CFAV (do que com CxFV).

Em relação à forma de transmissão destes *Flavivirus*, alguns autores sugerem a hipótese de transmissão vertical na natureza, uma vez que estes vírus foram detectados em mosquitos machos e fêmeas naturalmente infectados (Cook et al., 2006; Hoshino et al., 2007, 2009; Farfan Ale et al., 2009) ou oriundos de larvas e pupas coletados no campo (Sang et al., 2003).

1.2 Importância da RT-PCR na detecção de *Flavivirus* em mosquitos

Atualmente, há na literatura diversos relatos de pesquisa de *Flavivirus* em mosquitos. Com o objetivo de realizar vigilância de arbovírus circulantes em determinada região ou simplesmente conhecer a distribuição e biodiversidade de tais vírus, bem como de seus vetores, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) vem se tornando a abordagem mais empregada

(Moureau et al., 2007; Cook et al., 2009; Machado et al., 2012; Calzolari et al., 2010, 2012).

Trata-se de uma técnica sensível, específica e que não necessita de cultura do vírus para ser realizada (Howe et al., 1992; Kramer et al., 2002; Liu et al., 2011). Tal técnica, quando seguida por sequenciamento de nucleotídeos, pode ser empregada na detecção de vírus novos, pois permite a comparação de sequências de nucleotídeos obtidas a partir de amostras com aquelas de referência do GenBank (Cook et al., 2006; Johnson et al., 2010; Pabbaraju et al., 2009).

O crescente número de relatos dos *Flavivirus* específicos de insetos é um exemplo da importância desta técnica na detecção de vírus novos. Por serem vírus que não replicam em células de mamíferos e que podem causar CPE brando ou ausente em linhagens de células de mosquitos, acredita-se que não tenham sido percebidos em muitas pesquisas em que apenas o isolamento viral foi empregado (Morales-Betoulle et al., 2008; Blitvich et al., 2009). No entanto, com o amplo emprego da RT-PCR, o grande número de relato destes vírus mostra o sucesso da técnica.

Um gene frequentemente escolhido como alvo para amplificação é o *NS5*. Trata-se de um gene envolvido na replicação viral e que apresenta a vantagem de ter regiões altamente conservadas. Assim, com o uso de iniciadores degenerados é possível aumentar o número de *Flavivirus* detectados (Moureau et al., 2007; Cook et al., 2009; Johnson et al., 2010; Machado et al., 2012; Liu et al., 2011).

1.3 Mosquitos da Cidade de São Paulo

Mosquitos (Diptera: Culicidae) são insetos de distribuição mundial que apresentam importância em Saúde Pública por serem vetores de agentes causadores de parasitoses e viroses (Forattini, 2002).

Na cidade de São Paulo há um número reduzido de relatos sobre a fauna de mosquitos existentes nesta grande malha urbana.

Três estudos foram realizados no Parque Ecológico do Tietê, localizado na periferia de tal cidade. No estudo de Urbinatti et al. (2001), 9.065 culicídeos foram coletados. A espécie mais abundante foi *Cx. quinquefasciatus*, seguida por outras espécies do gênero. Em outro estudo, as espécies *Ae. scapularis*, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. declarator* foram as mais frequentes e abundantes dentre os 53.496 exemplares coletados (Taípe-Lagos e Natal, 2003). Por fim, 8.298 mosquitos da espécie *Cx. quinquefasciatus* foram coletados no estudo de Laporta et al. (2006).

No Parque Estadual da Cantareira, localizado em outra região periférica da cidade, 2.219 mosquitos foram coletados e agrupados em 11 gêneros e 21 categorias taxonômicas (Montes, 2005). Os gêneros *Culex* e *Aedes* estavam presentes. Embora a presença de *Cx. quinquefasciatus* não tenha sido registrada, outras espécies do gênero ocorreram, tais quais *Cx. chidesteri*, *Cx. declarator* e *Cx. nigripalpus*. Dos exemplares de *Aedes*, *Ae. fluviatilis*, *Ae. albopictus* e *Ae. scapularis*, dentre outras, foram documentadas.

Em um estudo sobre a distribuição de *Cx. quinquefasciatus* nas margens do rio Pinheiros, situado na cidade de São Paulo, 35.684 adultos foram obtidos, sendo a espécie em questão exclusiva (Morais et al., 2006). A redução da diversidade

local restando apenas uma espécie foi explicada por ser este culicídeo extremamente adaptado às águas poluídas deste rio que serve como canal receptor de descargas de esgotos.

Há também o registro de fauna de culicídeos em dois reservatórios de contenção de cheias, conhecidos como “piscinões”, localizados no meio urbano da Zona Leste de São Paulo. Dos 8.917 exemplares coletados, *Cx. quinquefasciatus* foi a espécie mais frequente e representou 98,9% dos mosquitos de uma das áreas estudadas e 95,2% dos da outra área (Silvério e Urbinati, 2011). A dominância de *Culex quinquefasciatus* foi interpretada em função do elevado grau de poluentes presentes nos ambientes aquáticos destes reservatórios.

Recente estudo de biodiversidade de culicídeos em parques municipais da cidade de São Paulo, do qual o presente trabalho foi um subprojeto, confirmou os relatos anteriores de presença dos gêneros *Culex* e *Aedes* como táxons dominantes no meio urbano. Numa fase inicial, realizada entre 2010 e 2011, coletou-se 7.015 mosquitos imaturos e adultos de 59 parques das regiões sul, norte, centro-oeste e leste da cidade. Dos mosquitos coletados, identificou-se presença de 12 gêneros e 53 categorias taxonômicas. *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. (Cux.) sp.*, *Cx. declarator* e *Aedes fluviatilis* foram as categorias taxonômicas mais abundantes, representando 23,75%, 15,21%, 13,86% e 10,14%, respectivamente, do número total de exemplares coletados (Medeiros-Sousa et al., 2013). Em um segundo momento, entre os anos de 2011 e 2013, dez destes parques foram selecionados e acompanhados pelo período de um ano. Entre os exemplares de *Culex*, as espécies mais abundantes foram *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*, enquanto em *Aedes*, *Ae. albopictus*, *Ae. scapularis* e *Ae. fluviatilis* (Medeiros-Sousa, 2014). Fato importante é que parte das fêmeas ingurgitadas deste último período foi submetida ao estudo de preferência alimentar, que permitiu concluir que

tais fêmeas apresentaram característica oportunista de hematofagia. Tal conclusão ocorreu uma vez que sangue de aves, cães, roedores, humanos e primatas não humanos foi detectado nos exemplares analisados. No entanto, não foi observada associação entre espécie de mosquitos e fonte de alimentação (Carvalho et al., 2014).

Apesar de existir pouca informação a respeito da fauna de culicídeos na cidade de São Paulo, observa-se que espécies capazes de transmitir vírus que potencialmente causam doença no homem estão presentes e alcançam abundância relativamente elevada entre uma fauna mais complexa.

1.4 Justificativa

A cidade de São Paulo possui mais de onze milhões de habitantes e está inserida em uma área maior altamente urbanizada conhecida como a grande São Paulo. Nesta cidade, as áreas verdes, representadas por parques municipais, são os últimos refúgios para a proteção e conservação da biodiversidade. Em tais locais a paisagem apresenta-se de forma diversa, sendo usualmente composta por resíduos de matas nativas, bosques artificiais, jardins, lagos, construções e vias de acesso. Quanto à fauna pode haver aves domésticas ou silvestres, e, dentre estas, algumas delas migratórias. Há também a presença de anfíbios, répteis e mamíferos. Animais domésticos, como cães e gatos, são frequentemente vistos, além de outros animais estando os roedores entre os principais. Estes locais são frequentados pela população para atividades de lazer e podem servir de refúgio para mosquitos que infestam a área urbana (Whately et al., 2008).

Devido à inerente complexidade pode-se inferir que as áreas categorizadas como parques urbanos reúnem as condições necessárias para a circulação de *Flavivirus*, sendo estas: presença de vertebrados (reservatórios amplificadores destes vírus, bem como o ser humano), existência de mosquitos vetores e de coleções hídricas onde se desenvolvem as formas imaturas destes dípteros.

Trabalhos recentes mostram que espécies de mosquitos conhecidas como vetoras de *Flavivirus* ocorrem nestas áreas (Medeiros-Sousa et al., 2013; Medeiros-Sousa, 2014) e que as fêmeas ingurgitadas apresentam perfil alimentar oportunista (Carvalho et al., 2014), o que pode favorecer a transmissão de tais vírus na localidade em questão. No entanto, ainda não há informação sobre a infecção de *Flavivirus* em mosquitos nestas áreas.

Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir com o conhecimento sobre existência, distribuição e frequência de *Flavivirus* em mosquitos na cidade de São Paulo, levantando dados epidemiológicos que auxiliem na prevenção de possível transmissão destes vírus para o homem.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar presença de *Flavivirus* em mosquitos (Diptera: Culicidae) provenientes de áreas verdes da cidade de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estabelecer um método prático para vigilância de *Flavivirus* em mosquitos.

2.2.2 Detectar *Flavivirus* de importância médica nos mosquitos analisados.

2.2.3 Detectar *Flavivirus* não conhecidos ou pouco comuns em mosquitos.

2.2.4 Conhecer a diversidade genética dos *Flavivirus* encontrados nos vetores culicídeos.

3 MATERIAL E MÉTODO

O presente trabalho foi parte do Projeto “Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques municipais da cidade de São Paulo”, financiado pela FAPESP (Processo 2010/51230-8) e coordenado pelo Prof. Mauro Toledo Marrelli do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.

3.1 Área de estudo

O trabalho envolveu a coleta de mosquitos (Diptera: Culicidae) em sete Parques municipais de diferentes regiões da cidade de São Paulo (Figura 2), sendo eles: Anhanguera, Santo Dias, Shangrilá, Ibirapuera, do Carmo, Chico Mendes e Alfredo Volpi. A seguir, encontra-se a descrição de cada um destes Parques.

Figura 2. Mapa da cidade de São Paulo com setas indicando a localização dos sete parques municipais selecionados para o presente trabalho. Fonte: São Paulo, 2007 (Adaptado).

3.1.1 Parque Anhanguera

Com 9.500.000m² de área, situa-se entre os quilômetros 25 e 29 da Rodovia Anhanguera, tendo como limites os municípios de Cajamar e Caieiras. A vegetação

atual é composta de eucaliptos, que ocupam 39% da área, *Pinus* sp. e espécies nativas que formam um sub-bosque sob os eucaliptos. O Parque encontra-se próximo a duas zonas núcleos da Reserva da Biosfera do Cinturão Verde do Estado de São Paulo, a Serra da Cantareira, distando 5 km, e a Serra do Japi, distando 20 km. A fauna consiste em 230 espécies de vertebrados relatadas, das quais 146 são aves. O Parque Anhanguera abriga o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (São Paulo, 2007; São Paulo, 2014b). Fotos do Parque podem ser visualizadas no Anexo A.

3.1.2 Parque Santo Dias

Com área de 134.000m², abriga remanescentes de mata do cinturão verde ao redor de São Paulo. A topografia é de acentuada declividade, recoberta por mata, e uma clareira central, com revestimento de capoeira baixa (área de 17.500m²). O Parque faz divisa com conjuntos habitacionais (Cohab), a Indústria Superbom, do Instituto Adventista de Ensino, e um córrego. Em inventário, 154 espécies de plantas vasculares arbóreo-arbustivas foram registradas. As famílias com maior número de espécies encontradas foram Fabaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Melastomataceae. Abrigando uma nascente em suas dependências, o parque relata 84 espécies de vertebrados, dentre as quais 75 são aves (São Paulo, 2007; São Paulo, 2014b). Fotos do Parque podem ser visualizadas no Anexo B.

3.1.3 Parque Shangrilá

Implantado próximo a Represa Billings, o Parque fica dentro da Área de Proteção Ambiental Bororé-Colônia. A vegetação é composta por áreas ajardinadas e eucaliptal com sub-bosque onde foi realizado plantio de mudas de árvores. A fauna é heterogênea, composta de 109 espécies, distribuídas entre invertebrados (mosquitos, borboletas e aranha), anuros, répteis, marsupiais, primatas e 90 espécies de aves. Ressalta-se a presença de frugívoros de grande porte como o jacuaçu e tucano-de-bico preto, que participam da dispersão de sementes, além de abrigar espécies endêmicas da Mata Atlântica (São Paulo, 2007; São Paulo, 2014b). Fotos do Parque podem ser visualizadas no Anexo C.

3.1.4 Parque Ibirapuera

O Parque ocupa 1.584.000m², e a área dos quatro lagos interligados corresponde a aproximadamente 157.000m² (CPHN, 1985-88). Apresenta diversos tipos de vegetação, como bosque de eucaliptos, bosques plantados de espécies nativas e exóticas, áreas gramadas e jardins. Ressalta-se que este é o principal parque da cidade recebendo em média um milhão de visitantes por mês. Em relação à fauna, 183 espécies de vertebrados foram relatadas no parque (São Paulo, 2007; São Paulo, 2014b). Fotos do Parque podem ser visualizadas no Anexo D.

3.1.5 Parque do Carmo

Inaugurado em setembro de 1976, foi instalado nas antigas terras desapropriadas da Fazenda do Carmo, ocupando uma área de 1.500.359 m². Na área do Parque as inúmeras nascentes foram represadas, formando um grande lago, com 15.000 m² de superfície. Predominam áreas gramadas nas vertentes e na beira do lago e capoeiras ao longo das linhas de drenagem, destacando-se tapiás (*Alchornea* spp.), embaúbas (*Cecropia* spp.), camboatás (*Cupania* spp.), manacás-da-serra (*Tibouchina* spp.), paus-jacarés (*Piptadenia gonoacantha*), angicos, além de Fabaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae e Apocynaceae. Há também trechos ocupados por reflorestamento de eucaliptos e cerejeiras floríferas. Sobre a fauna existente no parque, foram relatadas 135 espécies de vertebrados (São Paulo, 2007; São Paulo, 2014b). Fotos do Parque podem ser visualizadas no Anexo E.

3.1.6 Parque Chico Mendes

O Parque possui 61.667,5m², com topografia acidentada (desnível de 8%), abrigando um vale, um córrego e um pequeno lago. Um bosque de eucaliptos, maciço de frutíferas e ornamentais foram plantados pelos antigos proprietários. A área verde ocupa cerca de 80% do terreno. A fauna foi relatada com 26 espécies de vertebrados (São Paulo, 2007; São Paulo, 2014b). Fotos do Parque podem ser visualizadas no Anexo F.

3.1.7 Parque Alfredo Volpi

Ocupa a área de 142.400m². É um remanescente da área verde de Mata Atlântica. Apresenta relevo de declividade acentuada formando um pequeno vale, onde existem pequenos lagos e uma nascente. Toda área é recoberta por denso bosque implantado e áreas ajardinadas. A fauna existente no parque foi relatada em 110 espécies de vertebrados (São Paulo, 2007; São Paulo, 2014 b). Fotos do Parque podem ser visualizadas no Anexo G.

Na Figura 3, é possível observar imagens de satélite que mostram as áreas dos sete parques selecionados para o estudo e o entorno de cada um.

Figura 3. Imagens de satélite mostrando sete fragmentos de área verde, representados pelos Parques municipais da cidade de São Paulo selecionados para o presente trabalho. Na figura: A = Anhanguera, B = Shangrilá, C = Santo Dias, D = Alfredo Volpi, E = Chico Mendes, F = Carmo e G = Ibirapuera. Imagens extraídas de Google Earth™. Fonte: Carvalho, 2013.

3.2 Coleta e Identificação de mosquitos

Em cada parque, foram realizadas coletas mensais, pelo período de um ano (março/2011 a fevereiro/2012). Exceção ocorreu no mês de março de 2011, em que não houve coleta nos Parques Anhanguera, do Carmo, Chico Mendes e Alfredo Volpi. Acrescenta-se que o material coletado no Parque Anhanguera, no mês de outubro de 2011, não foi utilizado no presente trabalho por problemas logísticos.

Os mosquitos foram coletados no interior dos parques, mediante o uso de aspirador movido à bateria de 12V (Nasci, 1981; Natal e Marucci, 1984), armadilhas automáticas CDC-CO₂ (Gomes et al., 1985) e armadilha de Shannon (Bustamante e Pires, 1951). Tais armadilhas podem ser visualizadas na Figura 4, sendo estas técnicas explicadas a seguir.

Aspiradores não atraem mosquitos, porém, o coletor os direciona para os sítios onde estes insetos ficam abrigados. Três aspirações de vinte minutos cada foram realizadas em período diurno, em diferentes pontos de cada parque investigado, em locais cobertos por vegetação, e em outros pontos que servem de abrigo para mosquitos em repouso.

As armadilhas CDC-CO₂ atraem os mosquitos devido à presença de luz. Além do atrativo luminoso, o gelo seco, colocado em recipiente acoplado, libera CO₂, o que simula a respiração de vertebrado e aumenta a atração das fêmeas aptas para a alimentação sanguínea. De duas a cinco armadilhas foram instaladas em cada parque, sendo colocadas no solo ou na copa das árvores. Cada qual permaneceu ligada por duas horas a partir do crepúsculo noturno.

A armadilha de Shannon atrai os mosquitos devido à presença de luz de lampião a gás colocado em seu interior e também pelo efeito dos coletores, sempre

em número de dois indivíduos. Estes, munidos de aspirador elétrico manual (6V), coletavam os mosquitos que se aproximavam ou pousavam na armadilha. Em cada parque uma única armadilha foi operacionalizada funcionando pelo período de duas horas, com início a partir do período crepuscular.

Figura 4. Armadilhas utilizadas para a coleta de mosquitos. A = CDC-CO₂, B = Aspiração, C = Shannon. Fotos: Paulo Roberto Urbinatti

Os adultos coletados foram mortos por congelamento, triados e transportados em gelo seco (-70°C) até o laboratório, onde foram colocados em freezer -80°C.

A identificação morfológica dos exemplares foi realizada em mesa refrigerada. Utilizou-se microscopia estereoscópica além das chaves dicotômicas de identificação de Forattini (2002) e Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994).

Até dez fêmeas não ingurgitadas foram agrupadas em *pools* segundo categoria taxonômica, local e data de coleta. Os exemplares compondo o *pool* foram colocados em microtubos de 1,5ml. As fêmeas ingurgitadas foram armazenadas individualmente. Os microtubos contendo os mosquitos foram armazenados em freezer -80°C.

A coleta do material biológico foi realizada com o auxílio de Entomologistas do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP) e das equipes do Departamento de Parques e Áreas Verdes-3 (DEPAVE-3) da Secretaria do Verde e do Meio Ambiente da cidade de São Paulo e do Laboratório de Fauna Sinantrópica do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). A identificação dos mosquitos também foi executada com o auxílio de Entomologistas do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.

3.3 Detecção de RNA de *Flavivirus* em mosquitos

A detecção de RNA de *Flavivirus* em mosquitos foi realizada por meio de dois protocolos, sendo estes chamados de “Protocolo 1” e “Protocolo 2”, descritos a seguir.

3.3.1 “Protocolo1”

3.3.1.1 Extração de ácidos nucleicos

Os *pools* de fêmeas não ingurgitadas foram descongelados e macerados à temperatura ambiente. Para isso, 1ml de tampão de lise (NucliSENS® easyMAG®,

BioMérieux) foi adicionado aos microtubos contendo os mosquitos. Pistilos cônicos descartáveis (Axygen) acoplados ao *Pellet Pestle Motor* (Sigma-Aldrich) foram utilizados. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para banho seco (56°C por 10 min) e centrifugadas (2500rpm por 5 minutos a 4°C). Do sobrenadante, retirou-se 350µl, destinados ao procedimento de extração de ácidos nucleicos, sendo o restante armazenado em freezer -80°C.

As fêmeas ingurgitadas foram tratadas com pequenas diferenças. Cada uma foi macerada individualmente. A seguir, *pools* do macerado de até 10 fêmeas foram compostos (com 100µl de cada) antes do banho seco. Assim, caso houvesse positividade para *Flavivirus* de algum *pool* de fêmea ingurgitada, ainda haveria material para processar cada fêmea do *pool* individualmente, sendo possível detectar o exemplar positivo.

Os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando-se o protocolo *Specific B/Lysis off board* do extrator easy Mag (BioMérieux). Para tal, foram adotadas as instruções do fabricante. A eluição foi feita em 80µl e o produto final foi armazenado em freezer -80°C.

3.3.1.2 Tratamento das amostras com DNase

Os ácidos nucleicos obtidos foram tratados com DNase. Para isso utilizou-se o *Kit TURBO DNA-free*TM (Ambion®). O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A reação consistiu de 1,4U de TURBO DNase, 1x TURBO DNase Buffer e 35ng de ácido nucleico em um volume final de 17,5µl. O período de incubação da enzima foi de 30min a 37°C.

O tratamento dos ácidos nucleicos obtidos dos *pools* de fêmeas ingurgitadas foi semelhante, porém com as seguintes modificações: utilizou-se o dobro da concentração da enzima e o período de incubação foi de 4h a 37°C.

3.3.1.3 Transcrição Reversa

O RNA obtido após o tratamento do material com DNase foi convertido em DNA complementar (cDNA) por meio do *Kit* SuperScript® VILO™ (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído (1:100) antes das reações de PCR em tempo real descritas a seguir.

3.3.1.4 PCR em tempo real do gene *18S rRNA* de culicídeos

Realizou-se uma PCR em tempo real que amplifica um fragmento de 124pb do gene *18S rRNA* de culicídeos (LaBeaud et al., 2011). Essa reação foi adotada como controle de todas as etapas descritas anteriormente, desde a coleta do material até a PCR. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados podem ser observadas no Quadro 2.

A reação consistiu de 2,5µl de cDNA. Power SYBR® Green-Applied Biosystems (Mistura de amplificação contendo dNTP, Taq polimerase, tampão da enzima, MgCl₂ e SYBR Green) e iniciadores foram adicionados em concentração final de 1X e 0,2µM, respectivamente. Utilizou-se água (UltraPure™ DEPC-treated Water, Invitrogen) para completar o volume de 25µl.

A reação foi realizada no equipamento Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems). Os parâmetros utilizados foram: 95°C por 15min, 40 ciclos de 94°C por 30s e 60°C por 1min, seguidos de uma etapa final de curva de melting de 95°C por 15s, 60°C por 30s e 95°C por 15s.

Foram consideradas positivas as amostras cujas curvas de amplificação ultrapassaram o limiar e que apresentaram temperatura de *melting* (T_m) de aproximadamente 80°C, temperatura essa apresentada pela amostra de DNA extraída de um *pool* de 10 fêmeas de *Cx. (Cux.)* sp., utilizada como controle positivo da reação. Mistura de PCR foi utilizada como controle negativo.

3.3.1.5 PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus*

Realizou-se uma PCR em tempo real que amplifica um fragmento de 204pb do gene *NS5* de *Flavivirus* (Johnson et al., 2010). Essa reação foi empregada para detecção de tais vírus em mosquitos. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados podem ser observadas no Quadro 2. Ressalta-se que tais iniciadores são degenerados, sendo capazes de detectar diferentes *Flavivirus* com excelente sensibilidade, tais como WNV, JEV, DENV, USUV e TBEV.

A reação de amplificação consistiu de 2,5µl de cDNA, iniciadores e Power SYBR® Green (Applied Biosystems) em concentração final de 0,4µM e 1X, respectivamente. Água (UltraPure™ DEPC-treated Water, Invitrogen) foi utilizada para completar o volume de 25µl.

A reação foi realizada no equipamento Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems). Os parâmetros utilizados foram: 95°C por 15min, 40 ciclos de 94°C

por 30s e 60°C por 1min, seguidos de uma etapa final de curva de melting de 95°C por 15s, 60°C por 30s e 95°C por 15s.

Foram consideradas positivas as amostras cujas curvas de amplificação ultrapassaram o limiar e que apresentaram T_m de aproximadamente 80°C, temperatura essa obtida após realizar a reação com cDNA proveniente de sobrenadante de cultura dos vírus da dengue tipos 1-4 (controle positivo 1) e do vírus da febre amarela vacinal (controle positivo 2). Mistura de PCR foi utilizada como controle negativo.

O produto de PCR das amostras positivas foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5 ou 2,5%, dependendo do marcador de peso molecular utilizado) para visualização da banda de interesse. O gel foi corado com brometo de etídio e utilizou-se um dos dois marcadores de peso molecular: 100bp DNA Ladder (Invitrogen) ou GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

O cDNA das amostras positivas nesta reação foi encaminhado para a semi-*nested* PCR do gene NS5.

3.3.2 “Protocolo 2”

O “Protocolo” 2 é semelhante ao “Protocolo1”, porém apresenta algumas modificações, descritas a seguir.

Os ácidos nucleicos obtidos ao final da extração foram encaminhados diretamente para a etapa de transcrição reversa. Esta foi realizada pelo kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo-se as recomendações do

fabricante. Ademais, utilizou-se random primers (Invitrogen) e dNTP mix (Thermo Scientific).

O produto da transcrição reversa foi submetido à PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus* sem ser diluído. Realizou-se gel de agarose das amostras que apresentaram resultado positivo em tal reação, a fim de detectar se a banda de interesse estava presente. No caso de presença da banda, as amostras foram encaminhadas para a semi-nested PCR do gene *NS5* de *Flavivirus*.

Fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em laboratório com sangue infectado com DENV e com sangue não infectado foram cedidas pela Dra. Margarete de Lara Capurro-Guimarães (Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) e processadas para a detecção de *Flavivirus* pelos dois protocolos descritos anteriormente: “Protocolo 1” e “2”. Essa etapa foi realizada a fim de observar se os resultados obtidos ao final de cada protocolo seriam semelhantes.

3.3.3 Semi-nested PCR do gene *NS5* de *Flavivirus*

Amostras com resultado positivo na PCR em tempo real do gene *NS5* tiveram o cDNA submetido a uma semi-nested PCR do gene *NS5* de *Flavivirus*, utilizada com a finalidade de aumentar a concentração do produto de PCR positivo a ser encaminhado para o sequenciamento.

Na primeira reação foram utilizados iniciadores que amplificam uma região de 269-272pb do gene *NS5* (Quadro 2), dependendo da espécie de *Flavivirus* (Moureau et al., 2007).

A reação de amplificação consistiu de 2,5µl de cDNA, tampão, MgCl₂, dNTP mix (Fermentas) e iniciadores em concentração final de 1x, 3mM, 0,2mM e 0,3µM, respectivamente, 1,5U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e água (UltraPure™ DEPC-treated Water, Invitrogen) para completar o volume final de 25µl.

As amostras foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf®) e submetidas a 95°C por 10min, 40 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 45s e, por fim, 72°C por 10min.

O produto de PCR obtido após tal reação foi encaminhado para a segunda reação, a fim de que um fragmento final de aproximadamente 200pb fosse amplificado por meio dos iniciadores descritos por Cook et al. (2009), que aparecem no Quadro 2.

A reação de amplificação consistiu de 2,5µl de produto da primeira PCR, tampão, MgCl₂, dNTP mix (Fermentas) e iniciadores em concentração final de 1x, 3mM, 0,2mM e 0,3µM, respectivamente, 1,5U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e água (UltraPure™ DEPC-treated Water, Invitrogen) para completar o volume final de 25µl.

As amostras foram incubadas em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf®) e submetidas a 94°C por 2min, 30 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 45s, 72°C por 1min e, por fim, 72°C por 10min.

Utilizou-se cDNA obtido a partir de sobrenadante de cultura dos vírus da dengue tipos 1-4 e do vírus da febre amarela vacinal como controle positivo da reação. Mistura de PCR foi utilizada como controle negativo.

O produto da reação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 1,5 ou 2,5%, dependendo do marcador de peso molecular utilizado. O gel foi corado

com brometo de etídio. Utilizou-se um dos dois marcadores de peso molecular: 100bp DNA Ladder (Invitrogen) ou GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Sientific).

Quadro 2. Informação sobre os iniciadores utilizados para detecção de *Flavivirus* e culicídeos.

PCR	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Autor
18s rRNA de Culicídeos	F R	gat caa gtg gag ggc aag tc aag gag tag cac ccg tgt tg	124	LaBeaud et al., 2011
NS5 de <i>Flavivirus</i>	Flavi-for Flavi-rev	gcm ath tgg twc atg tgg gtr tcc cak ccd gcn gtr tc	204	Johnson et al., 2010.
Semi-nested PCR <i>Flavivirus</i>	Pf1s Pf2r bis	tgy rtb tay aac atg atg gg gtg tcc cai ccn gcn gtr tc	269-272pb	Moureau et al., 2007
	Pf3s Pf2r bis	ath tgg twy atg tgg ytd gg gtg tcc cai ccn gcn gtr tc	200pb	Cook et al., 2009

3.3.4 Purificação do Produto de PCR

O produto da PCR de amostras com resultado positivo foi purificado por meio do *Kit Invisorb®* Fragment Clean up (Invitex), de acordo com as instruções do fabricante. Parte do produto final foi submetida à eletroforese em gel de agarose (1,5%), sendo o restante armazenado em freezer -20°C. Aplicou-se Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) ao gel a fim de se conhecer a concentração do produto purificado.

3.3.5 Sequenciamento e análises filogenéticas

Amostras positivas foram sequenciadas. Para tal, utilizou-se DNA Sequencing Kit – Big Dye Terminator™ v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI Prism® (Applied Biosystems). A reação consistiu de 1x Big Dye, 1x tampão Big Dye Sequencing, 3,2pmol de iniciador direto ou reverso (Cook et al., 2009), até 100ng de produto de PCR e água para completar um volume final de 20µl.

A reação foi realizada em placa (Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems) e os seguintes parâmetros foram empregados: 25 ciclos de 96°C por 10s, 50°C por 10s e 60°C por 4min.

Após a reação de sequenciamento realizou-se o procedimento de purificação. Para isso, foram adicionados 80µl de isopropanol 75% em cada orifício da placa, que foi centrifugada (2000 x *g*/45min) para a eliminação do isopropanol. Outra centrifugação foi realizada com a placa invertida (150 x *g*/1min). Adicionou-se 20µl de formamida Hi-Di para ressuspender o pellet. Por fim, as amostras foram sequenciadas em Sequenciador Automático ABI 3100.

As sequências obtidas foram analisadas para a definição da espécie viral por meio dos programas BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool, do site NCBI) e BioEdit (Biological sequence alignment editor, disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

O alinhamento das sequências das amostras positivas e daquelas do GenBank foi obtido com o auxílio do programa ClustalX (Thompson et al., 1997) e editado no SE-AL (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>). A reconstrução filogenética foi realizada por abordagem bayesiana. Assim, utilizou-se o programa Beast 1.8 (Drummond et al., 2012) com 50 milhões de corridas e

amostragem e burn-in de 10%. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi o TrNef G+I, escolhido por meio do programa JModelTest v 1 (Posada, 2008). A árvore foi anotada (TreeAnnotator, disponível no pacote do Beast) e a convergência dos parâmetros foi verificada pelo programa Tracer 1.4 (disponível em <http://www.beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>).

Amostras positivas para determinada espécie viral tiveram o cálculo de distância genética entre as sequências realizado pelo método de distância (programa PAUP).

4 RESULTADOS

4.1 Mosquitos

4.1.1 Fêmeas não ingurgitadas

A categoria taxonômica dos mosquitos coletados, o local de coleta e o número de exemplares e *pools* obtidos encontram-se no Quadro 3. O Quadro 4 mostra a síntese do quadro anterior ao se considerar os táxons no nível genérico.

Quadro 3. Número de exemplares e pools de fêmeas não ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo categoria taxonômica e local de coleta.

Categoria taxonômica	Número de exemplares (número de pools)							
	Anhanguera	Santo Dias	Shangrilá	Ibirapuera	Do Carmo	Chico Mendes	Alfredo Volpi	Total
<i>Aedeomia squamipennis</i>			1(1)					1(1)
<i>Aedes</i> sp.		3(2)	1(1)	4(1)	3(3)	7(2)		18(9)
<i>Ae. albopictus</i>	1(1)	4(3)	21(11)	12(5)		1(1)	1(1)	40(22)
<i>Ae. fluviatilis</i>	3(1)	87(17)	28(10)	189(29)	9(3)	3(2)	33(7)	352(69)
<i>Ae. scapularis</i>	100(16)	43(8)	30(9)	17(5)	40(7)	180(19)	1(1)	411(65)
<i>Anopheles fluminensis</i>	1(1)							1(1)
<i>An. strodei</i>	1(1)		3(2)					4(3)
<i>Coquillettidia crysonotum/albifera</i>	4(1)							4(1)
<i>Cq. Venezuelensis</i>	5(1)			1(1)				6(2)
<i>Culex aureonotatus</i>			27(5)					27(5)
<i>Culex</i> sp.	6(1)	4(2)	18(3)	4(2)	2(2)	1(1)		35(11)
<i>Cx. chidesteri</i>	19(7)	50(12)	318(45)	13(9)	2(2)	33(10)		435(85)
<i>Cx. (Culex) sp.</i>	170(24)	383(45)	1065(119)	170(27)	57(13)	290(36)	9(5)	2144(269)
<i>Cx. corniger</i>			2(2)					2(2)
<i>Cx. (Cux.) grupo Coronator</i>	1(1)	4(2)		4(1)				9(4)
<i>Cx. delpontei</i>			3(2)					3(2)
<i>Cx. (Melanoconion) sp.</i>			1(1)		1(1)			2(2)
<i>Cx. (Mel.) grupo Pilosus</i>				1(1)				1(1)
<i>Cx. (Mel.) ribeirensis</i>			4(1)					4(1)
<i>Cx. (Mel.) seção Melanoconion</i>	2(2)		24(3)				1(1)	27(6)
<i>Cx. (Microculex) grupo Imitator</i>		10(6)						10(6)
<i>Cx. nigripalpus</i>	400(48)	408(49)	510(60)	66(12)		15(6)	7(4)	1406(179)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	46(10)	16(6)	22(7)	83(14)		3(2)		170(39)
<i>Limatus durhamii</i>	1(1)	4(3)	2(2)		3(1)	1(1)		11(8)
<i>Mansonia (Mansonia) sp.</i>			2(1)					2(1)
<i>Ma. titillans</i>			4(2)			1(1)		5(3)
<i>Ma. wilsoni</i>			17(8)	1(1)				18(9)
<i>Psorophora ferox</i>	38(5)							38(5)
<i>Toxorhynchites</i> sp.				1(1)				1(1)
<i>Uranotenia pulcherrima</i>	21(2)							21(2)
<i>Wyeomyia confusa</i>	2(1)		1(1)					3(2)
<i>Wy. (Phoniomyia) sp.</i>			1(1)					1(1)
<i>Wy. (Pho.) galvaoi</i> próximo		1(1)						1(1)
Total	821(124)	1017(156)	2105 (297)	566(109)	117(32)	535(81)	52(19)	5213(818)

Quadro 4. Número de exemplares e *pools* de fêmeas não ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo os gêneros.

Gêneros	Mosquitos		Pools	
	Nº	%	Nº	%
<i>Culex</i>	4275	82,01	612	74,82
<i>Aedes</i>	821	15,75	165	20,17
<i>Psorophora</i>	38	0,73	5	0,61
<i>Mansonia</i>	25	0,47	13	1,59
<i>Uranotaenia</i>	21	0,40	2	0,24
<i>Limatus</i>	11	0,21	8	0,98
<i>Coquillettidia</i>	10	0,19	3	0,37
<i>Anopheles</i>	5	0,10	4	0,49
<i>Wyeomyia</i>	5	0,10	4	0,49
<i>Aedeomyia</i>	1	0,02	1	0,12
<i>Toxorhynchites</i>	1	0,02	1	0,12
Total	5213	100,00	818	100,00

Um total de 5.213 fêmeas não ingurgitadas de culicídeos foi identificado. Estas foram agrupadas em 818 *pools* (Quadro 3).

Dentre as 33 categorias taxonômicas observadas, as que ocorreram em maior número foram *Cx. (Cux.)* sp. (41%) e *Cx. nigripalpus* (27%), dentro do gênero *Culex*, e *Ae. scapularis* (7,9%) e *Ae. fluviatilis* (6,75%), dentro de *Aedes* (Quadro 3).

No Quadro 4, observa-se que dentre os mosquitos coletados ocorreu a presença de onze gêneros. Destes, *Culex* e *Aedes* foram encontrados em maior número, compondo juntos 97,76% (5096/5213) dos exemplares e 94,99% (777/818) dos *pools*.

Destaca-se que 82,01% (4275/5213) dos espécimes coletados pertenciam ao gênero *Culex* e 15,75% (821/5213) ao *Aedes*. Em relação aos *pools*, 74,82% (612/818) foram compostos por *Culex* e 20,17% (165/818) por *Aedes* (Quadro 4).

4.1.2 Fêmeas ingurgitadas

O número de exemplares de fêmeas ingurgitadas, a categoria taxonômica e o local de coleta de cada uma podem ser visualizados no Quadro 5. O Quadro 6 seguinte resume os mesmos dados ao se levar em consideração somente as categorias genéricas.

Quadro 5. Número de exemplares de fêmeas ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo categoria taxonômica e local de coleta.

Categoria taxonômica	Número de exemplares							
	Anhanguera	Santo Dias	Shangrilá	Ibirapuera	Do Carmo	Chico Mendes	Alfredo Volpi	Total
<i>Aedes sp.</i>						1		1
<i>Ae. albopictus</i>			4	1				5
<i>Ae. fluviatilis</i>		10	8	18	1	1	1	39
<i>Ae. scapularis</i>	10	3	8	3	3	21		48
<i>Culex sp.</i>		2	1					3
<i>Cx. chidesteri</i>	1	3	45	14	1	2		66
<i>Cx. (Culex) sp.</i>	19	101	259	31	3	25	1	439
<i>Cx. (Microculex) grupo Imitator</i>		2						2
<i>Cx. nigripalpus</i>	8	27	70	7		2		114
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	43		1	25				69
<i>Mansonia titillans</i>						1		1
<i>Psorophora ferox</i>	1							1
Total	82	148	396	99	8	53	2	788

Quadro 6. Número de exemplares de fêmeas ingurgitadas de culicídeos coletadas segundo os gêneros.

Gêneros	Nº	%
<i>Culex</i>	693	87,94
<i>Aedes</i>	93	11,80
<i>Mansonia</i>	1	0,13
<i>Psorophora</i>	1	0,13
Total	788	100,00

Um total de 788 fêmeas ingurgitadas de culicídeos foi identificado entre as quais se reconheceram doze táxons. O número de *pools* resultante, obtidos a partir

do macerado destas fêmeas e não discriminado no quadro, foi de 80. Diante dos dados expostos nos dois quadros, observa-se que cerca de 88% (693/788) e cerca de 12% (93/788) das fêmeas pertencem aos gêneros *Culex* e *Aedes*, respectivamente. Além destes gêneros somente mais dois mosquitos foram testados, sendo um do gênero *Mansonia* e outro do gênero *Psorophora*.

4.2 Detecção de RNA de *Flavivirus* em mosquitos

4.2.1 “Protocolo 1”

4.2.1.1 Fêmeas não ingurgitadas

4.2.1.1.1 PCR em tempo real do gene *18S rRNA* de culicídeos - Testes iniciais

Esta reação foi realizada com o cDNA na concentração obtida ao final do procedimento de transcrição reversa e com o mesmo diluído em 1:100. A primeira concentração não foi adequada, pois as curvas de amplificação originadas após a PCR indicavam excesso de cDNA e resultado negativo (Figura 5 e Quadro 7). Dessa forma, adotou-se utilizar o cDNA diluído em 1:100 para todas as reações de PCR utilizadas no “Protocolo 1”.

Figura 5. Curvas de amplificação geradas a partir da PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene *18S rRNA* de culicídeos. Observam-se curvas de amplificação que indicam excesso de cDNA e resultado negativo (curvas em vermelho, que no início da reação são superiores ao limiar – linha reta de cor verde).

Quadro 7. Resultados da PCR do gene *18S rRNA* segundo *pools* de culicídeos, diluição do cDNA e C_T/T_m.

<i>Pool</i>		Diluição do cDNA	C _T	T _m (°C)
Culicídeo	Nº mosquitos/ <i>pool</i>			
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	nd	negativo	79.4
		1:100	22.2	79.4
<i>Cx. aureonotatus</i>	2	nd	negativo	79.4
		1:100	18.9	79.4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	nd	negativo	79.4
		1:100	33.6	79.4
<i>Cx. chidesteri</i>	4	nd	negativo	79.4
		1:100	23.5	79.4
<i>Cx. chidesteri</i>	2	nd	negativo	79.4
		1:100	22.9	79.4
<i>Cx. nigripalpus</i>	1	nd	negativo	79.8
		1:100	27.6	79.4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	nd	negativo	79.4
		1:100	19.0	79.8
<i>Cx. nigripalpus</i>	7	nd	negativo	79.8
		1:100	19.6	79.1
controle negativo	-	-	negativo	73.8

No quadro: C_T = ciclo limiar, T_m = temperatura de *melting* e nd = amostra não diluída.

Uma vez definida a diluição do cDNA, foi estabelecido o protocolo para tratamento das amostras com DNase. Para isto, utilizou-se 1,4U de tal enzima em uma reação de 17,5µl de volume final. Por meio da reação de PCR em questão, observou-se que o DNA sofreu degradação suficiente a ponto de não ser detectado quando este volume de DNase foi empregado. Esse experimento está ilustrado no Quadro 8, por meio do qual podem ser observados os resultados da reação de PCR do gene *18S rRNA* de mosquitos. Tal reação foi realizada a partir de dois *pools* de

fêmeas, ambos tratados com 1,4U de DNase e cada um deles submetido e não submetido à transcrição reversa.

Quadro 8 Resultados da reação de PCR em tempo real do gene *18S rRNA* de mosquitos a partir de *pools* de fêmeas segundo tratamento recebido.

<i>Pool</i> de fêmeas	Tratamento	Material esperado	C _T	T _m	Nºmosquitos/ <i>pool</i>	Espécie
A	DT	cDNA	14.3	79.2	4	<i>Cx. chidesterei</i>
	D	RNA	negativo	80.7		
B	DT	cDNA	14.3	79.2	5	<i>Cx. nigripalpus</i>
	D	RNA	negativo	80.7		
Controle positivo	-	DNA	14.0	79.6	10	<i>Cx. (Cux.) sp.</i>
Controle negativo	-	-	negativo	80.7	-	-

No quadro: DT = tratamento com 1,4U de DNase em volume final de 17,5µl seguido de transcrição reversa, D = tratamento com 1,4U de DNase em volume final de 17,5µl, C_T = ciclo limiar, T_m = temperatura de *melting*.

4.2.1.1.2 PCR em tempo real do gene *18S rRNA* de culicídeos - Resultados obtidos a partir de *pools* de mosquitos

Em relação aos *pools* de mosquitos, dentre os 818, triados pela reação que amplifica fragmento do gene *18S rRNA*, dois apresentaram resultado negativo e foram excluídos da pesquisa de *Flavivirus*. Os demais *pools* apresentaram resultado positivo nesta reação. O Quadro 9 e as Figuras 6 e 7 ilustram os resultados desta reação. O Quadro 9 apresenta os resultados de uma PCR do gene *18S rRNA* realizada a partir de determinados *pools* de mosquitos. As Figuras 6 e 7 mostram as curvas de amplificação e de dissociação, respectivamente, da reação do gene *18S rRNA* realizada com os *pools* observados no Quadro 9.

Quadro 9. Resultados da PCR do gene *18S rRNA* segundo *pools* de culicídeos e C_T/T_m .

<i>Pool</i>		C_T	T_m (°C)
Culicídeo	Nº de mosquitos/ <i>pool</i>		
<i>Ae. scapularis</i>	1	14.2	79.1
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	14.8	79.1
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	15.1	79.1
<i>Ae. scapularis</i>	5	13.9	79.1
<i>Cx. nigripalpus</i>	9	14.0	79.1
<i>Cx. (Mel.) aureonotatus</i>	7	16.2	79.1
<i>Cx. (Mel.) delpontei</i>	1	13.8	79.4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	13.8	78.8
<i>Cx. chidesteri</i>	10	14.1	78.8
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	9	14.0	78.5
<i>Ae. fluviatilis</i>	3	14.3	79.4
<i>Ae. albopictus</i>	6	14.5	79.1
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	76.9
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	14.4	79.4
<i>Cx. chidesteri</i>	2	13.8	79.4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	14.0	79.4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	13.9	79.4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	14.8	79.4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	14.6	79.1
<i>Cx. nigripalpus</i>	2	13.3	79.1
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	3	14.0	78.8
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	14.9	78.8
<i>Cx. nigripalpus</i>	5	13.6	79.1
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	5	14.5	79.4
<i>Cx. chidesteri</i>	2	14.4	79.4
<i>Cx. (Phe.) corniger</i>	1	13.4	79.4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	1	13.7	79.4
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	9	13.6	79.4
<i>Ae. fluviatilis</i>	10	14.9	79.4
<i>Ae. scapularis</i>	2	14.2	79.8
<i>Cx. nigripalpus</i>	5	Negativo	76.2
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	3	13.8	78.8
<i>Cx. nigripalpus</i>	4	13.1	79.4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	1	13.9	79.4
Controle positivo – <i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	14.1	79.8
Controle negativo	-	Negativo	75.0

No quadro: C_T = ciclo limiar e T_m = temperatura de *melting*

Figura 6. Curvas de amplificação geradas a partir da PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene *18S rRNA* de culicídeos. Observa-se o limiar (linha reta de cor verde) e as curvas que o ultrapassam (amostras positivas).

Figura 7. Curva de dissociação originada a partir de PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene *18S rRNA* de culicídeos. Observa-se que as amostras positivas apresentam T_m de aproximadamente 80°C.

4.2.1.1.3 PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus*

Dos 816 *pools* de mosquitos submetidos à detecção de *Flavivirus*, dois (0,24%) apresentaram resultado positivo.

O Quadro 10 e as Figuras 8 e 9 ilustram a reação que amplifica fragmento do gene *NS5* de *Flavivirus* realizada a partir de determinados *pools* de mosquitos. O Quadro 8 apresenta os resultados de tal reação. As Figuras 8 e 9 mostram curvas de amplificação e de dissociação, respectivamente, de uma das amostras que apresentou resultado positivo, do controle positivo 1 e do controle negativo.

Quadro 10. Resultados da PCR do gene *NS5* de *Flavivirus* segundo *pools* de culicídeos e C_T/T_m .

<i>Pool</i>		C_T	T_m (°C)
Culicídeo	Nº mosquito/ <i>pool</i>		
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. grupo Imitator</i>	3	Negativo	62,4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. nigripalpus</i>	2	Negativo	62,4
<i>Cx. nigripalpus</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	5	35,5	80,8
<i>Cx. nigripalpus</i>	5	Negativo	62,4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	Negativo	62,4
<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	8	Negativo	62,4
<i>Cx. Chidesteri</i>	1	Negativo	62,4
Controle positivo 1	-	27,5	79,1
Controle negativo	-	Negativo	62,8

No quadro: C_T = ciclo limiar e T_m = temperatura de *melting*. O *pool* positivo apresenta dados em negrito.

Figura 8. Curvas de amplificação geradas a partir da PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene *NS5 de Flavivirus*. Observa-se o limiar (linha reta de cor azul) e curvas que o ultrapassam (em vermelho, o controle positivo 1 e em azul, o *pool* de mosquito com resultado positivo). A linha reta de cor vermelha, que não ultrapassa o limiar, é o controle negativo.

Figura 9. Curva de dissociação originada a partir de PCR em tempo real que amplifica fragmento do gene *NS5 de Flavivirus*. Em vermelho, observa-se a curva do controle positivo 1 e em azul, a da amostra positiva. A curva vermelha que não apresenta pico é o controle negativo.

Realizou-se eletroforese em gel de agarose do produto de PCR em tempo real dos *pools* positivos. A banda de aproximadamente 204pb apresentada por uma das amostras pode ser visualizada na Figura 10.

Figura 10. Foto de gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real que amplifica fragmento de aproximadamente 200pb do gene *NS5* de *Flavivirus*. Na figura: 1 e 10 = Marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder – Invitrogen), 2,3, 5 e 6 = poço vazio, 4 = amostra positiva, 7 = controle positivo 1, 8 = controle positivo 2, 9 = controle negativo.

O cDNA obtido dos *pools* com resultado positivo foi submetido a uma semi-*nested* PCR que amplifica fragmento do gene *NS5* de *Flavivirus*.

4.2.1.2 Fêmeas ingurgitadas

4.2.1.2.1 Testes iniciais

Em um primeiro momento, os *pools* de fêmeas ingurgitadas foram analisados pelo mesmo protocolo utilizado para detecção de *Flavivirus* em fêmeas não ingurgitadas e as amostras apresentaram resultado negativo (Quadro 11). No entanto, o gel realizado a partir do produto da PCR em tempo real para o gene *NS5* revelou a existência de um forte arraste em todas as amostras. O mesmo manteve-

se presente mesmo após a repetição da reação com o cDNA diluído em 1:1.000 (Figura 11).

Quadro 11. Resultados da PCR do gene *NS5* de *Flavivirus* segundo *pools* de fêmeas ingurgitadas de culicídeos e C_T /T_m obtidos nas reações realizadas com cDNA 1:100 e cDNA 1:1.000.

N° do <i>pool</i> de fêmeas ingurgitadas	N° mosquitos/ <i>pool</i>	cDNA 1:100		cDNA 1:1.000	
		C _T	T _m (°C)	C _T	T _m (°C)
1	10	Negativo	64,6	Negativo	64,3
2	10	Negativo	64,6	Negativo	64,3
3	10	Negativo	64,6	Negativo	64,3
4	10	Negativo	64,2	6,458758	63,9
5	10	Negativo	64,6	Negativo	64,1
6	10	Negativo	64,4	Negativo	64,1
7	10	Negativo	64,2	Negativo	63,9
8	10	Negativo	64,4	4,5	64,1
9	10	Negativo	64,6	Negativo	64,3
10	10	Negativo	64,6	Negativo	64,3
11	10	Negativo	64,7	Negativo	64,5
12	10	Negativo	64,7	Negativo	64,5
13	10	Negativo	64,7	Negativo	64,5
14	10	Negativo	64,6	4,234156	64,5
15	10	Negativo	64,7	Negativo	64,5
Controle positivo 1	-	24,2	80,9	21,9	82,4
Controle positivo 2	-	13,9	84,8	14,4	84,7
Branco	-	Negativo	73,8	Negativo	87,3

No quadro: C_T= ciclo limiar e T_m = temperatura de *melting*

Figura 11. Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real que amplifica fragmento de aproximadamente 200pb do gene *NS5* de *Flavivirus*. A. Produto da PCR obtido após realizar a reação com cDNA diluído em 1:100. B. Produto da PCR obtido após realizar a reação com cDNA diluído em 1:1.000. Na figura: M = Marcador de peso molecular (GeneRuler 50bp DNA Ladder – Thermo Sientific), C1 = controle positivo 1, C2 = controle positivo 2 e C = controle negativo.

Dessa forma, julgou-se necessário alterar o protocolo e dois *pools* de fêmeas ingurgitadas foram escolhidos para o novo teste. Nesta ocasião, o protocolo de DNase foi modificado, sendo a concentração da enzima e o tempo de incubação da mesma dobrados. A reação de PCR do gene *NS5* de *Flavivirus* foi realizada com o cDNA obtido das amostras nas seguintes diluições: não diluído, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000. Eletroforese em gel de agarose do produto obtido nesta reação foi realizada e observou-se que o arraste mantinha-se presente nas primeiras diluições utilizadas (Figura 12).

Figura 12. Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus* realizado após alterações no tratamento das amostras com DNase (concentração e tempo de incubação da enzima dobrados). As amostras consistem de cDNA de dois *pools* de fêmeas ingurgitadas (A e B) nas seguintes diluições: 1 = A não diluído, 2 = A 1:10, 3 = A 1:100, 4 = A 1:1.000, 5 = A 1:10.000, 6 = A 1:100.000, 7 = B não diluído, 8 = B 1:10, 9 = B 1:100, 11 = B 1:1.000, 12 = B 1:10.000, 13 = 1:100.000. Demais linhas: 10 = Marcador de peso molecular (GeneRuler 50bp DNA Ladder – Thermo Sientific), 14= controle positivo 1, 15 = controle positivo 2, 16 = controle negativo.

Assim, novo teste foi realizado. Nesta etapa, duas alíquotas de um *pool* de macerado de 10 fêmeas ingurgitadas foram utilizadas. Sobrenadante de cultura do vírus da dengue (2ul) foi adicionado a uma delas e ambas foram submetidas à extração de ácidos nucleicos. As amostras foram tratadas com DNase, ainda com o dobro da concentração da enzima, porém o período de incubação a 37°C foi de 4h. O material obtido foi encaminhado para a etapa de transcrição reversa e para a reação de PCR do gene *NS5*, sendo utilizadas as seguintes diluições de cDNA: não diluído, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000. Os resultados deste experimento podem ser visualizados no Quadro 12 e na Figura 13.

Quadro 12. Resultados da PCR do gene *NS5* de *Flavivirus* segundo amostra utilizada, diluição da amostra e C_T/T_m .

Amostra	Diluição da amostra	C_T	T_m (°C)
Pool de 10 fêmeas ingurgitadas	Sem diluição	Negativo	64,5
	1:10	Negativo	64,8
	1:100	Negativo	64,5
	1:1.000	Negativo	64,1
	1:10.000	18,4	63,7
	1:100.000	35,1	64,1
Pool de 10 fêmeas ingurgitadas e sobrenadante de cultura de DENV (2ul)	Sem diluição	24,5	83,2
	1:10	28,7	83,2
	1:100	33,0	83,4
	1:1.000	37,5	83,4
	1:10.000	39,7	83,4
	1:100.000	Negativo	63,0
Controle positivo 1	-	19,5	82,6
Controle positivo 2	-	12,2	85,2
Controle negativo	-	Negativo	63,2

No quadro: C_T = ciclo limiar e T_m = temperatura de *melting*.

Figura 13. Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus* realizado após alterações no tratamento das amostras com DNase (concentração da enzima dobrada e tempo de incubação = 37°C/4h). As amostras consistem de cDNA de um *pool* de fêmeas ingurgitadas sem DENV (A) e com DENV (B), nas seguintes diluições: 1 = A não diluído, 2 = A 1:10, 3 = A 1:100, 4 = A 1:1.000, 5 = A 1:10.000, 6 = A 1:100.000, 7 = B não diluído, 9 = B 1:10, 10 = B 1:100, 11 = B 1:1.000, 12 = B 1:10.000, 13 = 1:100.000. Demais linhas: 8 = Marcador de peso molecular (GeneRuler 50bp DNA Ladder – Thermo Scientific), 14= controle positivo 1, 15 = controle positivo 2, 16 = controle negativo.

Ao final do experimento, optou-se por analisar as fêmeas ingurgitadas pelo “Protocolo 1”, com as seguintes modificações no tratamento das amostras com DNase: concentração da enzima dobrada e período de incubação de 37°C/4h. Em relação ao cDNA, escolheu-se a diluição 1:100, em que o arraste diminui mas ainda é possível visualizar a banda de interesse.

Assim, os 80 *pools* de fêmeas ingurgitadas foram submetidos a este protocolo, sendo os resultados negativos para a presença de *Flavivirus*.

4.2.2 “Protocolo 2”

4.2.2.1 Teste inicial

Fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em sangue infectado com DENV ou em sangue não infectado foram submetidas à análise de *Flavivirus* pelos “Protocolos 1” e “2”. Os resultados deste experimento podem ser visualizados no Quadro 13 e na Figura 14.

Quadro 13. Resultado da PCR *NS5* de *Flavivirus* segundo amostras analisadas, protocolo de tratamento das amostras após extração de ácidos nucleicos, e C_T/T_m obtidos na reação.

Amostra	Tratamento da amostra	C_T	T_m
1 (*)	Protocolo 1	32,1	80,2
2 (*)		Negativo	62,8
3 (*)		Negativo	80,6
4 (*)		Negativo	63,0
5 (**)		Negativo	63,0
6 (**)		Negativo	62,8
7 (**)		Negativo	63,0
8 (***)		18,0	63,0
9 (***)		16,0	63,0
10 (***)		11,2	62,8
11 (***)		Negativo	62,8
1 (*)	Protocolo 2	Negativo	80,2
2 (*)		33,4	80,2
3 (*)		21,1	80,4
4 (*)		20,9	80,6
5 (**)		33,6	-
6 (**)		Negativo	81,2
7 (**)		33,2	81,4
8 (***)		33,8	81,2
9 (***)		33,7	81,0
10 (***)		34,0	81,0
11 (***)		32,8	80,6
Controle positivo 1	-	20,0	80,2
Controle negativo	-	Negativo	62,8

No quadro, * = *pool* de 4 fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em laboratório com sangue infectado com DENV, ** = fêmea de *Aedes aegypti* alimentada em laboratório com sangue não infectado, *** fêmea de *Aedes aegypti* alimentada em laboratório com sangue infectado com DENV, protocolo 1 = amostras submetidas a tratamento com DNase, RT, cDNA diluído em 1:100 e PCR em tempo real para o gene *NS5* de *Flavivirus*, protocolo 2 = amostras submetidas a RT, cDNA não diluído e PCR em tempo real para o gene *NS5* de *Flavivirus*, C_T = ciclo limiar e T_m = temperatura de *melting*.

Figura 14. Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese do produto da PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus*. Na figura: 1-4 = *pool* de 4 fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em sangue infectado com DENV e tratadas pelo protocolo 1, 5-7 = fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em sangue não infectado e tratadas pelo protocolo 1, 8-10 e 12 = fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em sangue infectado com DENV e tratadas pelo protocolo 1, 13 – 16 = *pool* de 4 fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em sangue infectado com DENV e tratadas pelo protocolo 2, 17 – 19 = fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em sangue não infectado e tratadas pelo protocolo 2, 22-25 = fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas em sangue infectado com DENV e tratadas pelo protocolo 2, 11, 20, 21 e 29 = Marcador de peso molecular (GeneRuler 50bp DNA Ladder – Thermo Sientific), 26= controle positivo 1, controle positivo 2, 28 = controle negativo, 30 – 40 = vazios.

Os resultados observados indicam que por meio do “Protocolo 2” foi possível detectar amplificação do fragmento alvo de *Flavivirus* em amostras consideradas negativas pelo “Protocolo 1” (Quadro 13, amostra 4* e 8-11*** e Figura 14, linha 16 e 22-25, respectivamente). Observa-se também que, uma amostra, para a qual se esperava resultado negativo, apresentou resultado positivo pelo “Protocolo 2” na PCR em tempo real (Quadro 13, amostra 7**), resultados estes não confirmados

após a eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em questão (Figura 14, linha 19).

Assim, definiu-se reanalisar as amostras de fêmeas não ingurgitadas e ingurgitadas pelo “Protocolo 2”. Aquelas que apresentassem resultado positivo na PCR do gene *NS5* teriam seus produtos submetidos à eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação do fragmento de interesse.

4.2.2.2 Fêmeas não ingurgitadas

Dos 818 *pools* de fêmeas não ingurgitadas analisados para *Flavivirus* pelo “Protocolo 2”, 168 apresentaram $C_T < 40^\circ\text{C}$ e T_m esperada, sendo considerados positivos. No entanto, apenas 36 destes apresentaram banda de aproximadamente 200pb no gel de agarose. Tais *pools* foram encaminhados para a semi-*nested* PCR do gene *NS5*. Por esta reação, confirmou-se a positividade de 23 amostras, todas elas submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos (duas delas já haviam sido positivas após análise pelo “Protocolo 1”). O Quadro 14 e as Figuras 15 e 16 ilustram os resultados do experimento.

Quadro 14. Resultado da PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus* realizado após o tratamento de *pools* de fêmeas não ingurgitadas pelo “Protocolo 2”.

Amostra	C _t	T _m
1	Negativo	61,5
2*	38,3	80,3
3	37,4	76,4
4*	35,3	80,0
5	Negativo	61,4
6	36,7	62,7
7	Negativo	61,7
8	35,9	64,9
9*	32,3	81,0
10	34,4	65,4
11	34,2	75,5
12	Negativo	61,4
13*	36,8	80,1
14	35,1	64,9
15	Negativo	61,4
16	Negativo	61,5
17*	36,0	78,4
18	Negativo	61,4
19*	38,0	79,8
20	35,1	64,5
21	35,6	65,8
22*	35,3	78,5
23	35,3	65,1
24	35,2	65,2
25*	34,8	80,3
26	35,8	64,9
27	Negativo	61,5
28	35,4	65,1
29*	35,5	80,4
30	35,4	65,5
31	Negativo	61,5
32	35,6	64,6
33*	33,6	79,3
34	37,9	65,1
35*	32,3	81,0
36	36,9	64,3
37	37,0	63,6
38*	36,3	80,6
39	35,4	65,2
C+ (4FC 1:10)	30,6	81,0
Branco	Negativo	61,5

No quadro, * = Amostras de fêmeas não ingurgitadas positivas na PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus*, cujos produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para detecção da banda de interesse. Em negrito aparecem as amostras com resultado positivo no gel.

Figura 15. Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos com resultado positivo na PCR em tempo real do gene *NS5* de *Flavivirus* das amostras de fêmeas não ingurgitadas analisadas pelo “Protocolo 2”. Na figura: 1 e 11 = Marcador de peso molecular (GeneRuler 50bp DNA Ladder – Thermo Sientific), 4 e 13 = amostras positivas, 15 = controle positivo (mosquito infectado com DENV), 16 = controle negativo. As demais linhas possuem amostras com resultado positivo na reação, porém não apresentam banda em gel de agarose.

Figura 16. Foto de gel de agarose (2,5%) corado com brometo de etídio, após eletroforese dos produtos da semi-nested PCR do gene *NS5* de *Flavivirus* das amostras de fêmeas não ingurgitadas analisadas pelo “Protocolo 2”, positivas no gel da PCR em tempo real do gene *NS5*. Na figura: 1 e 20 = Marcador de peso molecular (GeneRuler 50bp DNA Ladder – Thermo Sientific), 2, 3, 5, 6, 8-11, 14 e 15 = amostras positivas, 18 = controle positivo (mosquito infectado com DENV), 19 = controle negativo. As demais linhas possuem amostras com resultado negativo na reação.

4.2.2.3 Fêmeas ingurgitadas

Dos 80 *pools* de fêmeas ingurgitadas, 21 foram positivos na PCR em tempo real do gene *NS5*, tendo apresentado $C_T < 40^\circ\text{C}$ e T_m esperada. No entanto, nenhum apresentou banda após eletroforese em gel de agarose realizado com os produtos da reação em questão.

4.3 Sequenciamento de nucleotídeos

Um total de 19 sequências de nucleotídeos foi obtido a partir de *pools* de fêmeas não ingurgitadas. Duas delas após análise das amostras pelos “Protocolos 1” e “2”, sendo as demais oriundas do emprego do “Protocolo 2”.

Dessa forma, confirmou-se a positividade para RNA de *Flavivirus* em 2,3% (19/818) das amostras analisadas. A comparação destas sequências com aquelas do GenBank revelou que o material obtido estava relacionado à *Culex flavivirus* e *Aedes flavivirus*. No Quadro 15 encontram-se as características dos *pools* positivos.

Quadro 15. Características dos *pools* de fêmeas não ingurgitadas em que foram detectadas sequências de RNA de *Flavivirus*. As informações aparecem segundo categoria taxonômica dos mosquitos, número de exemplares por *pool*, local e data de coleta dos mosquitos, protocolo utilizado para detecção de RNA de *Flavivirus* e RNA viral encontrado.

Amostra	Categoria taxonômica	Nº de exemplares	Parque	Data de coleta	Protocolo	RNA viral
1	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	2	Shangrilá	28/3/2011	2	CxFV
2	<i>Ae. albopictus</i>	2	Santo Dias	11/4/2011	2	AeFV
3	<i>Ae. albopictus</i>	1	Shangrilá	18/4/2011	2	AeFV
4	<i>Cx. grupo Coronator</i>	3	Santo Dias	9/5/2011	2	CxFV
5	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	9	Shangrilá	20/6/2011	2	CxFV
6	<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	10	Shangrilá	20/6/2011	2	CxFV
7	<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	5	Ibirapuera	14/7/2011	2	CxFV
8	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	Ibirapuera	14/7/2011	2	CxFV
9	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	Anhanguera	6/8/2011	2	CxFV
10	<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	5	Santo Dias	8/8/2011	1 e 2	CxFV
11	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	Santo Dias	8/8/2011	2	CxFV
12	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	2	Chico Mendes	9/8/2011	2	CxFV
13	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	Shangrilá	12/9/2011	1 e 2	CxFV
14	<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	6	Shangrilá	12/9/2011	2	CxFV
15	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	Santo Dias	10/10/2011	2	CxFV
16	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	5	Santo Dias	10/10/2011	2	CxFV
17	<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	7	Ibirapuera	24/10/2011	2	CxFV
18	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	Shangrilá	7/11/2011	2	CxFV
19	<i>Cx. (Cux.) sp.</i>	2	Shangrilá	12/12/2011	2	CxFV

No Quadro 15, observa-se que os parques Shangrilá e Santo Dias foram aqueles que apresentaram o maior número de amostras positivas, sendo 42% (8/19) dos *pools* positivos provenientes do Pq. Shangrilá e 31,5% (6/19) do Pq. Santo Dias. Além disso, nota-se que, 89,5% (17/19) dos *pools* foram positivos para CxFV e apenas 10,5% (2/19) para AeFV. Por fim, dentre aqueles positivos para

CxFV, os compostos por *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. (Cux.)* sp. foram os que apresentaram maior positividade: 58,8% (10/17) e 35,3%, respectivamente.

Na Figura 17 é possível observar que há amostras positivas de parques de diferentes regiões da cidade e que a porcentagem de *pools* de mosquitos positivos para RNA de *Flavivirus* de cada parque foi de 0,8%, 3,8%, 2,7%, 1,8% e 1,2% nos Parques Anhanguera, Santo Dias, Shangrilá, Ibirapuera e Chico Mendes, respectivamente.

Figura 17. Mapa da cidade de São Paulo com os locais de estudo apontados por setas pretas. Nos quadros, junto com o nome dos parques, observa-se: o número de *pools* positivos/número de *pools* de mosquitos analisados e a porcentagem das amostras positivas por parque.

Após reconstrução filogenética, as sequências das amostras positivas foram agrupadas com sequências de CxFV e AEFV do GenBank (Figura 18).

A distância genética entre as 17 sequências de CxFV dos parques municipais de São Paulo foi calculada e revelou que as mesmas apresentaram similaridade de 96%. A mesma similaridade foi obtida quando o cálculo de distância foi realizado com tais sequências e outras 17 do GenBank, de CxFV dos EUA, China e Japão.

Figura 18. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento de aproximadamente 200 nucleotídeos de sequências do gene NS5 de *Flavivirus*. A reconstrução foi realizada pelo programa Beast 1.8, com 50 milhões de corridas e amostragem e burn-in de 10%. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi o TrNef G+I. A árvore foi realizada a partir de 83 sequências, sendo 20 obtidas no presente trabalho (19 de amostras positivas- em vermelho e uma de um controle positivo-DENV2_Brasil) e 63 do GenBank. Na figura, para cada sequência, aparecem as seguintes informações: Número de acesso do GenBank, nome do vírus, mosquito no qual o vírus foi isolado/detectado, local onde o mosquito foi coletado (não se aplica às sequências de DENV 1-4 e YFV).

5 DISCUSSÃO

A presença de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* tem sido documentada na cidade de São Paulo nas últimas décadas (Urbiniatti et al., 2001; Taípe-Lagos e Natal, 2003; Laporta et al., 2006; Montes, 2005; Moraes et al., 2006; Silvério e Urbinatti, 2011).

Recente estudo de biodiversidade de culicídeos em parques municipais da cidade de São Paulo, do qual o presente trabalho foi um subprojeto, confirmou os relatos anteriores da existência de relativa riqueza de mosquitos neste meio urbano. Numa fase inicial, realizada entre 2010 e 2011, coletou-se 7.015 mosquitos imaturos e adultos de 59 parques das regiões sul, norte, centro-oeste e leste da cidade. Dos mosquitos coletados, identificou-se a presença de 12 gêneros e 53 categorias taxonômicas. *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. (Cux.) sp.*, *Cx. declarator* e *Aedes fluviatilis* foram as categorias taxonômicas mais abundantes, representando 23,75%, 15,21%, 13,86% e 10,14%, respectivamente, do número total de exemplares coletados (Medeiros-Sousa et al., 2013). Num segundo período, entre os anos de 2011 e 2013, dez destes parques foram selecionados e acompanhados por um ano. Entre os exemplares do gênero *Culex*, as espécies mais abundantes foram: *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*; enquanto entre os mosquitos *Aedes* foram: *Ae. albopictus*, *Ae. scapularis* e *Ae. fluviatilis* (Medeiros-Sousa, 2014).

É interessante observar que sete dos parques escolhidos no trabalho de Medeiros-Sousa (2014) foram os mesmos locais em que foram realizadas as coletas de mosquitos no presente trabalho, em que *Culex* e *Aedes* também foram os gêneros de culicídeos que mais ocorreram, destacando-se as seguintes

categorias taxonômicas: *Cx. (Cux.) sp.*, *Cx. nigripalpus*, *Ae. scapularis* e *Ae. fluviatilis*.

Estes dois gêneros são de grande importância médica visto que possuem espécies que podem transmitir patógenos ao homem. Dentre aqueles do gênero *Culex*, sobressaem-se *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. coronator* e *Cx. declarator*. Todos estes têm potencial para atuar na transmissão de arbovírus, como SLEV e WNV (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

Dentre as espécies do gênero *Culex*, *Cx. quinquefasciatus* merece ser mencionado, pois além do incômodo que causa à população humana, transmite, em algumas regiões do Brasil, o parasito *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose. Ademais, é vetor em potencial de arbovírus patogênicos ao homem, apresentando importância na transmissão de WNV. Trata-se de uma espécie associada à presença de água estagnada e com elevada carga de matéria orgânica (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Natal e Ueno, 2004).

Nos trabalhos referidos anteriormente, *Cx. quinquefasciatus* foi a única espécie coletada, foi a mais abundante ou esteve entre as dominantes (Urbiniatti et al., 2001; Taípe Lagos e Natal, 2003; Laporta et al., 2006; Moraes et al., 2006; Silvério e Urbiniatti, 2011; Medeiros-Sousa et al., 2013; Medeiros-Sousa, 2014). Estes dados diferem dos apresentados no presente trabalho, em que apenas 3,3% dos mosquitos (170/5213) foram identificados como tal. Este baixo percentual pode ser explicado pela dificuldade encontrada na identificação dos exemplares devido aos danos sofridos pelos mosquitos durante as etapas de coleta, triagem, armazenamento e transporte dos mesmos ao laboratório. Assim, é possível que exemplares de *Cx. quinquefasciatus* tenham sido identificados como *Cx. (Cux.) sp.*, que foi a categoria taxonômica que mais ocorreu no presente trabalhos (41%). Outra explicação pode decorrer do afastamento dos parques investigados de áreas

que concentram coleções aquáticas com elevada carga orgânica, onde proliferam tais mosquitos.

Outras espécies de *Aedes* detectadas no presente trabalho e que merecem destaque são *Aedes albopictus*, *Ae. scapularis* e *Ae. fluviatilis*. O primeiro é vetor confirmado dos vírus da dengue na Ásia e em laboratório foi capaz de transmitir 22 arbovírus, dentre os quais estavam DENV e YFV (Gratz, 2004). O segundo é capaz de transmitir ILHV em ambiente natural e ROCV em laboratório. Por fim, *Ae. fluviatilis* pode infectar-se com YFV em laboratório e existe a hipótese não confirmada de que poderia transmitir este vírus em ambiente natural (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994 e Forattini, 2002).

Dessa forma, fica evidente que mosquitos potencialmente vetores de arbovírus, e por isso considerados de importância para a Saúde Pública, foram encontrados nos sete parques municipais da cidade de São Paulo, sendo submetidos à pesquisa de RNA de *Flavivirus*.

No presente trabalho, dois protocolos de detecção de *Flavivirus* foram utilizados para a análise dos mosquitos. Os dados obtidos indicam que o “Protocolo 2” é mais sensível que o “Protocolo 1”, uma vez que 17 amostras consideradas negativas pelo primeiro foram positivas após o emprego do segundo. Este último consiste apenas das etapas de extração de ácidos nucleicos de mosquitos, seguida de transcrição reversa e PCR, tratando-se do protocolo comumente utilizado em trabalhos de detecção de *Flavivirus* em mosquitos (Cook et al., 2006, 2009; Jansen et al., 2009; Figueiredo et al., 2010; Kemenesi et al., 2014; Pauvolid Corrêa et al., 2015; Rizzo et al., 2014). Assim, o presente trabalho confirma o sucesso obtido quando tais etapas são empregadas.

É importante frisar que o RNA é reconhecido como uma molécula instável (Sambrook e Russel, 2002). Esta condição exige cuidados relacionados à

manipulação dos mosquitos coletados (morte por congelamento, armazenamento a -70°C e identificação em mesa refrigerada), relatados em diversos estudos (Huang et al., 2001; Jansen et al., 2009; Cook et al., 2009; Figueiredo et al., 2010; Ibarra-Juarez et al., 2012), que devem ser observados para que um protocolo que utilize estas duas etapas, extração e RT-PCR, tenha sucesso.

No presente trabalho, o “Protocolo 1” envolveu as etapas de extração, tratamento das amostras com DNase, transcrição reversa, diluição do cDNA (1:100), PCR do gene *18S* e *NS5*. A PCR do gene *18S* (LaBeaud et al., 2011) foi utilizada como controle interno, com o objetivo de detectar cDNA dos mosquitos. As etapas de DNase e diluição do cDNA foram incluídas no “Protocolo 1” com a finalidade de se obter bom funcionamento desta reação, visto que as muitas cópias de DNA ribossômico de mosquitos poderiam inibir a reação ou ainda ser detectadas no lugar do cDNA. No entanto, a inclusão destas duas etapas prejudicou a sensibilidade da reação de PCR do gene *NS5*.

Dentre os trabalhos de pesquisa de *Flavivirus* consultados, nenhum relata o uso de reação de controle interno, com exceção do de LaBeaud et al. (2011). No entanto estes autores comentam que não fizeram o uso de DNase antes da reação em questão. Como mencionado no parágrafo anterior, no presente trabalho, o uso da DNase foi inserido para que se pudesse ter resposta apenas referente ao RNA. O fato de 816/818 (99,8%) *pools* de mosquitos apresentarem resultado positivo na PCR do gene *18S* mostra que o RNA pôde ser detectado após todas as etapas às quais as amostras foram submetidas.

Assim, tendo em vista a perda de sensibilidade observada na aplicação do “Protocolo 1”, recomenda-se o emprego do “Protocolo 2”, mas enfatiza-se a necessidade de atenção à manipulação das amostras visando evitar perda de RNA viral. Tal cuidado deve ser adotado uma vez que, com a ausência da etapa de

tratamento das amostras com DNase, o DNA não é eliminado. Logo, a reação do gene *18S* de mosquitos detectará principalmente DNA genômico, não podendo ser utilizada como controle de RNA. Embora os resultados obtidos indiquem a maior sensibilidade do “Protocolo 2”, quando este foi utilizado, notou-se alto número de amostras com resultado falso positivo (145 de fêmeas não ingurgitadas e 21 de fêmeas ingurgitadas), cuja positividade não foi confirmada após eletroforese em gel de agarose ou semi-*nested* PCR do gene *NS5*.

Duas possibilidades poderiam explicar tal fato. Uma delas é a de que estas amostras poderiam ter baixa carga viral e por isso o resultado não teria sido confirmado no gel de agarose, que é menos sensível. A outra é a de baixa especificidade da PCR em tempo real adotada. Tal reação apresenta vantagens, tais como a capacidade de detectar diversas espécies de *Flavivirus* devido ao uso de *primers* degenerados e o pequeno tamanho do produto obtido, adequado à detecção por incorporação do Sybr Green e análise pós-PCR (Johnson et al., 2010). No entanto, os mesmos autores comentam que medidas mais precisas de curvas de dissociação geradas dos amplicons poderiam favorecer a especificidade da reação. Por fim, também sugerem que o emprego de sondas Taqman sejam utilizadas quando o estudo de detecção for destinado a uma determinada espécie viral.

A PCR em tempo real é sensível, rápida e prática, mas ainda são poucos os estudos que a utilizam em se tratando de detecção de *Flavivirus* em homogeneizados de mosquitos. Devido à necessidade de superar desafios relacionados a uma PCR em tempo real para *Flavivirus*, recomenda-se que outros protocolos sejam testados e aprimorados.

No presente trabalho, os mosquitos foram submetidos à detecção de *Flavivirus*. Entre as 19 amostras positivas, RNA relacionado a dois *Flavivirus* de insetos, CxFV e AEFV, foi encontrado.

Da mesma maneira, diversos autores tem relatado o encontro exclusivo de *Flavivirus* de insetos em suas pesquisas, como é o caso de Sang et al. (2003), Cook et al. (2006, 2009), Hoshino et al. (2007), Morales-Betoulle et al. (2008), Kim et al. (2009), Farfan Ale et al. (2009), Blitvich et al. (2009), Saiyasombat et al. (2010) e Machado et al. (2012) (Quadro 1), sendo importante destacar que o crescente emprego da RT-PCR aliada ao uso de iniciadores para *Flavivirus* vem contribuindo para o aumento deste tipo de achado nos estudos de vigilância, distribuição e biodiversidade deste gênero.

Os resultados apresentados mostraram maior número de amostras positivas para CxFV (17/19 ou 89,5%) do que para AEFV (2/19 ou 10,5%). Isso pode ser explicado pelo fato de que 74% dos *pools* de mosquitos analisados pertenceram ao gênero *Culex*, ao passo que apenas 20% pertenceram ao gênero *Aedes*. Além disso, CxFV foi encontrado apenas em exemplares de *Culex*, enquanto AEFV, apenas em *Aedes*, o que mostra uma divisão interna dentro dos *Flavivirus* de insetos, já observada por Hoshino et al. (2007 e 2009), existindo dois grupos: relacionados à *Culex* e relacionados à *Aedes*.

Isolado pela primeira vez no Japão por Hoshino et al. (2009), AEFV foi também encontrado na Itália (Calzolari et al., 2010; Rizzo et al., 2014), sendo poucos ainda os relatos sobre este vírus. Dessa forma, os achados do presente estudo parecem ser os primeiros no que diz respeito à detecção de RNA viral relacionado à AEFV na América. Em relação ao mosquito hospedeiro, este vírus foi encontrado, até o momento, somente em *Aedes albopictus*, o que foi confirmado neste estudo.

Dentre os *Flavivirus* de insetos, CxFV é aquele que apresenta maior número de relatos. Desde o seu primeiro isolamento, realizado a partir de mosquitos coletados no Japão e Indonésia entre os anos de 2003 e 2004, o vírus foi isolado ou detectado em mosquitos da Guatemala (Morales-Betoulle et al. 2008), México (Farfan Ale et al., 2009, Saiyasombat et al., 2010), EUA (Kim et al., 2009, Blitvich et al., 2009), Trinidad (Kim et al., 2009), Uganda (Cook et al., 2009), e de São José do Rio Preto, SP, Brasil (Machado et al., 2012) (Quadro 1). Assim, o presente trabalho contribui para o conhecimento da distribuição deste vírus pelo mundo.

Dos 17 *pools* em que CxFV foi encontrado, a maior parte foi de *Cx. quinquefasciatus* (10/17 ou 58,8%), seguido por *Cx. (Cux.) sp.* (6/17 ou 35,3%). Esses dados permitem inferir que, nas áreas estudadas, o principal mosquito hospedeiro de CxFV seja *Cx. quinquefasciatus*. Além desta constatação, como discutido anteriormente, é possível que entre os exemplares de *Cx. (Cux.) sp.*, categoria taxonômica encontrada em maior número no presente trabalho, estejam alguns de *Cx. quinquefasciatus* que teriam chegado ao laboratório sem as estruturas necessárias para a identificação em nível de espécie. Outro achado do estudo que poderia reforçar a possibilidade de *Cx. quinquefasciatus* como principal hospedeiro de CxFV é o fato de que somente 3,3% (170/5213) dos mosquitos analisados foram desta espécie e em termos de *pools*, apenas 4,7% (39/818).

Conforme observado no Quadro 1, em muitos outros estudos, realizados em diferentes países, CxFV foi encontrado em *Cx. quinquefasciatus* (Hoshino et al., 2007; Morales-Betoulle et al., 2008; Farfan Ale et al., 2009; Kim et al., 2009; Cook et al., 2009). No Brasil, os mosquitos infectados por CxFV de São José do Rio Preto foram identificados em nível de gênero (Machado et al., 2012), não sendo possível realizar comparação da espécie hospedeira.

CxFV também foi encontrado em outras espécies de *Culex* (Quadro 1), sendo estas: *Cx. pipiens* (Hoshino et al., 2007; Blitvich et al., 2009), *Cx. tritaeniorhynchus* (Hoshino et al., 2007), *Cx. restuans* (Kim et al., 2009) e *Cx. tarsalis* (Blitvich et al., 2009).

Em um estudo, realizado no México, pesquisa de CxFV foi feita em espécies de *Culex*, com exceção de *Cx. quinquefasciatus*, e o vírus foi detectado em dois pools de *Cx. interrogator* (Saiysombat et al., 2010). Assim, os autores concluíram que o espectro de hospedeiros de CxFV no México não estaria restrito a *Cx. quinquefasciatus*. Além disso, comentam que as outras quatro espécies de *Culex* em que o vírus também foi procurado foram negativas, porém, uma vez que poucos espécimes foram analisados, tais espécies não poderiam ser descartadas como possíveis hospedeiras de CxFV.

Apesar dos relatos descritos nos parágrafos anteriores, diversos autores concordam que mais estudos são necessários para se conhecer a diversidade de hospedeiros dos *Flavivirus* restritos a mosquitos e a especificidade destes a determinados hospedeiros (Sang et al., 2003; Hoshino et al., 2007; Farfan Ale et al., 2009; Saiyasombat et al., 2010).

Para Cook et al. (2009), a determinação precisa de um vetor viral pode ser difícil, visto que a identificação baseada na morfologia dos mosquitos está sujeita a erros e que algumas espécies de *Culex* só podem ser identificadas pela dissecação da genitália do macho. Tais autores realizaram filogenia molecular do gene *COI* dos exemplares de mosquitos positivos para vírus, e recomendam que não só este gene, mas também o *ITS2* sejam utilizados em trabalhos futuros, principalmente naqueles que envolvem espécies crípticas, como *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens*.

No presente trabalho, muitos exemplares foram identificados como *Cx. (Cux.)* sp. Assim, a filogenia molecular poderia ser uma ferramenta útil para esclarecer os hospedeiros de CxFV. No entanto, seu emprego tornaria exaustiva a rotina laboratorial, visto que os mosquitos teriam que ser macerados individualmente antes da composição dos *pools* devido a possibilidade de existirem diferentes espécies de *Culex* compondo um *pool* de *Cx. (Cux.)* sp.

Outro tópico que merece ser comentado é a frequência com que CxFV vem sendo encontrado em diferentes trabalhos. A comparação dos dados obtidos no presente trabalho com os da literatura não pôde ser realizada, uma vez que os outros estudos encontrados apresentam diferenças relacionadas ao número e às espécies de mosquitos coletados, ao número de mosquitos que compõem os *pools*, a dimensão da área de coleta e ao protocolo para detecção de *Flavivirus*. No entanto, algumas observações podem ser efetuadas.

Levando-se em consideração aqueles estudos em que *Cx. quinquefasciatus* foram analisados por RT-PCR, as frequências de mosquitos encontrados positivos para CxFV foram: 0,24% (1/419 mosquitos) em Uganda (Cook et al., 2009), 3,8% (8/210 *pools*) na Guatemala (Morales Betoulle et al., 2008) e 70% (145/210 *pools*) no México (Farfan Ale et al., 2009). No presente trabalho, observa-se que 2% (17/818) dos *pools* analisados foram positivos para CxFV ou ainda, 25% (10/39), se considerada apenas a positividade dos *pools* de *Cx. quinquefasciatus*. Nota-se também que Machado et al. (2012) encontraram uma positividade de 50%, enquanto, no presente trabalho, este número seria de 2,8% (17/612) se considerados apenas os *pools* de *Culex* analisados. Dessa forma, observa-se que a frequência de CxFV ainda não é conhecida e que mais estudos precisam ser realizados para que este tópico seja esclarecido, bem como os fatores que nele interferem.

Dentre os parques nos quais ocorreram as coletas de mosquitos, o Shangrilá apresentou maior número de amostras positivas (8/19 ou 42,1%), seguido pelo Santo Dias (6/19 ou 31,5%). Estes foram também os locais em que mais mosquitos foram coletados, o que poderia explicar a positividade mais elevada. No entanto, mosquitos positivos também foram encontrados nos Parques Ibirapuera (3/19 ou 15,7%), Anhanguera (1/19 ou 5,3%) e Chico Mendes (1/19 ou 5,3%). Assim, observa-se que houve amostras positivas nas regiões sul, leste e norte da cidade, podendo-se afirmar que os *Flavivirus* de insetos estariam localizados em uma ampla área geográfica na cidade de São Paulo.

No presente trabalho, não só fêmeas não ingurgitadas, mas também as ingurgitadas foram submetidas a detecção de *Flavivirus*, sendo estas últimas todas negativas. É preciso cautela na interpretação dos resultados obtidos após a pesquisa de *Flavivirus* em fêmeas ingurgitadas, uma vez que o resultado positivo pode causar incerteza a respeito da fonte viral, não sendo possível esclarecer se o vírus estaria causando infecção no mosquito ou apenas presente no sangue ingerido pela fêmea. Foi o que ocorreu na investigação realizada durante a epidemia de ROCV, no Vale do Ribeira. Na ocasião, o vírus foi isolado a partir de um *pool* de mosquitos da espécie *Psorophora ferox*; porém, a presença de uma fêmea ingurgitada naquele *pool* trouxe dúvidas sobre a infecção dos mosquitos por ROCV (Lopes et al., 1981). Apesar disso, a pesquisa de vírus em fêmeas ingurgitadas é importante, pois a positividade encontrada pode não comprovar a infecção no mosquito, mas mostrar a circulação do vírus em uma região, sendo recomendável analisar fêmeas ingurgitadas separadamente das não ingurgitadas, como feito na presente pesquisa e no estudo de Cook et al. (2006).

As fêmeas ingurgitadas são reconhecidas como de interesse para o estudo de hábito alimentar dos mosquitos, o qual gera informações que permitem

compreender melhor a epidemiologia e o ciclo de transmissão dos arbovírus (Marassá et al., 2008; Garcez-Rejon et al., 2010; Lorosa et al., 2010).

Dentre as fêmeas ingurgitadas obtidas no presente trabalho (Quadro 4), os exemplares de *Culex* apareceram em maior número (88%), sendo *Cx. (Cux.)* sp., *Cx. nigripalpus* e *Cx. quinquefasciatus* as principais categorias taxonômicas. No gênero *Aedes*, que representou 11,8% dos exemplares coletados, *Ae. scapularis* e *Ae. fluviatilis* foram os mais abundantes.

A preferência alimentar de mosquitos destas e de outras categorias taxonômicas foi analisado por Carvalho et al. (2013). Estes autores coletaram 510 fêmeas ingurgitadas de 14 espécies de mosquitos provenientes dos sete parques municipais abrangidos no presente trabalho. PCR com iniciadores que amplificam fragmento do gene *cytb* de aves, gatos, cães, roedores, humanos e primatas não humanos foi realizada. Os mosquitos alimentaram-se em todos os vertebrados testados, com exceção de gatos. No entanto, não foi observada associação entre espécie de mosquitos e fonte de alimentação, o que mostrou característica oportunista das fêmeas em questão. Dessa forma, segundo os referidos autores, as fêmeas de mosquitos da área de estudo estariam realizando repasto sanguíneo em vertebrados envolvidos em ciclos de transmissão de *Flavivirus*.

Em relação às sequências de nucleotídeos resultantes das amostras positivas do presente trabalho, estas se agruparam com sequências de CxFV (17/19 ou 90%) e AEFV (2/19 ou 10%).

Na árvore filogenética (Figura 18), observa-se a presença dos dois possíveis genótipos dentro de CxFV, já descritos anteriormente (Kim et al., 2009; Blitvich et al., 2009; Cook et al., 2009; Machado et al., 2012). Um deles compreende os isolados da Ásia e América do Norte e o outro, no qual se enquadraram as

sequências de CxFV obtidas no presente trabalho, ocorrem isolados da África e América Latina.

Foi possível observar que os isolados de CxFV do presente trabalho agruparam-se (Figura 18). Além disso, a identidade entre eles foi de 96%. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, como descrito a seguir.

Hoshino et al. (2007) isolaram nove cepas de CxFV de três espécies de mosquitos diferentes, provenientes de seis localidades do Japão e de uma da Indonésia. Apesar destas diferenças, todos os isolados se agruparam em um único clado após análise filogenética da proteína E.

Em outro estudo, realizado na Guatemala, *pools* de mosquitos positivos foram detectados por RT-PCR que amplifica fragmento do gene *NS5* de *Flavivirus*. A comparação dos nucleotídeos das oito sequências amplificadas revelou que estas apresentavam identidade de 100% (Morales-Betoulle et al., 2008).

No México, mais de 7.000 mosquitos foram agrupados em 210 *pools*, submetidos a RT-PCR que amplifica fragmento do gene *NS5* de *Flavivirus*. As 145 amostras positivas geraram sequências que apresentaram identidade entre si (Farfan Ale et al., 2009).

Além dos relatos anteriores, Saiyasombat et al. (2010) concluíram haver pequena diversidade genética entre os isolados de CxFV do México. Após realizarem sequenciamento do gene da proteína E de 18 isolados de CxFV do México, observaram que a identidade entre tais sequências foi de 99,2 a 100%. Além disso, a identidade destas sequências também foi alta (99,5% em nível de nt) quando comparada a do primeiro isolado de CxFV do México, do trabalho de Farfan-Ale et al (2009).

É interessante observar que a possibilidade do resultado de alta identidade entre as sequências de CxFV da cidade de São Paulo ter sido ocasionado por

contaminação entre as amostras fica excluída na medida em que se observa que tais isolados não são idênticos (Figura 18). Além disso, como relatado nos parágrafos anteriores, a alta identidade de CxFV vem sendo descrita entre os isolados de outros países.

Em relação à filogenia de AEFV, os poucos relatos sobre o vírus ainda não permitem observar variabilidade interna dentro da espécie. Apesar desta limitação, o fato dos isolados do presente trabalho não terem se agrupado juntamente com os demais AEFV indica que é possível existir uma divisão interna dentro da espécie, como observado em CxFV. No entanto, para que esta hipótese seja confirmada, AEFV de outras localidades precisam ser isolados/detectados e submetidos a análises filogenéticas.

O gene *NS5* vem sendo amplamente utilizado em pesquisas de *Flavivirus* em mosquitos (Cook et al., 2006; Morales-Betoulle et al., 2008; Blitvich et al., 2009; Cook et al., 2009; Pabbaraju et al., 2009; Calzolari et al., 2010). Esta opção ocorre, pois se trata de um gene que apresenta regiões conservadas, nas quais iniciadores anelam-se às sequências de *Flavivirus*, sendo comum o uso de iniciadores degenerados a fim de que as diferentes espécies virais possam ser detectadas em apenas uma reação. Além disso, o gene possui regiões menos conservadas, que permitem diferenciar tais *Flavivirus* (Lanciotti, 2003).

No presente trabalho, um fragmento pequeno do gene *NS5* foi sequenciado. No entanto observa-se que não só o tamanho dos fragmentos de interesse, mas também a posição no gene podem variar, o que dificulta a comparação entre as sequências depositadas no GenBank. É o que ocorre entre as sequências obtidas no trabalho de Machado et al. (2012) e as do presente trabalho. Em ambos os estudos utilizou-se o gene *NS5* como alvo, porém regiões diferentes foram amplificadas, não sendo possível comparar as sequências obtidas.

Uma vez que outras regiões do genoma viral, como *NS3* e o gene da proteína *E*, podem ser escolhidas para amplificação e filogenia dos *Flavivirus* (Hoshino et al., 2007; Hoshino et al., 2009; Saiyasombat et al., 2010), seria interessante sequenciar o genoma completo dos vírus encontrados no presente trabalho, para que as sequências obtidas pudessem ser comparadas com aquelas de outros estudos.

Nenhum *Flavivirus* de importância médica foi encontrado entre os mosquitos analisados no presente trabalho. Com as crescentes epidemias de dengue pelo país (Figueiredo, 2010, 2012) esperava-se encontrar DENV. No entanto, seu vetor, o mosquito *Ae. aegypti*, não foi coletado nos sete parques municipais selecionados, embora a cidade de São Paulo seja infestada por este culicídeo.

Medeiros-Sousa (2014), que realizou estudo de biodiversidade de culicídeos nos mesmos locais e períodos que os do presente trabalho, encontraram apenas 47 exemplares de *Aedes aegypti*. No segundo ano de trabalho destes autores, outros três parques foram acompanhados e mosquitos do Pq. Anhanguera continuaram sendo coletados. O número de exemplares de *Ae. aegypti* foi de 563 exemplares, maior do que aquele da etapa anterior, porém ainda pequeno quando comparado ao de outras espécies, como *Cx. nigripalpus* ($n = 8.099$).

É importante notar que os dados do presente trabalho e os de Medeiros-Sousa (2014) referem-se a apenas dez dentre os 103 parques da cidade de São Paulo e que existem parques com diferentes características, podendo estar localizados em áreas mais ou menos urbanizadas, com características diferentes do entorno (São Paulo, 2014) e podendo apresentar maior abundância de *Ae. aegypti*.

Ao se confrontar os resultados da presente pesquisa com trabalhos anteriores que igualmente não relataram a presença de *Aedes aegypti* em parques

(Taípe-Lagos e Natal, 2003; Laporta, 2006; Montes, 2005), torna-se mais evidente que esta é uma espécie antropofílica, altamente adaptada às modificações ambientais feitas pelo homem (Christophers, 1960; Gluber, 1997; Tauil, 2001; Natal, 2002) e entende-se que sua presença, e conseqüentemente a transmissão de dengue, estejam mais relacionadas às áreas residenciais das cidades do que aos redutos verdes representados pelos parques.

No entanto, como visto anteriormente, outros *Flavivirus* de importância médica ocorrem no Brasil e as áreas verdes de São Paulo reúnem condições necessárias para a circulação destes agentes, tais como coleções de água para o desenvolvimento das formas imaturas de mosquitos, espécies de culicídeos conhecidos como vetores de arbovírus e vertebrados como aves e mamíferos que poderiam atuar como reservatórios virais. A detecção de ILHV no Parque Ecológico do Tietê, localizado na periferia de São Paulo no ano de 2001, mostra que *Flavivirus* patogênicos para o homem podem estar presentes nos limites de áreas urbanizadas, sendo possível o início de uma transmissão e até epidemia.

Um exemplo desse tipo de situação foi a introdução de West Nile Virus (WNV) em Nova Iorque. Em agosto de 1999, epidemia de uma doença que causava febre e até mesmo encefalite ocorreu na cidade (Nash et al., 2001). Meses antes, havia relatos de encefalite viral circulando em aves de um zoológico da cidade e, nas semanas anteriores aos primeiros casos humanos, alto número de morte de corvos havia sido registrado. Na ocasião, suspeitou-se que poderia se tratar de SLEV, no entanto, estudos revelaram que o agente etiológico era WNV (Komar, 2000).

A partir de então, o vírus disseminou-se rapidamente para outras regiões da América (Hayes e Gubler, 2006) e há evidências de circulação na América do Sul (Komar e Clark, 2006; Diaz et al., 2008; Mattar et al., 2005; Bosch et al., 2007; Diaz

et al., 2008) e Brasil (Pauvolid-Corrêa et al., 2011; Melandri et al., 2012; Ometto et al., 2013).

No presente estudo, grande número de mosquitos do gênero *Culex* foram analisados, sendo todos negativos para WNV. No entanto, o risco de introdução existe (Luna et al., 2003) e poderia ocorrer inclusive na cidade de São Paulo, que, como mencionado anteriormente, possui mosquitos do gênero *Culex*, com perfil alimentar oportunista, além de aves.

Devido ao risco de introdução deste e de outros *Flavivirus* em novas localidades, observa-se que muitos estudos de vigilância de arbovírus em mosquitos ou aves têm sido realizados em outros países (Farfan-Ale et al., 2009; Ometto et al., 2013; Rizzo et al., 2014; Zuo et al., 2014).

Recentemente, foi feito um estudo de detecção de RNA de *Flavivirus* em aves de duas áreas verdes da cidade de São Paulo, sendo estas o Parque Anhanguera e a Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia (Orico, 2013). Na ocasião, swab de cloaca e orofaringe, além de sangue, foram coletados de 231 aves. A maioria das aves capturadas pertencia à ordem Passeriforme, que apresenta importância devido à competência que possui na transmissão de alguns *Flavivirus*. Embora nenhuma amostra tenha apresentado resultado positivo, estudos como este são de valor visto que alguns parques de São Paulo são lugares frequentados por aves migratórias provenientes do hemisfério norte, que têm chance de estar infectadas por *Flavivirus*, como o WNV, favorecendo a dispersão deste importante patógeno. Desta forma, estudos como os de Orico (2013) e os do presente trabalho justificam-se na medida em que não há programas de vigilância específicos para esta preocupação, nestas localidades.

Apesar da ausência de arbovírus patogênicos para o homem, *Flavivirus* de insetos foram encontrados no presente trabalho. Embora estes vírus não

apresentem importância médica, seu estudo reveste-se de interesse, como assinalado a seguir.

Estes vírus estão amplamente distribuídos em mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*, que dentre os artrópodes que se alimentam de sangue são os principais vetores de *Flavivirus*. Tal fato suporta a conclusão à qual vários autores chegaram após realizarem análises filogenéticas: *Flavivirus* transmitidos por artrópodes, capazes de causar doença em vertebrados, evoluíram a partir de MOF (Camisa Parks et al., 1992, Marin et al., 1995, Kuno et al., 1998, Cook e Holmes et al., 2006, Hoshino et al., 2007). Assim, o estudo dos *Flavivirus* de insetos e a comparação destes com *Flavivirus* transmitidos por artrópodes e *Flavivirus* de vertebrados (sem vetor conhecido) pode fornecer informações sobre a evolução do gênero, ajudar a entender a especificidade destes à seus hospedeiros e a compreender porque alguns deles podem replicar e causar doença em vertebrados e outros não (Hoshino et al., 2007; Saiyasombat et al., 2010).

Outra questão importante é o estudo do papel de MOF na transmissão dos *Flavivirus* de importância em Saúde Pública. Já foi demonstrado que mosquitos infectados por um vírus tornam-se pouco suscetíveis ou refratários a uma infecção subsequente por *Flavivirus* relacionado. Isso se dá devido ao mecanismo de exclusão por superinfecção ou interferência homóloga (Sundin e Beaty, 1988; Burivong et al., 2004; Pepin et al., 2008). No entanto, não se conhece se tal mecanismo ocorre em mosquitos infectados por *Flavivirus* de insetos. No estudo de Kent et al. (2010), mosquitos *Cx. quinquefasciatus* foram divididos em dois grupos: infectados e não infectados por CxFV. Ambos alimentaram-se em sangue infectado por WNV e após duas semanas, a transmissão de WNV foi avaliada. Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, concluindo que a infecção de *Cx. quinquefasciatus* por CxFV não impactou a

transmissão de WNV. Em outro estudo, realizado em área endêmica para WNV em Chigago (EUA), dos 15 mosquitos positivos para WNV, seis (40%) também apresentaram positividade para *CxFV*, mostrando que estes vírus podem coinfectar mosquitos naturalmente e que é possível que infecção por MOF não exclua infecção secundária por outro *Flavivirus*, geneticamente diferente (Newman et al., 2011).

É pertinente ponderar que muitos tópicos sobre os *Flavivirus* de insetos precisam ser esclarecidos e estudos futuros são necessários para que se possa conhecer mais sobre a diversidade de hospedeiro destes vírus, sua distribuição e papel na transmissão dos *Flavivirus* de importância para a Saúde Pública.

O não encontro de *Flavivirus* patogênicos na presente pesquisa não é suficiente para descartar a hipótese destes patógenos circularem nestes ambientes. Desta forma, recomenda-se vigilância de *Flavivirus* nas áreas verdes das cidades visto que estas “ilhas” protegidas servem de habitats para mosquitos vetores e hospedeiros vertebrados, que são os elementos necessários para a transmissão destes agentes, havendo riscos de infecções humanas.

6 CONCLUSÕES

Flavivirus foram detectados em mosquitos de áreas verdes da cidade de São Paulo por meio do método estabelecido (“Protocolo 2”), que representa uma ferramenta útil para uso em vigilância de *Flavivirus* em mosquitos.

Flavivirus de importância médica não foram encontrados nos exemplares de mosquitos estudados. No entanto, em *Culex* e *Aedes* foram detectados CxFV e AEFV, respectivamente, que são pouco conhecidos em mosquitos.

A diversidade genética ficou restrita aos dois *Flavivirus* citados.

REFERÊNCIAS

Aitken TH, Anderson CR, Downs WG. The isolation of Ilheus virus from wild caught forest mosquitoes in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg.* 1956 Jul;5(4):621-5.

Adrian Diaz L, Komar N, Visintin A, Dantur Juri MJ, Stein M, Lobo Allende R, et al. West Nile virus in birds, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:689–91.

Aranda C, Sánchez-Seco MP, Cáceres F, Escosa R, Gálvez JC, Masià M, et al. Detection and monitoring of mosquito flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 Apr;9(2):171-8.

Blitvich BJ, Lin M, Dorman KS, Soto V, Hovav E, Tucker BJ, et al. Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex flavivirus*, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *J Med Entomol.* 2009;46:934-41.

Bolling BG, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jul;85(1):169-77.

Bosch I, Herrera F, Navarro JC, Lentino M, Dupuis A, Maffei J, et al. West Nile virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:651–3.

Burivong P, Pattanakitsakul SN, Thongrungrat S, Malasit P, Flegel TW. Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with *Aedes albopictus* densovirus (AaIDNV). *Virology.* 2004;329:261–9.

Bustamante FM, Mata Pires W. Shannon dawn trap: its use in the verification of the durability of residual toxic effects of insecticides. *Folha Med.* 1951;32:53-5.

Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Caimi M, Defilippo F, Maioli G, et al. Arboviral survey of mosquitoes in two northern Italian regions in 2007 and 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010a Nov;10(9):875-84.

Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, et al. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One.* 2010b Dec;5(12):e14324.

Calzolari M, Zé-Zé L, Ruzek D, Vázquez A, Jeffries C, Defilippo F, et al. Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J Gen Virol*. 2012 Jun;93(6):1215-25.

Cammisa-Parks H, Cisar LA, Kane A, Stollar V. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology*. 1992;189(2):511–24.

Carvalho GC. Investigação de fontes alimentares de culicídeos coletados em parques municipais de São Paulo pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2013.

Carvalho GC, Malafronte RS, Miti Izumisawa C, Souza Teixeira R, Natal L, Marrelli MT. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol*. 2014 Jun;39(1):146-52.

Causey OR, Shope RE, Theiler M. Isolation of St. Louis encephalitis virus from arthropods in Pará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1964;13:449.

Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:376230.

Christophers SR. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. New York: Cambridge University Press; 1960.

Coimbra TLM, Nassar ES, Ferreira IB, Pereira LE, Santos RN, Suzuki A, et al. Serologic evidence of human infection by Saint Louis encephalitis virus in Registro, Ribeira Valley, São Paulo State, Brazil. *Virus Rev. Res*. 1997;2(Supl.):166.

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

Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol*. 2006 Apr;87(4):735-48.

Cook S, Holmes EC. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch Virol*. 2006 Feb;151(2):309-25.

Cook S, Moureau G, Harbach RE, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, et al. Isolation of a novel species of flavivirus and new strain of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. J Gen Virol. 2009;90:2669-78.

Crabtree MB, Sang RC, Stollar V, Dunster LM, Miller BR. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. Arch Virol. 2003 Jun;148(6):1095-118.

Crabtree MB, Nga PT, Miller BR. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. Arch Virol. 2009;154(5):857-60.

Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. J Gen Virol. 2004 Jul;85(7):1971-80.

Degállier N, Hervé JP, Rosa APAT, Vasconcelos P, Rosa JFST, Sá Filho G. A ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisas atuais e perspectiva. Rev Fund SESP. 1986;31(2):127-30.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol Biol Evol. 2012;29:1969-73.

Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, et al. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2009 Jan;80(1):85-95.

Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, de Souza LT, Iversson LB. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1994;36:265-74.

Figueiredo LTM. Estudo sobre infecções por arbovírus na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 1985.

Figueiredo LT. History, present and future of Dengue fever in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS (editores). An overview of arbovirology on Brazil and neighboring countries. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. P.154-63.

Figueiredo LTM. The Brazilian Flaviviruses. *Microbes Infect.* 2000;2:1643-9.

Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MP, et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:667-9.

Figueiredo, LTM. Dengue in Brazil during 1999–2009: A review. *Dengue Bull.* 2010 Dec;34:6-12.

Figueiredo LT. Dengue in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(3):285.

Figueiredo MLG, Gomes ACG, Amarilla AA, Leandro AS, Orrico AS, Araujo RF, et al. Mosquitos infected with dengue viruses in Brazil. *Virol J.* 2010;7:152.

Fonseca BF, Figueiredo LTM. Febre amarela. In: Veronesi R, Focaccia R (editores). *Tratado de Infectologia.* São Paulo: Atheneu; 1996. 251-7.

Fonseca BF, Figueiredo LTM. Dengue. In: Veronesi (ed). *Tratado de Infectologia.* São Paulo: Atheneu; 2005. P. 343-56.

Forattini OP, de Castro Gomes A, Galati EA, Rabello EX, Iversson LB. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no Sistema da Serra do Mar, Brasil. 1 - Observações no ambiente extradomiciliar. *Rev Saude Publica.* 1978a;12(3):297-325.

Forattini OP, de Castro Gomes A, Galati EA, Rabello EX, Iversson LB. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no Sistema da Serra do Mar, Brasil. 2 - Observações no ambiente domiciliar. *Rev Saude Publica.* 1978b;12(4):476-96.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. Synanthropy and epidemiological vector role of *Aedes scapularis* in south-eastern Brazil. *Rev Saude Publica.* 1995;29:199-207.

Forattini OP. *Culicidologia Médica.* São Paulo: EDUSP; 2002. V. 2.

Franco O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop.* 1961;13:43–8.

Franco O. *Historia da febre amarela no Brasil.* Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1976.

Garcez-Rejon J, Blitvich BJ, Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Chi Chim WA, Flores-Flores LF, et al. Host-feeding preference of the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Yucatan State, Mexico. J Insect Sci. 2010;10:32-8.

Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. Clin Lab Med. 2010;30:237-60.

Gomes AC, Rabello EX, Natal D. A new collecting chamber for a CDC-miniature trap. Rev Saude Publica. 1985;19:190-1.

Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. Lancet. 2008;371(9611):500-9.

Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2004;18:215-27.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: Gubler DJ, Kuno G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: CAB International; 1997. P. 1-22.

Gubler D, Kuno G, Markoff L. Flaviviruses. In: Knipe, DM, Howley PM (editors). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Halstead SB. Dengue. Lancet. 2007;370:1644-52.

Hayes EB, Gubler DJ. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. Annu Rev Med. 2006;57:181-94.

Higgs S, Beaty BJ. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: Marquardt WC. Biology of Disease Vectors. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005. P. 167-185.

Hobson-Peters J, Yam AW, Lu JW, Setoh YX, May FJ, Kurucz N, et al. A new insect-specific flavivirus from northern Australia suppresses replication of West Nile virus and Murray Valley encephalitis virus in co-infected mosquito cells. PLOS ONE. 2013;8(2):e56534.

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. Virol. 2007;359:405–14.

Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology*. 2009 Aug 15;391(1):119-29.

Howe DK, Vodkin MH, Novak RJ, Mitchell CJ, McLaughlin GL. Detection of St Louis encephalitis virus in mosquitoes by use of the polymerase chain reaction. *J Am Mosq Control Assoc*. 1992;8:333-5.

Huang C, Slater B, Campbell W, Howard J, White D. Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2001 May;94(1-2):121-8.

Ibarra-Juarez L, Eisen L, Bolling BG, Beaty BJ, Blitvich BJ, Sanchez-Casas RM, et al. Detection of West Nile virus-specific antibodies and nucleic acid in horses and mosquitoes, respectively, in Nuevo Leon State, northern Mexico, 2006-2007. *Med Vet Entomol*. 2012 Sep;26(3):351-4.

ICVT. Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of virus. Eight report of the International Committee on the Taxonomy of Virus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desseberger U, Ball LA (editores). San Diego: Elsevier Academic press; 2005. p. 981-998.

Iversson LB. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovirus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. *Rev Saude Publica*. 1980;14(1):9-35.

Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa J, Eleuterio GC, Prado, JA. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus na população humana da região do Vale do Ribeira. I. Seguimento sorológico de grupo populacional residente em ambiente silvestre. In: *Simpósio Internacional sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas*; Belém, 1980.

Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa J. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. II – Inquérito em pacientes do Hospital Regional de Pariqueira-Açú, 1980. *Rev Saude Publica*. 1981;15:587-602.

Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa J, Costa CS. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. III - Inquérito em coabitantes com casos de encefalite por *Flavivirus* Rocio. *Rev Saude Publica*. 1982;16(3):160-70.

Iversson LB. Rocio encephalitis. In: Monath TP. The arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton: CRC Press;1988. v. 4, p. 77-92.

Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Rosa MDB. Ocorrência recente de infecção humana por arbovirus Rocio na região do Vale do Ribeira. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1989;31(1):28-31.

Iversson LB, Tiriba AC. Encefalite por arbovirus Rocio. In: Veronesi R, Focaccia R, Dietze R (editores). Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 166-73.

Jansen CC, Prow NA, Webb CE, Hall RA, Pyke AT, Harrower BJ et al. Arboviruses isolated from mosquitoes collected from urban and peri-urban areas of eastern Australia. J Am Mosq Control Assoc. 2009;25:272-8.

Johnson BW, Cruz C, Felices V, Espinoza WR, Manock SR, Guevara C, et al. Ilheus Virus Isolate from a Human, Ecuador. Emerg Infect Dis. 2007;13(6):956-8.

Johnson N, Wakeley PR, Mansfield KL, McCracken F, Haxton B, Phipps LP, et al. Assessment of a Novel Real-Time Pan-Flavivirus RT-Polymerase Chain Reaction. Vector Born Zoonotic Dis. 2010;10(7):665-71.

Karabatsos N. International catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. 3a. ed. San Antonio: The American Society for Tropical Medicine and Hygiene; 1985.

Kemenesi G, Krtinic B, Milankov V, Kutas A, Dallos B, Oldal M, et al. West Nile virus surveillance in mosquitoes, April to October 2013, Vojvodina province, Serbia: implications for the 2014 season. Euro Surveill. 2014 Apr 24;19(16):20779.

Kent RJ, Crabtree MB, Miller BR: Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with Culex flavivirus Izabal. PLOS Negl Trop Dis. 2010;4:671.

Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, et al. Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. J Virol Methods. 2007;146:372-4.

Kim DY, Guzman H, Bueno R Jr, Dennett JA, Auguste AJ, Carrington CV, et al. Characterization of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. Virology. 2009;386:154-59.

Komar N. West Nile viral encephalitis. Rev Sci Tech. 2000 Apr;19(1):166-76.

Komar N, Clark GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. Rev Panam Salud Publica. 2006 Feb;19(2):112-7.

Koprowski H, Hughes TP. The virus of Ilheus encephalitis; physical properties, pathogenicity and cultivation. J Immunol. 1946;54(4):371-85.

Kramer LD, Wolfe TM, Green EN, Chiles RE, Fallah H, Fang Y, et al. Detection of encephalitis viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and avian tissues. J Med Entomol. 2002;39:312-23.

Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. J Virol. 1998;72:73-83.

LaBeaud AD, Sutherland LJ, Muiruri S, Muchiri EM, Gray LR, Zimmerman PA, et al. Arbovirus prevalence in mosquitoes, Kenya. Emerg Infect Dis. 2011;17(2):233-41.

Laemmert H, Hughes T. The virus of Ilheus encephalitis: isolation, serological specificity and transmission. J Immunol. 1947;55:61-7.

Lanciotti RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. In: Chambers TJ, Monath TP. The flaviviruses: detection, diagnosis and vaccine development. Advances in virus research (61). Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2003.

Laporta GZ, Urbinatti PR, Natal D. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. Rev Bras Entomol. 2006;50:125-7.

Lequime S, Lambrechts L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. Infect Genet Evol. 2014;28:681-90.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (editors). Fields Virology. 5. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1101-51.

Liu S, Vijayendra D, Bonning BC. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. Viruses. 2011;3:1849-69.

Lopes OS, Coimbra TLM, Sacchetta LA, Calisher CH. Emergence of a new arbovirus disease in Brasil. I: Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. Am J Epidemiol. 1978;107:444-9.

Lopes OS, Sachetta LA, Coimbra TLM, Pereira LE. Isolation of St Louis encephalitis virus in South Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1979;28:583-5.

Lopes OS, Sachetta LA, Francy DB, Jakob WL, Calisher CH. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil III. Isolation of Rocio virus from *Psorophora Ferox* (Humboldt, 1819). Am J Epidemiol. 1981;113(2):122-5.

Lorosa ES, Faria MS, De Oliveira LC, Alencar J, Marcondes CB. Blood meal identification of selected mosquitoes in Rio de Janeiro, Brazil. J Am Mosq Control Assoc. 2010;14:675-81.

Luna EJA, Pereira LE, Souza RP. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? Epidemiol Serv Saude. 2003;12(1):7-19.

Machado DC, Mondini A, Santana VS, Yonamine PTK, Chiaravalloti Neto F, Zanotto PMA, et al. First Identification of Culex flavivirus (Flaviviridae) in Brasil. Interviro. 2012;55:475-83.

Maia FG, Chávez JH, de Souza WM, Romeiro MF, de Castro-Jorge LA, da Fonseca BA, et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. Int J Infect Dis. 2014 Sep;26:96-7.

Manock SR, Jacobsen KH, de Bravo NB, Russell KL, Negrete M, Olson JG, et al. Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon Basin of Ecuador. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(1):146-51.

Marassá AM, Rosa MDB, Gomes AC, Consales CA. Biotin/avidin sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for Culicidae mosquito blood meal identification. Journal Venomous Animals and Toxins including Trop Dis. 2008;14:303-12.

Marin MS, Zanotto PM, Gritsun TS, Gould EA. Phylogeny of TYU, SRE and CFA virus: different evolutionary rates in the genus *Flavivirus*. Virology. 1995;206(2):1133-9.

Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus antibodies in Colombian Horses. Emerg Infect Dis. 2005;11:1497-8.

Medeiros-Sousa AR, Ceretti W Jr, Urbinatti PR, de Carvalho GC, de Paula MB, Fernandes A, et al. Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. J Am Mosq Control Assoc. 2013 Sep;29(3):275-9.

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

Melandri V, Guimarães AE, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez-Sesma A, et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:1073–5.

Mondini A, Cardeal IL, Lázaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. Emerg Infect Dis. 2007a;13(1):176-8.

Mondini A, Bronzoni RVM, Cardeal IL, dos Santos TM, Lázaro E, Nunes SH, et al. Simultaneous infection by DENV 3 and SLEV in Brazil. J Clin Virol. 2007b;40:84-6.

Montes J. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica. 2005;39:578-84.

Morais SA, Marrelli MT, Natal D. Aspectos da distribuição de *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Entomol. 2006;50:413-8.

Morales-Betoulle ME, Monzón Pineda ML, Sosa SM, Panella N, López MR, Córdón-Rosales C, et al. *Culex flavivirus* isolates from mosquitoes in Guatemala. J Med Entomol. 2008;45:1187–90.

Moreno ES, Rocco IM, Bergo ES, Brasil RA, Siciliano MM, Suzuki A, et al. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(3):290-6.

Moureau G, Temmam S, Gonzales JP, Charrel RN, Grard G, Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2007;7(4):467-77.

Nasci RS. A light weight batterypowered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. Mosq News. 1981;41:808-11.

Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. Outbreak of West Nile virus infection, New York City area, 1999. *N Engl J Med*. 2001;344:1807-14.

Natal D, Marucci D. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. *Rev Saude Publica*. 1984;18:418-20.

Natal D. Bioecologia de *Aedes aegypti*. São Paulo, *Biológico*. 2002;62(2):205-7.

Natal D, Ueno HM. Vírus do Nilo Ocidental: características da transmissão e implicações vetorais. *Entomol Vect*. 2004;11:417-33.

Newman CM, Cerutti F, Anderson TK, Hamer GL, Walker ED, Kitron UD, et al. *Culex* flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011 Aug;11(8):1099-105.

Ometto T, Durigon EL, de Araujo J, Aprelon R, de Aguiar DM, Cavalcante GT, et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 Nov;107(11):723-30.

Orico LD. Pesquisa de infecções por Flavivirus sp. em aves silvestres provenientes das áreas verdes do município de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2013.

Pabbaraju K, Ho KC, Wong S, Fox JD, Kaplen B, Tyler S, et al. Surveillance of mosquito-borne viruses in Alberta using reverse transcription polymerase chain reaction with generic primers. *J Med Entomol*. 2009 May;46(3):640-8.

Panon G, Fauran P, Digoutte JP. Isolation of Ilheus virus in french Guyana. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1979;72(4):315-8.

Parreira R, Cook S, Lopes A, de Matos AP, de Almeida AP, Piedade J, et al. Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Res*. 2012 Aug;167(2):152-61.

Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Costa EV, Burlandy FM, Murta M, Pellegrin AO, et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Sep;105(6):829-33.

Pauvolid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LTM, Couto-Lima D, Campos Z, et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(4):467-474.

Pauvolid-Côrrea A, Kenney JL, Couto-Lima D, Campos ZMS, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, et al. Ilheus vírus isolation in the Pantanal, West-Central Brazil. *PLOS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2318.

Pauvolid-Corrêa A, Solberg O, Couto-Lima D, Kenney J, Serra-Freire N, Brault A, et al. Nhimir virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. *Arch Virol*. 2015 Jan;160(1):21-7.

Pepin KM, Lambeth K, Hanley KA. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. *BMC Microbiol*. 2008;8:28.

Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TLM, Souza RP, Chamelet ELB. Arbovírus ilhéus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). *Rev Saude Publica*. 2001;35(2):119-23.

Pinheiro FP, Leduc JW, Travassos da Rosa APA, Leite OF. Isolation from St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. *Am J trop Med Hyg*. 1981;30:145-8.

Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA, Freitas RB, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PFC. Arboviroses: aspectos clínico-epidemiológicos. In: Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: Fundação SESP; 1986. v. 1. p. 375–408.

Posada D. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253-6.

Prías-Landínez E, Bernal-Cubides C, Morales-Alarcón A. Isolation of Ilhéus virus from man in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1968;17(1):112-4.

Reina MCFP, Freitas AC, Fernandes FC, Silva JAM, Garcia MHO, Lise MLZ, et al. Investigação de casos de encefalite viral de Saint Louis, notificados no município de São José do Rio Preto-SP, agosto de 2006. Nota técnica – Secretaria de Estado da Saúde/Coordenadoria de Controles de Doenças/Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”; 2006.

Reisen WK. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res*. 2003;61:139-83.

Rizzo F, Cerutti F, Ballardini M, Mosca A, Vitale N, Radaelli MC, et al. Molecular characterization of flaviviruses from field-collected mosquitoes in northwestern Italy, 2011-2012. *Parasit Vectors*. 2014 Aug;26(7):395.

Rocco IM, Santos CL, Bisordi I, Petrella SM, Pereira LE, Souza RP, et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005 Sep-Oct;47(5):281-5.

Rodaniche E, Galindo P. Isolation of Ilhéus virus from *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala in 1956. *Am J Trop Med Hyg*. 1957;6:686-7.

Rodaniche E, Galindo P. Isolation of the virus of Ilhéus encephalitis from mosquitoes captured in Panamá. *Am J Trop Med Hyg*. 1961;10:393-4.

Roiz D, Vázquez A, Seco MP, Tenorio A, Rizzoli A. Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *Virol J*. 2009 Jul 5;6:93.

Romano-Lieber NS, Iversson LB. Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. *Rev Saude Publica*. 2000;34(3):236-42.

Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MR, et al. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. *PLOS Negl Trop Dis*. 2013 Nov;21(7)(11):2537.

Saiyasombat R, Dorman KS, Garcia-Rejon JE, Loroño-Pino MA, Farfan-Ale JA, Blitvich BJ. Isolation and sequence analysis of *Culex flavivirus* from *Culex interrogator* and *Culex quinquefasciatus* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Arch Virol*. 2010;155:983–6.

Sambrook JE, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. p. 2700.

Sang RC, Gichogo A, Gachoya J, Dunster MD, Ofula V, Hunt AR, et al. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol*. 2003;148:1085–93.

São Paulo. Prefeitura do Município de São Paulo. Fauna Silvestre: quem são e onde vivem os animais na metrópole paulistana. Almeida AF, Vasconcellos MK (Coordenadores). São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, 2007.

São Paulo. Secretaria Municipal de Saúde. Coordenação de Vigilância da Saúde. Número de casos autóctones e incidência (por 100000 habitantes) de dengue segundo distrito administrativo do local provável de infecção (LPI) - município de São Paulo - 2010 a 2014. São Paulo (SP): Secretaria Municipal da Saude, 2014 a. [citado 2015 Março 23]. Disponível em: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/chamadas/01dengue_cc_ci_16_07_2014_1405629331.pdf

São Paulo. Prefeitura do Município de São Paulo. Guia dos parques municipais de São Paulo. 4. ed. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente; 2014b.

Silvério EC, Urbinatti PR. Presença de mosquitos (Diptera: Culicidae) em piscinões na zona leste de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44:504-7.

Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Hall JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. Am J Trop Med Hyg. 1940;20:471–2.

Srihongse S, Johnson CM. The isolation of Ilhéus virus from man in Panama. Am J Trop Med Hyg. 1967;16(4):516-8.

Stollar V, Thomas VL. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. Virol. 1975;64:367–77.

Straatmann A, Santos-Torres S, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Rodrigues SG, Tavares-Neto J. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (Flaviviridae) na Bahia. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(6):511-5.

Sundin DR, Beaty BJ. Interference to oral superinfection of *Aedes triseriatus* infected with La Crosse virus. Am J Trop Med Hyg. 1988;38:428–32.

Taipe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. Rev Saude Publica. 2003;37: 275-9.

Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. Cad Saude Publica. 2001;17:99-102.

Tauil PL. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2010;44(3):555-8.

Tavares-Neto J, Rodrigues SG, Bastos C, Torres-Morales AE, Travassos da Rosa A. Recent occurrence of human infection by Rocio arbovirus in Salvador, Bahia, Brazil. In: XXXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Goiânia, Resumos. p. 78, 1996.

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 Res*. 1997;25 (24):4876–82.

Tiriba AC. Epidemia de encefalite atribuída a arbovírus, ocorrida no litoral sul do estado de São Paulo em 1975: contribuição para o estudo clínico, São Paulo [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1975.

Tiriba AC, Miziara AM, Lourenço R, Costa CRB, Costa CS, Pinto GH. Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul do Estado de São Paulo. *Rev Assoc Med Bras*. 1976;22:415-20.

Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PFC, Pinheiro FP. Arboviroses. In: Leão RNQ (editor). Doenças infecciosas e parasitárias. Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas;1997. p. 207-26.

Travassos da Rosa JFS, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dias LB, et al. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS (editores). An overview of arbovirology on Brazil and neighboring countries. Belém: Instituto Evandro Chagas;1998. p. 19–31.

Tsai TF, Mitchell CJ. St. Louis encephalitis. In: Monath TP. The arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton: CRC Press; 1986. v. 4, p. 113-43.

Turell MJ, O'guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, et al. Isolation of viroses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *J Med Entomol*. 2005;42(5):891-898.

Urbinaatti PS, Sendacz S, Natal D. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. *Rev Saude Publica*. 2001;35:461–6.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1998. p. 72–99.

Vasconcelos PFC. Febre amarela. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(2):275-93.

Vasconcelos PFC, Sperb AF, Monteiro HAO, Torres MAN, Sousa MRS, Vasconcelos HB, et al. Isolations of yellow fever vírus from Haemagogus leucocelaenus in Rio Grande do Sul State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97(1):60-2.

Vasconcelos PF, Travassos-da-Rosa APA, Pinheiro FP, Travassos-da-Rosa JFS. Arboviroses. In: Veronesi R, Focaccia R (editores). Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 289-302.

Vasconcelos PFC. Febre amarela no Brasil: reflexões e hipóteses sobre emergência em áreas previamente livres. Rev Saude Publica. 2010; 44(6):1144-9.

Vázquez A, Sánchez-Seco MP, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, et al. Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012 Mar;12(3):223-9.

Venegas EA, Aguilar PV, Cruz C, Guevara C, Kochel TJ, Vargas J, et al. Ilheus vírus infection in human, Bolivia. Emerg Infect Dis. 2012;18(3):516-8.

Weaver SC, Barret ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nat Rev Microbiol. 2004;2(10):789-801.

Whately M, Santoro PF, Gonçalves BC, Gonzatto AM. Parques Urbanos Municipais de São Paulo: subsídios para a gestão. São Paulo: Instituto Socioambiental; 2008.

WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. WHO Fact Sheet. Geneva: World Health Organization, 2008.

WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Tech Rep Ser. Geneva:World Health Organization, 2009.

Zuo S, Zhao Q, Guo X, Zhou H, Cao W, Zhang J. Detection of Quang Binh virus from mosquitoes in China. *Virus Res.* 2014 Feb;13(180):31-8.

ANEXO A – Fotos do Parque Anhanguera.

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

ANEXO B – Fotos do Parque Santo Dias.

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

ANEXO C – Fotos do Parque Shangrilá.

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

ANEXO D – Fotos do Parque Ibirapuera.

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

ANEXO E – Fotos do Parque do Carmo.

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

Foto: Paulo Roberto Urbinatti

ANEXO F – Fotos do Parque Chico Mendes.

Foto: Maria Helena Silva Homem de Mello

Foto: Maria Helena Silva Homem de Mello

Foto: Maria Helena Silva Homem de Mello

ANEXO G – Fotos do Parque Alfredo Volpi.

Foto: Maria Helena Silva Homem de Mello

Foto: Maria Helena Silva Homem de Mello