Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Avaliação da transmissão vertical de arbovírus em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em condições naturais.

VICTOR HENRIQUE FERREIRA DE LIMA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tamara Nunes de Lima Camara

São Paulo

2019

Victor Henrique Ferreira de Lima

Avaliação da transmissão vertical de arbovírus em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em condições naturais.

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Doenças tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tamara Nunes de Lima Camara

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Lima, Victor Henrique Ferreira de

Avaliação da transmissão vertical de arbovírus em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em condições naturais / Victor Henrique Ferreira de Lima. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Tamara Nunes de Lima Camara

Descritores: 1. AEDES. 2. ARBOVÍRUS. 3. VETORES. 4. MOSQUITOS.

USP/IMTSP/BIB-23/2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, Edna e Carlos, por terem me ensinado a importância da educação e pelos contínuos incentivos durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento fornecido para a execução deste trabalho (processo nº 2017/12434–6) e do projeto regular (processo nº 2016/12140–0).

Um agradecimento especial à minha orientadora, Dr^a Tamara Nunes de Lima Camara, por ter me aceitado como seu aluno, acreditado em meu potencial e pela confiança a mim depositada. Obrigado pelas conversas, pelo apoio e empolgação em todas as minhas idéias malucas. Sou imensamente grato por ter tido uma orientadora que incentivasse a curiosidade e a criatividade. Se não fosse por isso, garanto que este trabalho seria completamente diferente.

Gostaria de agradecer a Dr^a Eunice Galati pela oportunidade de realizar o Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) em seu laboratório, bem como a Dr^a Marcia Bicudo, Ma. Cecília Lavitschka e ao Dr^o Fredy Ovallos pelos conselhos e ensinamentos durante essa jornada. Agradeço também ao Dr^o Paulo Roberto Urbinatti, Dr^a Rosa Maria Marques de Sá Almeida pelo auxílio nas coletas de campo e triagem em condições de laboratório.

Agradeço a todos os meus amigos de laboratório Ronan Coelho, Bruno Nakazato, Felipe Pancetti, Pâmela Andrade, Marta Heinisch, Thaís Azevedo e Thaís Feitosa pelas conversas e risadas e, principalmente, pelo melhor café que já tomei.

Agradeço ao professor Dr^o Mauro Marrelli, Dr^o Delsio Natal, Dr^a Maria Anice Sallum, Dr^a Andrea Fogaça, Dr^a Sirlei Daffre, Dr^o Walter Ceretti, Dr^o Adriano Pinter, Dr^a Nildimar Honório e a todos os outros professores nos quais eu tive a oportunidade de assistir aulas e aprender muito mais do que apenas o conteúdo das disciplinas.

Agradeço ao amor da minha vida, Ma. Karolina Morales Barrio Nuevo por trilhar o caminho da ciência comigo, pelas discussões científicas acaloradas, pelos incentivos nas horas difíceis e, principalmente, por acreditar em mim mais do que eu mesmo.

Por fim, gostaria de agradecer à minha mãe, Edna, por ter me ensino e mostrado na prática que a educação é capaz de mudar a nossa realidade, a mulher

que mesmo cansada de um dia longo de trabalho sempre teve ânimo para me ajudar com a lição de casa; ao meu pai, Carlos, por ter me convencido de que eu poderia ser o que eu quisesse; ao meu padrasto, Robson, por ter me ensinado os valores que irei levar para a vida toda e, finalmente, ao meu irmão, Vinícius, de apenas 4 anos de idade, que me importunou durante a escrita deste trabalho. Assim como minha mãe fez comigo quando eu ainda não entendia a importância desse gesto, dedico esse trabalho a você, meu irmão. A criança mais linda, adorável, elétrica e peralta que conheci. Espero um dia ser um exemplo para você, assim como minha mãe é para mim.

“Eu sou movido por duas filosofias: Aprender mais sobre o mundo hoje do que eu sabia ontem e tentar diminuir o sofrimento dos outros. Você se surpreenderia quão longe esses pensamentos te levam.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

Ferreira-de-Lima VH. *Avaliação da transmissão vertical de arbovírus em Aedes aegypti e Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) em condições naturais* (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2019.

A transmissão vertical natural (TVN) é considerada como a sendo a forma de transmissão do vírus dengue (DENV) menos estudada no mundo, podendo representar um importante mecanismo de manutenção desse patógeno no ambiente. Haja vista que a dinâmica de infecção do DENV pode variar de acordo com as populações selvagens de vetores e origem do vírus isolado, as taxas de transmissão vertical também podem variar entre regiões. No entanto, embora a cidade de São Paulo seja a mais populosa das América Latina e tenha sofrido com grandes epidemias de dengue, a TVN nunca havia sido evidenciada nessa área. O presente trabalho objetiva realizar abordagem experimental, empírica e meta-analítica da transmissão vertical de arbovírus nas espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em condições naturais através de levantamento bibliográfico da literatura, investigação da transmissão vertical na cidade de São Paulo e comparação das Taxas Mínimas de Infecção (TMI) obtidas no Brasil e no mundo. Neste trabalho obtivemos 62 estudos sobre a TVN do DENV, 5 sobre ZIKV e 4 sobre CHIKV. Analisamos 2.730 machos (940 de *Ae. aegypti* e 1.790 de *Ae. albopictus*), coletados em um parque urbano da cidade de São Paulo, para a verificação da presença de transmissão vertical e comparação as Taxas Mínimas de Infecção obtidas. Como resultado, América do Sul e Ásia foram os maiores produtores de conhecimento sobre o assunto e isso pode estar relacionado ao elevado número de países endêmicos nos dois continentes. A baixa quantidade de estudos realizados na América do Norte e Central indica a necessidade de melhor entendimento da dinâmica desse fenômeno nessas áreas. Além disso, descrevemos, pela primeira vez, a confirmação da transmissão vertical natural do sorotipo DENV-3 na cidade de São Paulo em dois pools de machos de *Ae. albopictus* em períodos que não registraram casos autóctones humanos desse sorotipo, indicando que áreas verdes podem estar servindo de refúgio para sorotipos de circulação silenciosa, sendo a TVN um de seus possíveis mecanismos de manutenção nesse ambiente. Por fim, a comparação das TMI's não corroboraram com a

hipótese da existência de uma tendência geral de favorecimento na transmissão vertical natural de um determinado sorotipo sobre o outro, bem como entre espécies vetoras.

Palavras-chave: *Aedes*, Arbovírus, Vetores, Mosquitos.

ABSTRACT

Ferreira-de-Lima VH. *Evaluation of arbovirus vertical transmission in Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) under natural conditions* (Dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2019.

Natural vertical transmission (TVN) is considered the least studied form of dengue virus (DENV) transmission worldwide, and may represent an important mechanism of maintenance of this pathogen in the environment. Bearing in mind that the dynamics of DENV infection may vary according to wild vector populations and origin of the isolated virus, vertical transmission rates may also vary according to the region. However, although the city of São Paulo is the most populous in Latin America and has suffered from major dengue epidemics, TVN has never been detected in this area. The present work aims to carry out an experimental, empirical and meta-analytical approach to vertical transmission of arboviruses in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* species in natural conditions through a bibliographic survey of the literature, investigation of vertical transmission in the city of São Paulo and comparison of the Minimum Infection Rates (IMT) obtained in Brazil and worldwide. In this work we obtained 62 studies on DENV's TVN, 5 on ZIKV and 4 on CHIKV. We analyzed 2,730 males (940 of *Ae. aegypti* and 1,790 of *Ae. albopictus*), collected in an urban park located in the city of São Paulo, to verify the presence of vertical transmission and to compare the Minimum Infection Rates obtained. As a result, South America and Asia were the largest producers of knowledge on the subject and this may be related to the high number of endemic countries on both continents. The low quantity of studies carried out in North and Central America indicates the need for a better understanding of the dynamics of this phenomenon in these areas. In addition, we describe, for the first time, the confirmation of natural vertical transmission of the DENV-3 serotype in the city of São Paulo in two pools of males of *Ae. albopictus* in periods that did not register autochthonous human cases of this serotype, indicating that green areas may be acting as a refuge areas for serotypes of silent circulation, with TVN being one of its possible maintenance mechanisms in this environment. Finally, the comparison of the TMI's did not corroborate the hypothesis of the existence of a general trend of

favoring the natural vertical transmission of a certain serotype over the other, as well as between vector species.

Keywords: *Aedes*, Arbovirus, Vectors, Mosquitoes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura genômica dos <i>Flavivirus</i>. Esquema das sequências genômicas codificantes de proteínas estruturais dos <i>Flavivirus</i> (C, capsídeo; PrM, membrana primordial; E, envelope) e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).....	20
Figura 2 – Estrutura genômica dos <i>Alphavirus</i>. Esquema das sequências genômicas codificantes de proteínas estruturais dos <i>Alphavirus</i> (C, capsídeo; E3 e 6K, pequenos pepitídeos acessórios; E1 e E2, glicoproteínas do envelope principal) e não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4).....	24
Figura 3 – Ciclo de vida das espécies <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>. Representação esquemática dos 4 estágios de vida do gênero <i>Aedes</i> (ovos, larva, pupa e adulto) e seus diferentes habitats. Adaptado de: Chouin-Carneiro & Dos-Santos, 2017.....	28
Figura 4 – Coleta de dados. Fluxograma para a elaboração da revisão sistemática da transmissão vertical natural do DENV, ZIKV e CHIKV em <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> no mundo.....	37
Figura 5 – Parque Municipal do Piqueri. Localização geográfica do Parque Municipal do Piqueri, Zona Leste, São Paulo-SP.....	41
Figura 6 – Armadilha para ovos (ovitrampa). Armadilha utilizada para a coleta de ovos de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> no Parque Municipal do Piqueri, Zona Leste da cidade de São Paulo, Brasil. Chave: 1, Palheta rugosa de madeira (suporte para oviposição); 2, Identificação; 3, Recipiente de cor preta com capacidade de 500 ml.....	42
Figura 7 – Metodologia de pesquisa. Metodologia de obtenção das amostras para a realização da avaliação da presença de transmissão vertical natural no município de São Paulo.....	43
Figura 8 – Transmissão vertical por continente. Distribuição de publicações sobre a transmissão vertical natural do DENV em <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> por região, no período de 1983 a 2017.....	50
Figura 9 – Transmissão vertical ao redor do mundo. Casos confirmados de transmissão vertical do DENV ao redor do mundo. Países com confirmação da transmissão vertical natural do DENV em <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> . Chave: 1, Brasil; 2, Trinidad e Tobago; 3, Perú; 4, Bolívia; 5, Argentina; 6, Costa Rica; 7, México; 8, Índia; 9, Mianmar; 10, Tailândia; 11, Malásia; 12, Filipinas; 13, Indonésia; 14, Singapura; 15, Cuba; 16, Colômbia.....	56

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose das amostras positivas. Linhas 1 e 6: peso molecular; linha 2: controle negativo; linha 3: fragmento genômico de DENV-3 em um pool de machos de *Ae. albopictus* coletado durante a primavera de 2014; linha 4: fragmento genômico de DENV-3 em um pool de machos de *Ae. albopictus* coletados durante o outono de 2015; linha 5: fragmentos de DENV-3 de 290 pb como controle positivo.....58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Número de artigos publicados sobre transmissão vertical natural por ano.** Tendência geral crescente na quantidade de publicações científicas por ano sobre transmissão vertical natural do DENV, durante o período de 1983 a 2017.....49
- Gráfico 2 – Mosquitos analisados para cada espécie e estação.** Número de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes do Parque Municipal Piqueri durante duas primaveras e dois outonos, no período entre 2014 a 2016.....57
- Gráfico 3 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV.** Chave: A, comparação das TMI's dos sorotipos encontrados em *Aedes*; B, comparação das TMI's dos sorotipos encontrados em *Ae. aegypti*.....60
- Gráfico 4 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV.** Chave: A, comparação das TMI's entre larvas e adultos de *Ae. aegypti*; B, comparação das TMI's entre larvas e adultos de *Ae. albopictus*.....60
- Gráfico 5 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV.** Chave: A, TMI's de exemplares de *Ae. aegypti* coletados em campo em sua fase imatura e mantidos em condições de laboratório até a fase adulta com aqueles coletados diretamente em sua forma adulta no campo; B, TMI's de exemplares de *Ae. albopictus* coletados em campo em sua fase imatura e mantidos em condições de laboratório até a fase adulta com aqueles coletados diretamente em sua forma adulta no campo.....61
- Gráfico 6 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV.** Chave: A, comparação das TMI's encontradas nas larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mosquitos analisados. Quantidade total de mosquitos machos analisados de acordo com a espécie e estação do ano.....	57
---	----

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Grupos e correspondências.** Descrição da realização do cálculo da Taxa Mínima de Infecção para cada um dos grupos criados.....38
- Quadro 2 – Amplificação do material genético viral.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar os sorotipos do vírus dengue.....45
- Quadro 3 – Primeira reação de RT-PCR.** Componentes e volumes utilizados na primeira reação de RT-PCR para a detecção do DENV em machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.....46
- Quadro 4 – Reação de PCR do tipo semi-nested:** Componentes e volumes utilizados na primeira reação de PCR do tipo semi-nested para a detecção do DENV em machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.....46
- Quadro 5 – Transmissão vertical na Ásia.** Distribuição anual dos artigos publicados sobre transmissão vertical natural na Ásia. Chave: ● artigos positivos para transmissão vertical natural; ○ artigos negativos para transmissão vertical natural.....52
- Quadro 6 – Transmissão vertical nas Américas.** Distribuição anual dos artigos publicados sobre transmissão vertical natural nas Américas. Chave: ● artigos positivos para transmissão vertical natural; ○ artigos negativos para transmissão vertical natural.....55

LISTA DE ABREVIATURAS

nm: Nanômetro

RNA: Ácido Ribonucléico

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

TMI: Taxa Mínima de Infecção

DENV: Vírus Dengue

ZIKV: Vírus Zika

CHIKV: Vírus Chikungunya

YFV: Vírus da Febre Amarela (Yellow Fever)

TVN: Transmissão vertical natural

CDC: Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle de Doenças)

ECSA: Eastern-Central-South-Africa

IOL: Indian Ocean Lineage

PIE: Período de Incubação Extrínseco

ml: Mililitro

FSP/USP: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

μ L: Microlitro

rpm: rotações por minuto

V: Volt

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação de Transcriptase Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Arbovírus.....	19
1.2 Família <i>Flaviviridae</i> : Gênero <i>Flavivirus</i>	20
1.2.1 Dengue	21
1.2.2 Zika.....	22
1.3 Família <i>Togaviridae</i> : Gênero <i>Alphavirus</i>	23
1.3.1 Chikungunya.....	24
1.4 Dengue, Zika e Chikungunya no Brasil.....	26
1.5 <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> : aspectos biológicos.....	27
1.5.1 – Ciclo de vida.....	27
1.5.2 <i>Aedes aegypti</i>	28
1.5.3 <i>Aedes albopictus</i>	29
1.6 Transmissão vertical.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Levantamento bibliográfico.....	36
4.2 Detecção da transmissão vertical na cidade de São Paulo.....	40
4.2.1 Área de Estudo.....	40
4.2.2 Coleta entomológica.....	41
4.2.3 Manutenção dos espécimes em laboratório.....	42
4.2.4 Isolamento do material genético viral.....	43
4.2.4.1 Extração do material genético viral.....	43
4.2.4.2 – RT-PCR.....	44
4.2.4.3 Eletroforese.....	47
4.2.4.4 Sequenciamento das amostras positivas.....	47
4.2.5 Taxa Mínima de Infecção (TMI).....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Transmissão vertical do DENV redor do mundo.....	49

5.1.1 Transmissão vertical natural do DENV na Ásia.....	51
5.1.2 Transmissão vertical natural do DENV nas Américas.....	53
5.2 Transmissão vertical natural do CHIKV e ZIKV.....	56
5.3 Detecção da transmissão vertical natural do DENV no Parque do Piqueri.....	57
5.3.1 Detecção dos pools positivos.....	58
5.3.2 Taxa Mínima de Infecção (TMI).....	59
5.4 Análise das Taxas Mínimas de Infecção por meio transmissão vertical em mosquitos vetores.....	59
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, submicroscópicos, medindo em torno de 20 a 300 nm, produzidos a partir da montagem de componentes pré-formados de sua célula hospedeira. Possuem pequenos genomas compostos de RNA ou DNA, com capacidade de codificação de apenas algumas poucas proteínas¹. Diferentemente de outros parasitas intracelulares, os vírus não crescem e nem se dividem, bem como não apresentam nenhuma sequência genética para a síntese de organelas citoplasmáticas², tornando-os completamente dependentes dos mecanismos de replicação e síntese de proteínas subjacentes de sua célula hospedeira^{1,2}.

O termo arbovírus é uma contração de “**Ar**thropod-**borne virus**”, e denomina todos os vírus que são mantidos na natureza através da transmissão biológica entre hospedeiro vertebrado suscetível e artrópode vetor hematófago^{3,4}, mais comumente mosquitos, carrapatos e flebotomíneos⁵. Esses vírus se multiplicam nos tecidos dos artrópodes e são, após o período extrínseco de incubação, transmitidos para o hospedeiro vertebrado através da picada⁴.

Os arbovírus são classificados em variadas famílias e gêneros, baseados em três critérios: morfologia (tamanho, forma, simetria do capsídeo, presença ou ausência de envelope), propriedades físicas (estrutura do genoma e antígenos) e propriedades biológicas (forma de replicação e transmissão, hospedeiros e patogenicidade)⁵. Dentre essas famílias e gêneros, mais de 500 arbovírus já foram descritos¹ e, destes, 130 causam doenças em hospedeiros vertebrados suscetíveis¹. Alguns arbovírus anteriormente considerados controlados ou que não representavam elevado risco à saúde pública são, atualmente, os agentes determinantes das maiores epidemias das últimas décadas^{3,6}, bem como a enorme diversidade biológica desse grupo favorece a sua presença nas mais diversas áreas do planeta⁷. Dentre todos os arbovírus, aqueles pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* são os mais importantes para o homem^{7,8}.

1.2 Família *Flaviviridae*: Gênero *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, abrange mais de 70 vírus, muitos deles com potencial patogênico ao homem⁹. O termo *Flavivirus* deriva da palavra em latim “*flavus*”, que significa “amarelo”, em referência ao vírus da Febre Amarela, membro deste mesmo gênero^{9,10}. O genoma deste grupo é composto de RNA de cadeia simples, que segue a mesma orientação do mRNA (genoma positivo), medindo aproximadamente 10.5 kb. Como todos os vírions dos vírus pertencentes a este grupo, possuem envelope de formato esférico, medindo aproximadamente 60 nm de diâmetro^{2,9,10}. Além disso, os flavivírus possuem 10 regiões codificantes, sendo que 3 delas codificam proteínas estruturais (as glicoproteínas do capsídeo, membrana primordial e envelope) e 7 regiões que codificam proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)⁹ (Figura 1). Dentre aqueles de propagação mundial em níveis pandêmicos, os vírus dengue (DENV) e Zika (ZIKV) estão entre os de maior relevância¹¹.

Figura 1 –Estrutura genômica dos *Flavivirus*. Esquema das sequências genômicas codificantes de proteínas estruturais dos *Flavivirus* (C, capsídeo; PrM, membrana primordial; E, envelope) e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

1.2.1 Dengue

A dengue é uma arbovirose que tem por agente quatro sorotipos antígenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), pertencentes ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*^{12,13}. Esse vírus causa uma doença de amplo espectro clínico, incluindo desde casos assintomáticos até quadros graves, podendo evoluir para óbito. Dentre os sintomas, destacam-se ocorrência de hepatite, insuficiência hepática, manifestações do sistema nervoso, miocardite, hemorragias graves e choques¹⁴.

Os primeiros relatos de doenças com sintomas clínicos semelhantes aos da dengue estão detalhados na Enciclopédia Médica Chinesa da Dinastia Jin (265-420 dC), enquanto que as primeiras epidemias descritas datam do século XVIII em três continentes: Ásia, África e América do Norte. Somente a partir da década de 1940, o DENV foi isolado de pacientes, com posterior conclusão da presença de quatro sorotipos¹³. Nos dias atuais, apresenta ampla circulação em mais de 100 países tropicais e subtropicais da Ásia, África e América¹⁵, onde as condições de temperatura e umidade favorecem a proliferação de seus mosquitos vetores^{13,16}. Tal distribuição está relacionada com o crescimento populacional desenfreado, urbanização não planejada, controle ineficiente de mosquitos, viagens aéreas frequentes com capacidade de transportar o patógeno de uma área para a outra em períodos muito curtos de tempo, e a falta de serviços de saúde¹³. Não obstante, hipotetiza-se que o aquecimento global tenha potencial de expandir a distribuição geográfica de suas espécies vetorais¹⁷.

Estima-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco de infecção¹³ e, aproximadamente, 96 milhões de casos apresentam manifestações clínicas, causando significativo impacto econômico nos países afetados¹⁸. Dada a ocorrência de cerca de 390 milhões de infecções no mundo todos os anos, sendo 7% desse total ocorrentes no Brasil¹⁸, a dengue é considerada a mais séria doença viral re-emergente transmitida por artrópode e o maior desafio em saúde pública global¹⁶.

1.2.2 Zika

Semelhante à dengue, a Zika tem por agente um vírus do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*¹⁹. As manifestações provenientes da infecção por esse *Flavivirus* pode ser assintomáticas ou sintomáticas. As infecções humanas por ZIKV são caracterizadas por febre baixa (37,8°C - 38,5°C), conjuntivite não purulenta, dor de cabeça, artralgia nas mãos e pés por vezes com inflamação nas articulações, fadiga, astenia, rash maculopapular e, com menos frequência, dor retro-orbital, anorexia, vômitos, diarreia e dor abdominal²⁰.

Esse vírus foi isolado pela primeira vez em macaco *Rhesus* enjaulado no dossel da Floresta Zika, em Kampala, Uganda, em 1947, durante um levantamento de febre amarela²¹. Em 1948, o mesmo vírus foi isolado na mesma localidade em diversos exemplares da espécie *Aedes africanus*²². Posteriormente, foram encontradas evidências sorológicas de circulação do ZIKV em humanos provenientes de países da África Oriental e Ocidental²³, sendo o primeiro caso diagnosticado em uma criança de 10 anos de idade, do sexo feminino, proveniente da Nigéria, África Ocidental, em 1954²⁴.

Em 2007, a primeira grande epidemia do ZIKV ocorreu nas ilhas Yap, Micronésia, no Oceano Pacífico, com 49 casos confirmados e 59 prováveis²⁵. Posteriormente, em outubro de 2013, o vírus chegou à Polinésia Francesa, Oceania, onde causou surto da doença²³. O primeiro país das Américas a registrar casos humanos autóctones e a confirmar a circulação do vírus foi o Brasil, no início de 2015, nos estados da Bahia e do Rio Grande do Norte²⁶⁻²⁸. Casos autóctones foram relatados em outros países, tais quais: Colômbia, Bolívia, Venezuela, Paraguai, Peru, Guiana Francesa, Haiti, El Salvador, Guatemala, Nicarágua, Cuba e México²⁹

Além da transmissão através do ciclo Homem –*Aedes*– Homem, outras formas de contaminação foram evidenciadas. Sugeriu-se sua transmissão por via intrauterina, sexual e por transfusão sanguínea³⁰, bem como, apesar de sua baixa letalidade, tem sido frequentemente associado com doenças neurológicas severas, tal qual a síndrome de Guillain-Barré³¹. Segundo a Organização Mundial da Saúde, até o ano de 2017, o Brasil e outros 30 países reportaram casos de microcefalia e/ou malformações em fetos,

potencialmente associados ao ZIKV³². Além disso, diversos trabalhos corroboram com esses achados, uma vez que tem demonstrado essa associação, tanto por meio de estudos experimentais³³ e de revisão da literatura³⁴, quanto por meio de evidências clínicas^{35,36}.

Em um estudo publicado por Garcez *et al.* 2016³⁷, foram estimuladas células tronco pluripotentes para desenvolverem-se como tecidos nervosos, formando culturas ricas em neuroesferas (conjunto de células progenitoras neurais), e também organoides cerebrais (células organizadas em uma citoarquitetura muito semelhante ao encontrado no tecido original). Nessa pesquisa, foi observado que o ZIKV infectou várias das neuroesferas, levando parte delas à morte. Com relação aos organoides cerebrais, aqueles infectados tiveram um desenvolvimento 40% inferior ao grupo controle, levando à conclusão de que o ZIKV é o responsável pela morte das neuroesferas, comumente presente em fetos, e retardar o desenvolvimento cerebral. Em outro experimento, o ZIKV foi extraído de um paciente da Polinésia Francesa (97% similar à cepa circulante na América Latina) e injetado em uma fêmea de camundongos prenha. Como resultado, foram encontradas concentrações 1.000 vezes maiores do ZIKV na placenta do que no sangue materno, indicando tropismo por esse tecido³⁸.

Existem, portanto, fortes evidências científicas que corroboram com a afirmação de que o patógeno citado comina no impacto nocivo ao neurodesenvolvimento de neonatos humanos, levando o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC)³⁹, a lançar uma nota oficial declarando a relação entre o ZIKV e a microcefalia, bem como outras anomalias em neonatos nascidos de mães infectadas.

1.3 Família *Togaviridae*: Gênero *Alphavirus*

O gênero *Alphavirus* é um grupo pertencente à família *Togaviridae*, que abrange 28 espécies de vírus classificados em 7 complexos⁴⁰. Este gênero é composto de vírus com vírions envelopados, de formato esférico, medindo de 60 a 70 nm de diâmetro, com material genético do tipo RNA de fita simples, de sentido positivo e 11.7 kb de extensão⁴¹. O seu genoma é organizado em 4 regiões codificantes de proteínas não-

estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e 5 regiões codificantes de proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K, E1)^{42,43} (Figura 2).

Figura 2–Estrutura genômica dos *Alphavirus*. Esquema das sequências genômicas codificantes de proteínas estruturais dos *Alphavirus* (C, capsídeo; E3 e 6K, pequenos pepitídeos acessórios; E1 e E2, glicoproteínas do envelope principal) e não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4).

Os vírus pertencentes a este gênero são comumente transmitidos por mosquitos por via Mosquito – Vertebrado – Mosquito, contudo, outros artrópodes hematófagos (piolhos e ácaros) também são vetores de alguns poucos vírus^{40,41}. Os hospedeiros vertebrados são comumente mamíferos e pássaros, contudo, peixes também são hospedeiros de *Alphavirus* aquáticos⁴⁰. Ocasionalmente alguns desses vírus podem escapar do seu nicho ecológico habitual, podendo causar epidemias urbanas, como é o caso do vírus chikungunya (CHIKV)⁴¹.

1.3.1 Chikungunya

O CHIKV foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, Leste da África, durante epidemia em 1952-1953⁴⁴. Quase 50 anos depois, em 2004, CHIKV emergiu nas Ilhas Reunião, oceano Índico, causando um elevado número de casos humanos^{45,46}. Mais tarde, em 2006, epidemias foram registradas na Índia e em alguns países do Sudeste

asiático e, em 2007, casos autóctones desse arbovírus foram relatados na Itália, na região de Ravenna⁴⁵. Em 2013, o primeiro caso autóctone do CHIKV na América foi detectada na Ilha de San Martin, Caribe, expandindo-se rapidamente para países da América do Sul, tais quais Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Suriname, Paraguai e Brasil⁴⁷. Até o momento, a circulação do CHIKV foi relatada na África, Ásia, Europa, América do Sul e Central e em alguns Estados do sul dos Estados Unidos⁴⁸.

Os primeiros sintomas causados pelo CHIKV são observados 2-7 dias após a infecção e tipicamente causa febre alta (39°C e 40°C), dores musculares, dores de cabeça (70% dos pacientes), náuseas/vômito (60% dos pacientes), fadiga, erupção maculopapular (60% dos pacientes) e dores nas articulações recorrentes e severas (40% dos pacientes), que podem perdurar por meses e até anos após a infecção, causando incapacidade e afetando a qualidade de vida do paciente hospedeiro^{42,45}. Justamente devido a essas dores articulares severas, a doença causada por esse vírus foi denominada Chikungunya, que é uma palavra derivada do idioma Makonde (língua Bantu) que significa "aquele que se curva", referindo-se à postura que o paciente infectado adquire⁴⁹.

Complicações neurológicas são raras para o CHIKV, contudo, assim como o ZIKV, a infecção por esse vírus já foi associada com a Síndrome de Guillain-Barré⁵⁰, bem como complicações neurológicas foram evidenciadas em neonatos, através da transferência do patógeno por via materno-fetal⁵¹⁻⁵⁴. O primeiro estudo a demonstrar a transmissão de mãe para filho do CHIKV foi conduzida nas Ilhas Reunião, durante os anos de 2005 a 2006, onde caracterizaram todos os desfechos epidemiológicos, biológicos e radiológicos da infecção⁵¹. Em um estudo de coorte realizado neste mesmo país, foram detectadas disfunções neurocognitivas de desenvolvimento, paralisias cerebrais e microcefalia em recém-nascidos expostos à infecção pré-natal⁵². Além disso, durante a epidemia de CHIKV no Brasil, entre 2015-2016, foram documentadas encefalites em neonatos provenientes de mães infectadas com esse vírus^{53,54}.

1.4 Dengue, Zika e Chikungunya no Brasil

Os primeiros casos de dengue detectados no Brasil foram baseados em critérios clínicos, durante epidemias em São Paulo, em 1916, e em Niterói, Rio de Janeiro, em 1923. Sorotipos do vírus dengue - DENV-1 e DENV-4 - só foram isolados pela primeira vez no país durante a epidemia que ocorreu em 1981-1982, na cidade de Boa Vista, Roraima⁵⁵. Essa epidemia foi rapidamente controlada, evitando que os sorotipos se expandissem para outros Estados brasileiros. Somente quatro anos depois, em 1986, foi registrada a reintrodução do sorotipo DENV-1 no Brasil, no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro⁵⁶. Em 1990 e 2001, foram isolados os sorotipos DENV-2 e DENV-3, também no estado do Rio de Janeiro, nos municípios de Niterói e Nova Iguaçu, respectivamente^{57,58} e, em 2010, o sorotipo DENV-4, em Roraima e Rio de Janeiro^{59,60}.

O CHIKV é um vírus de alta diversidade genômica, uma vez que polimorfismos da região E1 (Figura 2) permitem a diferenciação de suas 4 linhagens: Eastern-Central-South-Africa (ECSA), West African, Asian e Indian Ocean (IOL)⁶¹. Em meados de setembro de 2014, a primeira infecção autóctone do CHIKV foi confirmada em Oiapoque, Amapá e em Feira de Santana, Bahia⁶². Neste trabalho, foi sugerido que a linhagem ECSA era o que estava circulando em Feira de Santana e a linhagem asiática em Oiapoque. Além disso, existem evidências de que a linhagem ECSA estava circulando na Bahia um ano antes de sua primeira identificação no estado⁶³. Posteriormente, o ECSA foi detectado em fêmea da espécie *Aedes aegypti* provenientes do estado de Sergipe⁶⁴, e no plasma sanguíneo de pacientes infectados, provenientes do Rio de Janeiro⁶⁵. Assim como demonstrado para CHIKV, antes de ser detectado pela primeira vez nos estados da Bahia e Rio Grande do Norte, em 2015²⁸, o ZIKV circulou por meses dentro do país^{66,67}.

A principal via de transmissão do DENV, CHIKV e ZIKV ao homem é pela picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo a espécie *Ae. aegypti* o principal vetor nas Américas⁶⁸. Outro mosquito que é também responsável pela transmissão desses arbovírus em diferentes países no mundo é o *Aedes albopictus*^{47,69}. Na ausência de vacina de elevada eficiência, o controle dos mosquitos vetores desses

arbovírus ainda é o método mais eficaz para a redução dos casos dessas arboviroses no país e no mundo^{13,16,68}.

1.5 *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*: aspectos biológicos

1.5.1 Ciclo de vida

Ao longo de seus 4 estágios de vida (ovo, larva, pupa e adulto), os mosquitos apresentam mudanças drásticas em sua conformação e habitat^{3,8}. Tanto os machos quanto as fêmeas alimentam-se de néctar, contudo, as fêmeas utilizam-se da alimentação sanguínea em hospedeiros vertebrados para a maturação de seus ovos e, posterior oviposição nas superfícies internas de recipientes com água³. Em média, para cada ciclo gonotrófico (período compreendido entre a procura de um hospedeiro vertebrado e a oviposição)⁷⁰, as fêmeas podem ovipor de 100 a 200 ovos³. O desenvolvimento dos três primeiros estágios (ovo, larva e pupa) ocorre na água. Após o período de desenvolvimento embrionário, as larvas eclodem, dando origem as de primeiro estágio (L1) que, após se alimentarem de matéria orgânica e microorganismos presentes no criadouro, prosseguirá sua maturação em outros 3 estágios (L2, L3 e L4), até a fase de pupa, que não se alimenta, e subsequente, forma adulta terrestre e alada^{3,8} (Figura 3).

Figura 3 – Ciclo de vida das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Representação gráfica dos 4 estágios de vida do gênero *Aedes* (ovos, larva, pupa e adulto) e seus diferentes habitats. Adaptado de: Chouin-Carneiro e Dos-Santos³.

1.5.2 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é um vetor de grande importância médica, que apresenta comportamento endofílico, endofágico e antropofílico, sendo frequentemente encontrado em locais de características urbanas, onde as mudanças antrópicas favorecem a sua proliferação^{8,71}. A grande resistência à dissecação dos ovos dessa espécie^{72,73} e à sua alta antropofilia e endofilia^{8,74} favorecem a relação cada vez mais próxima entre os humanos e esse vetor. Além disso, as formas imaturas dessa espécie são frequentemente encontrados em criadouros artificiais em áreas urbanas⁷⁵, tais quais reservatórios de águas de reuso⁷⁶, vasos de plantas, ralos, latas, vasilhames e garrafas⁷⁷. Contudo, na ausência destes, essa espécie pode tanto ovipor em locais menos usuais,

tais quais ocos de árvore⁷⁸, poços, fossas sépticas e bueiros⁷⁹, quanto podem percorrer longas distâncias para oviposição⁸⁰.

Morfologicamente, essa espécie de hábitos diurnos apresenta coloração castanho escura, com escamas branco-prateadas em todo o corpo, sendo facilmente reconhecível devido ao conjunto de escamas claras em forma de lira no dorso do tórax⁸. Esse mosquito foi descrito pela primeira vez em 1762, no Egito, sendo denominado *Culex aegypti* (*Culex*= mosquito, *aegypti*= egípcio). O gênero *Aedes* somente foi descrito em 1818 e, devido às semelhanças morfológicas que o *Cx. aegypti* apresentava com esse novo gênero, estabeleceu-se o nome *Ae. aegypti*⁸¹. Foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente através do tráfico de escravos. Na década de 1950, por ser vetor do agente etiológico da febre amarela urbana, foi intensamente combatido e considerado erradicado no Brasil. Contudo, no final da década de 1960, houve reinvasão dessa espécie no país e, atualmente, *Ae. aegypti* é encontrado em todos os estados brasileiros⁸. Nas Américas, é considerado o principal vetor dos quatro sorotipos do DENV^{8,58,82}, bem como dos CHIKV e ZIKV^{47,83,84}.

1.5.3 *Aedes albopictus*

No continente americano, o primeiro encontro da espécie *Ae. albopictus* deu-se no Sul dos Estados Unidos, em 1985⁸⁵. No ano seguinte, essa espécie foi identificada no Brasil, no estado do Rio de Janeiro⁸⁶ e, posteriormente, no mesmo ano, no estado de São Paulo⁸⁷. Aos poucos, passou a ser encontrada em estados vizinhos⁸⁸. Acredita-se que a sua introdução no país tenha ocorrido através do comércio de minério de ferro com o Japão, devido à proximidade genética das populações dessa espécie em ambos os países^{8,89}. Em pouco tempo, *Ae. albopictus* expandiu-se pelo território brasileiro e, atualmente, apenas o estado do Acre ainda não registrou sua presença⁹⁰⁻⁹².

Morfologicamente, essa espécie possui o tórax enegrecido, ornamentado com faixa latitudinal de escamas claras, normalmente branco-prateadas⁸. *Ae. albopictus* é frequentemente encontrado em áreas rurais e silvestres, podendo estar presente em ambientes periurbanos onde há remanescentes de mata^{8,71,93}. Suas larvas estão frequentemente presentes em criadouros naturais, tais como bromélias, ocos de árvore e

internódios de bambus⁸, apesar de também já terem sido observadas em criadouros artificiais⁷⁷. Além disso, diferente do *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* exibe comportamento exofílico e alimentação eclética, podendo realizar hematofagia de outros vertebrados, além do homem^{8,71}.

Estes aspectos biológicos, tanto em relação aos ambientes onde é encontrado, quanto nos hospedeiros vertebrados nos quais pode realizar hematofagia, fazem dessa espécie uma possível ponte entre o ciclo silvestre e urbano de arboviroses, como a febre amarela silvestre, podendo acarretar no transporte de arbovírus da área rural para a área urbana^{91,94}. Além disso, a sua importância epidemiológica é acentuada quando consideramos sua comprovada competência vetorial em condições laboratoriais para os vírus da febre amarela (YFV)⁹⁵, DENV⁹⁶, CHIKV⁸³ e ZIKV⁶⁹. Também vem sendo apontado como um importante vetor do CHIKV na França e Itália, Europa^{97,98}, e do ZIKV no Gabão, África Central⁹⁹.

1.6 Transmissão vertical

O DENV, ZIKV e CHIKV são transmitidos principalmente aos seres humanos através da picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Aedes*, sendo este processo denominado transmissão horizontal¹⁰⁰. Por esse mecanismo, o mosquito é infectado quando ingere sangue de um hospedeiro virêmico. O período de incubação extrínseco (PIE) é definido como o tempo entre a ingestão do sangue infectado por um mosquito suscetível e a presença de partículas virais infecciosas em suas secreções salivares. Durante esse período, o vírus infecta as células intestinais do vetor, replica-se e migra para os diversos tecidos e órgãos¹. Após esse período, o inseto é capaz de transmitir o vírus para um novo hospedeiro vertebrado³. Entretanto, o fenômeno conhecido como transmissão vertical relaciona-se à transferência de alguns arbovírus do genitor feminino ou masculino infectado para parte de sua prole¹⁰¹⁻¹⁰³.

Segundo Clements¹⁰¹, são consideradas três modalidades de transmissão vertical:

1) Transmissão transovariana: ocorre quando os agentes patogênicos invadem as células germinativas primordiais ou os oócitos antes de estarem envoltos pelo córion.

2) Transmissão transovo: ocorre quando os agentes infecciosos invadem o oócito corionado durante a ovulação, provavelmente através da micrópila, enquanto estes localizam-se nos ductos genitais femininos.

3) Transmissão por contaminação da superfície do oócito: ocorre durante a ovulação e, enquanto os oócitos estão localizados nos dutos genitais femininos, o agente infeccioso adere ao córion e lá permanece durante toda a oviposição, até a eclosão e infecção das larvas recém emergidas.

Apesar de esta ser a mais precisa e atual definição sobre transmissão vertical, outras também foram descritas. Dentre elas, uma das definições mais amplamente utilizadas é aquela retratada por Higgs e Beaty¹. Para esses autores, a forma de transmissão descrita por Clements¹⁰¹ como “Transmissão transovo” é definida como sendo apenas mais uma modalidade da “Transmissão transovariana”. Já a transmissão intitulada “Transmissão por contaminação da superfície do oócito”, por sua vez, é definida como sendo a “Transmissão transovo”. Sendo assim, a diferença entre as formas de transmissão estariam na localização do patógeno. Quando o patógeno encontra-se internamente ao ovo, é considerado “Transmissão transovariana”; quando o patógeno encontra-se na superfície corionada do ovo, é considerado “Transmissão transovo”¹. Apesar da definição dada por Clements¹⁰¹ ser acurada, a definição retratada por Higgs e Beaty¹ é prática, cabendo ao pesquisador decidir qual delas utilizar. Neste trabalho considera-se como transmissão vertical, todas as formas acima citadas, independente de seu mecanismo subjacente.

De acordo com Lequime *et al.*¹⁰³, a eficiência da transmissão vertical depende da disseminação do vírus nos ovários, uma vez que maiores quantidades de prole infectada são relatadas durante o segundo ciclo gonotrófico, em comparação com o primeiro. A baixa quantidade de transmissão vertical no primeiro conjunto de ovos pode ser atribuída à falta de disseminação do vírus nos ovários e/ou, assim como o observado com CHIKV, à expansão dos ovários depois do primeiro ciclo gonotrófico, que aumenta sua permeabilidade^{103,104}. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre as taxas de infecção do ZIKV por transmissão vertical no primeiro e segundo ciclo gonotrófico¹⁰⁵.

Em áreas endêmicas, durante períodos desfavoráveis para a transmissão

horizontal, tais quais períodos de baixa densidade de mosquitos, a capacidade do DENV de persistir no ambiente após longos períodos de pouco ou nenhum caso humano documentado, não é claramente entendido. Em um estudo conduzido na Malásia, os autores argumentam que a transmissão vertical do DENV foi considerada como sendo o iniciador de casos humanos, salientando que essa forma de transmissão auxiliou na manutenção desse patógeno no ambiente¹⁰⁶. Esses achados corroboram com Murillo *et al.*¹⁰⁷, que argumentam que a transmissão vertical é determinante na invasão de genótipos competidores do DENV e na habilidade de tornar-se endêmica na população. Adicionalmente, Thongrunkiat *et al.*¹⁰⁸ demonstraram altas taxas de infecção por DENV em adultos que emergiram de larvas de *Ae. aegypti* coletadas em campo 4 meses antes do pico de casos humanos, sugerindo que o estudo de transmissão vertical permite identificar áreas de surto de dengue rapidamente e fornece um alerta precoce de uma epidemia iminente. Adicionalmente, estudos demonstraram que o ZIKV apresenta alta capacidade de transmissão por via da transmissão vertical¹⁰⁹, sendo o mesmo resultado já demonstrado anteriormente para o CHIKV¹¹⁰.

Para a elucidação da importância da transmissão vertical na natureza, os modelos matemáticos tem se mostrado uma possível ferramenta para o entendimento do impacto desse fenômeno na dinâmica epidemiológica do DENV¹¹¹ e em sua propagação¹¹². Em um modelo matemático proposto por Esteva *et al.*¹¹³, é argumentado que a dinâmica da dengue é fortemente influenciada pela transmissão vertical natural, uma vez que favorece o estabelecimento de um nível constante de endemidade. Adams e Boots¹¹⁴ argumentam que a transmissão vertical pode atuar na persistência do DENV através do fornecimento de reservatórios temporários. Contudo, discutem que a taxa de transmissão vertical encontrada em experimentos laboratoriais não é elevada o suficiente para justificar essa forma de transmissão como determinante na persistência do vírus no ambiente¹¹⁴. Essa hipótese foi posteriormente endossada, através de estudo de revisão elaborado por um desses autores¹¹⁵. Resultados inversos foram encontrados por Yang¹¹⁶, que argumenta que a transmissão vertical parece ser irrelevante em períodos de ocorrência de altas taxas de transmissão horizontal, mas quando em períodos de baixas taxas, a contribuição da transmissão vertical ultrapassa o da transmissão horizontal. Murillo *et al.*¹¹⁷ corroboram com essa afirmação, uma vez que demonstram que, mesmo a transmissão vertical ocorrendo em baixas taxas, ela prejudica a eficácia das medidas de controle empregadas. Observa-se, portanto, que a

elucidação da importância da transmissão vertical natural, por meio do uso de ferramentas matemáticas, permanece inconclusiva, uma vez que dependendo das variáveis consideradas, resultados inversos podem ser obtidos.

A hipótese da transmissão vertical natural como um mecanismo de manutenção em períodos desfavoráveis é endossada quando consideramos que o DENV foi mantido em condições laboratoriais, unicamente através desse mecanismo, durante 7 e 3 gerações consecutivas em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente^{118,119}. Ovos infectados também são capazes de permanecerem viáveis por meses, gerando, por conseguinte, larvas infectadas que darão origem a adultos infectados, aptos para transmitirem o patógeno através da picada¹²⁰. Contudo, apesar dos dados relatados anteriormente, essa forma de transmissão pode afetar o *fitness* reprodutivo da espécie vetora. A mortalidade em formas imaturas e em adultos é maior nos espécimes verticalmente infectados, bem como a fertilidade e fecundidade das fêmeas são reduzidas, quando comparadas com os mosquitos controle¹¹⁸. Por outro lado, outros autores não encontraram diferença estatística no *fitness* reprodutivo^{121,122}, indicando que tais conclusões podem não ser representativas para todas as populações do vetor, genótipo viral ou, até mesmo, todas as possíveis combinações de interações entre esses dois fatores.

2 JUSTIFICATIVA

A dinâmica de infecção do vírus no mosquito vetor varia conforme a origem do vírus selvagem^{123,124}, as diferentes populações de vetores⁶⁹ e, até mesmo, conforme o nível de competição intraespecífica na fase larval¹²⁵. A quantidade de espécimes verticalmente infectados e a efetividade dessa infecção também podem ser afetadas por essa dinâmica de infecção¹²⁶, tornando essencial o levantamento e a análise da literatura sobre a presença de transmissão vertical do DENV, ZIKV e CHIKV nas mais variadas populações de mosquitos vetores e vírus do Brasil e do mundo. Além disso, pouco se sabe sobre a influência dos diferentes sorotipos do DENV no fenômeno de transmissão vertical, tornando essencial a busca de conhecimento sobre esse assunto.

O estado de São Paulo é o mais populoso do Brasil, com aproximadamente 45 milhões de habitantes, representando cerca de 21,5% de toda a população brasileira (209 milhões de habitantes)^{127,128}. Apesar de a cidade de São Paulo ser a mais populosa do Brasil¹²⁷ e da América Latina¹²⁹, além de ter vivenciado grandes epidemias de dengue nos últimos anos, como as de 2014 e 2015¹³⁰, a transmissão vertical natural nunca foi evidenciada nessa área¹³¹, podendo representar uma importante forma de manutenção do vírus em situações de períodos de pouca chuva ou de baixa densidade do vetor^{122,132}.

Os parques municipais da cidade de São Paulo são áreas constituídas de remanescentes de vegetação de Mata Atlântica, utilizados para recreação e, simultaneamente, como habitat de várias espécies de mosquitos de importância médica¹³³. Contudo, apesar do conhecimento sobre a fauna de mosquitos em áreas verdes, pouco se sabe sobre os patógenos que circulam nessas localidades. Assim, a investigação da ocorrência da transmissão vertical natural do DENV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* é de fundamental importância para a compreensão da sua dinâmica de transmissão, bem como esses aspectos são de extrema relevância para a comunidade científica e agentes de saúde pública, pois a epidemiologia e o controle da dengue dependerão das vias de transmissão do vírus e das espécies de mosquito envolvidas nessa dinâmica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar abordagem experimental, empírica e meta-analítica da transmissão vertical de arbovírus nas espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em condições naturais.

3.2 Objetivos específicos

- a) Apresentar levantamento bibliográfico e analisar os conteúdos sobre a presença de transmissão vertical natural dos vírus dengue, chikungunya e Zika em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no mundo;
- b) Investigar a transmissão vertical do vírus dengue em populações naturais de machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.
- c) Comparar as Taxas Mínimas de Infecção encontradas no mundo para cada sorotipo do vírus dengue conforme espécie e estágio de vida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi conduzido no formato de revisão sistemática da literatura, por meio de pesquisas realizadas nos indexadores de artigos científicos MEDLINE, scielo e Lilacs, usando a combinação dos termos: “*Aedes aegypti*”, “*Aedes albopictus*”, “dengue”, “transmissão vertical/vertical transmission” e “transovarial transmission”. Todos os artigos publicados em português, inglês e espanhol foram lidos, avaliados e organizados por espécie de mosquito, sorotipo e local onde as amostras foram coletadas. Para evitar a exclusão inadvertida de quaisquer estudos usando essas palavras-chave pré-determinadas, buscas manuais dos artigos citados nas listas de referências também foram realizadas para incluir o maior número possível de publicações (Figura 4). Os dados obtidos por meio do levantamento bibliográfico foram agrupados em tabela Excel e os artigos duplicados foram excluídos com auxílio da plataforma EndNote.

Todos os artigos foram agrupados de acordo com o tipo e gen (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, ZIKV e CHIKV) e o local em que as amostras foram coletadas (país e estado/ilha/província). Foram utilizados apenas estudos que demonstraram transmissão vertical natural em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, isto é, a transferência do vírus de um progenitor masculino ou feminino para a sua descendência¹⁰¹, enquanto que os dados oriundos apenas de condições laboratoriais foram excluídos da análise (Figura 4).

Neste estudo, consideramos a transmissão vertical natural como aquela observada em espécimes infectados coletados no campo, tais como formas imaturas (larvas) e machos adultos. Larvas, machos e fêmeas infectados, que foram criados em laboratório a partir de ovos coletados no campo, também foram considerados como transmissão vertical. A transmissão vertical demonstrada através da infecção de fêmeas

por injeção intratorácica ou alimentação oral com sangue infectado sob condições artificiais de laboratório foi considerada experimental e não foi utilizada neste estudo.

Figura 4 – Coleta de dados. Fluxograma para a elaboração da revisão sistemática da transmissão vertical natural do DENV, ZIKV e CHIKV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no mundo.

A proporção de espécimes infectados é comumente interpretada pela Taxa Mínima de Infecção (número de pools infectados / quantidade total de espécimes x 1000 mosquitos testados) (TMI) e se baseia no pressuposto de que, para cada pool positivo, apenas um indivíduo está infectado^{101,134}. Essa proporção é razoável para a interpretação de dados de baixa ocorrência e tamanho de pools pequenos^{101,134}, como é comumente observado nos estudos sobre transmissão vertical. Para fins de comparação entre as TMI's de cada sorotipo do DENV, sua relação por espécie e estágio de vida, calculamos

as TMI's de todos os artigos incluídos neste levantamento que tenham fornecido informações suficientes para tal.

Para fins de padronização metodológica de obtenção de dados, foram desenvolvidos sete grupos distintos para a realização do cálculo acima citado. O grupo A corresponde à quantidade de pools positivos (infectados) para cada sorotipo sobre o número total de exemplares analisados, independentemente da espécie de estudo (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) e estágio de vida (larva e adulto); os grupos B e C consideram a relação entre pools positivos para cada sorotipo, diferenciando por espécie e desconsiderando o estágio de vida; e os grupos D, E, F e G levam em consideração os pools positivos para cada sorotipo em relação a cada uma das espécies estudadas e separando conforme o estágio de vida (Quadro 1). Dessa forma, um mesmo artigo analisado pode ser enquadrado em diferentes grupos, fornecendo diferentes TMI's para cada um dos grupos criados e, por consequência, uma enorme base de dados mesmo quando utilizando poucos artigos, viabilizando a comparação entre cada um dos grupos.

Grupo	Correspondência	Descrição
A	<i>Aedes</i>	Pools positivos de cada sorotipo (em larvas e/ou adultos)/nº total de exemplares coletados, independentemente da espécie (<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>) e desconsiderando o estágio de vida (larva e adulto) x 1000
B	<i>Ae. aegypti</i>	Pools positivos para cada sorotipo/nº total de <i>Ae. aegypti</i> coletados, desconsiderando o estágio de vida (larva e adulto) x 1000
C	<i>Ae. albopictus</i>	Pools positivos para cada sorotipo(em larvas e/ou adultos)/nº total de <i>Ae. albopictus</i> coletados, desconsiderando o estágio de vida (larva e adulto) x 1000
D	Adultos de <i>Ae. aegypti</i>	Pools positivos para cada sorotipo em adultos/nº total de adultos de <i>Ae. aegypti</i> coletados x 1000
E	Adultos de <i>Ae. albopictus</i>	Pools positivos para cada sorotipo em adultos/nº total de adultos de <i>Ae. albopictus</i> coletados x 1000
F	Larvas de <i>Ae. aegypti</i>	Pools positivos para cada sorotipo em larvas/nº total de larvas de <i>Ae. aegypti</i> coletados x 1000
G	Larvas de <i>Ae. albopictus</i>	Pools positivos para cada sorotipo em larvas/nº total de larvas de <i>Ae. albopictus</i> coletados x 1000

Quadro 1 – Grupos e correspondências. Descrição da realização do cálculo da Taxa Mínima de Infecção para cada um dos grupos criados.

Para a exclusão de possível viés de análise, foram criadas diretrizes de execução do cálculo das TMI's para cada uma das situações de pesquisa observada nos artigos estudados de acordo com os grupos descritos anteriormente. São elas:

- a) Para os grupos A, B, C, D, E. Quando o artigo mostrava transmissão vertical em machos, através da coleta de campo de machos e fêmeas, somente foi utilizado para a realização do cálculo o número total de machos coletados, uma vez que a única forma desse gênero estar infectado ser por via da transmissão vertical, sendo impossível distinguir fêmeas infectadas verticalmente de fêmeas infectadas horizontalmente no campo.
- b) Para os grupos F e G. Quando o fenômeno foi evidenciado por meio da análise das formas larvais, foi considerado o número total de larvas da sua respectiva espécie.
- c) Para os grupos A, B, C, D, E. Quando a transmissão vertical foi demonstrada através da análise de adultos mantidos em condições laboratoriais desde a fase imatura, foi considerada a soma dos machos e fêmeas.
- d) Para todos os grupos. Quando o trabalho foi realizado em diversas localidades, com o objetivo exclusivo de demonstrar transmissão vertical em larvas ou adultos, a quantidade de espécimes estudados e o número de pools infectados de todas as localidades foram somados para a obtenção de uma TMI genérica, ou seja, TMI que fosse representativa para o estudo todo e, não necessariamente, para cada região. Contudo, quando os resultados foram obtidos em diversas localidades, por meio do estudo de larvas e adultos de campo, os dados foram separados entre seus respectivos grupos (D, E, F, G).
- e) Não foram considerados trabalhos com resultados negativos para transmissão vertical natural.
- f) Para os grupos A, B e C, as TMI's foram separadas conforme sorotipo, ou seja, a relação do número de pools positivos para cada sorotipo e o número total de espécimes coletados ($\text{Pools positivos para cada sorotipo} / \text{total de espécimes coletados} \times 1000$). Quando a transmissão vertical natural de um mesmo sorotipo foi evidenciada em larvas e adultos, tais dados foram separados conforme estágio de vida.

g) Para todos os grupos, foi desconsiderado o número de espécimes coletados em cada estação do ano das capturas, bem como os pools positivos para cada estação, e considerada unicamente o total de espécimes coletados e o total de pools positivos ao final de todas as coletas.

h) Os exemplares denominados *Stegomyia albopicta* e *Stegomyia aegypti* foram considerados como sinônimos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, sendo agrupados em seus respectivos grupos.

i) Quando os autores não conseguiram fazer a correta identificação das larvas ou adultos, classificando-os como *Aedes/Stegomyia sp.*, os dados não foram utilizados.

j) Os trabalhos que, apesar de terem coletado machos e fêmeas de campo ou larvas e pupas com posterior manutenção em laboratório até a fase adulta, mas que realizaram os testes para a verificação do respectivo fenômeno em apenas um dos sexos, considerou-se para o cálculo da TMI o total de exemplares do sexo analisado, bem como o total de pools positivos deste mesmo sexo.

4.2 Detecção da transmissão vertical na cidade de São Paulo

4.2.1 Área de Estudo

Para a avaliação da ocorrência da transmissão vertical do DENV em machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, adultos foram desenvolvidos em condições de laboratório, a partir de ovos provenientes do Parque Municipal do Piqueri (23°31'39.98"S, 46°34'24.88"W), localizado no distrito de Tatuapé, Zona Leste da cidade de São Paulo, Brasil (Figura 5). Este parque foi selecionado como área de estudo por estar inserido no distrito da cidade de São Paulo com um dos maiores números de casos humanos autóctones de dengue durante a última grande epidemia desta doença, em 2014/2015¹³⁰. O parque tem, aproximadamente, 100.000 m² de densa cobertura vegetal e cerca de 90 espécies de animais¹³⁵, bem como uma frequência estimada de 36 mil visitantes por mês^{135,136}.

Figura 5 – Parque Municipal do Piqueri. Localização geográfica do Parque Municipal do Piqueri, Zona Leste, São Paulo-SP.

4.2.2 Coleta entomológica

Coletas de campo foram realizadas durante seis semanas consecutivas da primavera de 2014 e de 2015 e seis semanas consecutivas do outono de 2015 e de 2016. Foram utilizadas 36 ovitrampas distribuídas ao longo do Parque Municipal do Piqueri, contendo palhetas parcialmente submersas em solução de 450 ml de água e 50 ml de infusão de feno (Figura 6). Todas as palhetas foram coletadas e substituídas semanalmente e levadas ao Laboratório de Entomologia da Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP / USP).

Figura 6 – Armadilha para ovos (ovitrapa). Armadilha utilizada para a coleta de ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no Parque Municipal do Piqueri, Zona Leste da cidade de São Paulo, Brasil. Chave: 1, Palheta rugosa de madeira (suporte para oviposição); 2, Identificação; 3, Recipiente de cor preta com capacidade de 500 ml.

4.2.3 Manutenção dos espécimes em laboratório

Todas as palhetas consideradas positivas para a presença de ovos foram colocadas em bandejas de plástico, contendo 500 ml de água e ração de peixe Tretramin®, objetivando a eclosão e posterior alimentação das larvas. Todas as larvas no estágio L4 foram identificadas e separadas por espécie: *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Após emergirem das pupas, os mosquitos adultos foram mortos em gelo e separados em pools de 10 indivíduos cada. Os pools foram armazenados em microtubos de polipropileno de 1,5 ml, identificados por gênero, ano e estação de coleta, com a

utilização de mesa fria e, subsequentemente, criopreservados em freezer -80°C (Figura 7).

Figura 7 – Metodologia de pesquisa. Metodologia de obtenção das amostras para a realização da avaliação da presença de transmissão vertical natural no município de São Paulo.

4.2.4 Isolamento do material genético viral

4.2.4.1 Extração do material genético viral

Para a verificação da presença do DENV nas amostras, os mosquitos presentes em cada um dos pools de 10 indivíduos foram macerados em 1 ml de meio Leibovitz 15 (L15), com subsequente centrifugação de 15 minutos a 6.000 rpm. O possível RNA viral presente em cada pool foi extraído a partir de 140 µL do sobrenadante desses macerados utilizando o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden,

Alemanha). Conforme descrito pelo fabricante, 560 µL da solução tampão AVL contendo a solução tampão RNA carreador AVE (0,56 ml solução tampão AVL para cada 5,6 µL solução tampão RNA carreador AVE para cada amostra) foram adicionados aos 140 µL do sobrenadante. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex pulsado durante 15 segundos, e incubadas à temperatura ambiente (15-25°C) por 10 minutos, para eficiente lise celular. Todos os pools foram rapidamente centrifugados, visando remoção das gotas dentro das tampas, e acrescentados 560 µL de etanol (96-100%) em cada amostra, sendo agitado novamente em vórtex de pulso por 15 segundos.

Cuidadosamente, foram aplicados 630 µL da solução descrita anteriormente à coluna presente em um tubo de coleta de 2 ml inclusa no Kit (QIAamp Mini column) e centrifugado a 6.000 x g (8.000 rpm) por 1 minuto, sendo essa etapa repetida posteriormente. Após isso, foram adicionados a cada uma das colunas 500 µL da solução AW1, centrifugadas novamente a 6.000 x g (8.000 rpm) por 1 minuto, sendo descartado o tubo contendo o filtrado. O mesmo processo foi realizado com a solução tampão AW2, contudo, dessa vez, sendo centrifugado a 20.000 x g (14.000 rpm) por 3 minutos. Por fim, foram acrescentadas à coluna 60 µL da solução tampão AVE, sendo encubada a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 6.000 x g (8.000 rpm) por 1 minuto. O RNA viral extraído foi imediatamente armazenado em freezer -80°C.

Para evitarmos produtos amplificados (amplicons) inespecíficos, que potencialmente podem ser gerados durante a reação de amplificação por Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR), realizamos o tratamento do RNA viral com a enzima DNase I Amplification Grade, ref. no. 18068-015 (Invitrogen, Califórnia, EUA).

4.2.4.2 – RT-PCR

Para a realização da técnica RT-PCR, foi aplicada a metodologia descrita por Lanciotti *et al.*¹³⁷, que permite a detecção dos quatro sorotipos simultaneamente, em um procedimento semi-nested, a partir de regiões estruturais do genoma codificantes da membrana primordial e do capsídeo (C-prM) do vírus (Figura 1), gerando amplicons

com tamanhos específicos para cada sorotipo do DENV. Na primeira etapa, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) consensuais (D1 e D2) para os quatros sorotipos dos DENV. No procedimento semi-nested, foram utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 ao 4, respectivamente (Quadro 2). É importante ressaltar que os oligonucleotídeos D1 e D2 foram mantidos a uma concentração de 10 μ m, enquanto que os TS1, TS2, TS3 e TS4, a 20 μ m.

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

Quadro 2 – Amplificação do material genético viral. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar os sorotipos do vírus dengue.

Inicialmente, o fragmento-alvo do RNA viral foi convertido para uma cópia de DNA (cDNA) e, posteriormente, amplificado utilizando o kitSuperScript™ III One-Step RT- PCR with Platinum™*Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Califórnia, EUA), numa reação com volume final de 50 μ l (Quadro 3). Seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, as amostras foram submetidas a um ciclo de 30 minutos a 50°C e 2 minutos a 94°C e, posteriormente expostas a 35 ciclos de desnaturação (94°C, 15s), anelamento dos oligonucleotídeos (60°C, 30s) e extensão (72°C, 30s). Para fins de controle, neste trabalho foram utilizados como controle positivo os quatro sorotipos do DENV e como controle negativo água ultrapura no lugar das amostras testadas.

Componentes	Volume
2X Reaction Mix	25 µL
RNA purificado	10 µL
D1 (Primer sense)	1.3 µL
D2 (Primer anti-sense)	1.3 µL
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	2 µL
Água ultrapura	10,4 µL

Quadro 3 – Primeira reação de RT-PCR. Componentes e volumes utilizados na primeira reação de RT-PCR para a detecção do DENV em machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Subsequentemente, a reação de PCR, agora do tipo “semi-nested”, foi realizada a partir do cDNA resultante da primeira reação de RT-PCR. A reação de PCR “semi-nested” foi realizada com a enzima Go Taq Green Master Mix 2X ref. no. P119C (Promega, EUA), também com solução final igual a 50 µL para cada amostra (Quadro 4). As amostras contendo o cDNA foram submetidas a 25 ciclos de desnaturação (95°C, 30s), anelamento dos oligos (60°C, 30s), e extensão (72°C, 1 min).

Componentes	Volume
D1 (Primer sense)	2,5 µL
TS1 (Primer anti-sense)	2,5 µL
TS2 (Primer anti-sense)	2,5 µL
TS3 (Primer anti-sense)	2,5 µL
TS4 (Primer anti-sense)	2,5 µL
Go Taq Green Master Mix 2X	25 µL
Amostras de cDNA	10 µL
Água ultrapura	2,5 µL

Quadro 4 – Reação de PCR do tipo semi-nested: Componentes e volumes utilizados na primeira reação de PCR do tipo semi-nested para a detecção do DENV em machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

4.2.4.3 Eletroforese

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, acrescido de 5µL do corante solução Gel-Red (Biotium), por 45-60 minutos, a 80-100 volts (V), e visualizados sob luz ultravioleta. Subsequentemente, para dupla confirmação, todas as amostras consideradas positivas foram re-analisadas, dessa vez, apenas com os oligonucleotídeos correspondentes aos sorotipos suspeitos, com posterior realização do teste de sequenciamento.

4.2.4.4 Sequenciamento das amostras positivas

Todas as amostras que apresentaram bandas compatíveis com DENV foram levadas ao laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Os produtos de pós-PCR foram purificados com 4 µL de ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) para cada 10 µL de amostra em cada tubo, seguindo as instruções do fabricante, visando retirar o excesso de nucleotídeos não incorporados. Posteriormente, essas amostras foram encubadas à 37°C, por 15 minutos, para a ativação da ação da enzima, e 80°C, também por 15 minutos, para inativação da ExoSAP-IT™. O DNA purificado foi então sequenciado pelo método de Sanger no equipamento ABI 3100 Automated DNA Sequencer (ABI), usando o Kit de seqüenciamento BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Os fragmentos de DNA dupla fita foram sequenciados em ambas as direções para gerar sequências consenso para cada amostra. A edição da sequência nucleotídica, análise e o alinhamento foram conduzidos utilizando-se a versão 6.0.7 do software Bioedit Sequence Alignment Editor¹³⁸. Todos os nucleotídeos e sequências de aminoácidos foram alinhados usando o software ClustalW¹³⁹ e os polimorfismos dentro da região amplificada foram identificados por comparação com a variedade de sequências disponíveis no GenBank.

4.2.5 Taxa Mínima de Infecção (TMI)

Para fins de comparação calculamos a TMI considerando:

- 1) Todos os espécimes infectados, considerando todas as estações estudadas:

$$\frac{\text{Número de pools infectados}}{\text{Quantidade total de amostras analisadas de todas as estações}} \times 1000$$

- 2) A espécie considerada positiva para transmissão vertical natural do DENV:

$$\frac{\text{Número de pools infectados da espécie positiva}}{\text{Quantidade total de espécimes analisados de todas as estações}} \times 1000$$

- 3) A espécie positiva e a estação do ano na qual a transmissão vertical natural foi relatada:

$$\frac{\text{Número de pools infectados da espécie positiva}}{\text{Quantidade de espécimes analisados de cada estação com pools positivos}} \times 1000$$

5 RESULTADOS

5.1 Transmissão vertical do DENV redor do mundo

Pesquisas realizadas nas bases de dados MEDLINE, SciELO e Lilacs, utilizando a combinação dos termos pré-definidos, forneceram 187 artigos, mas apenas 49 estudos foram considerados relevantes à luz dos critérios de exclusão. Após extenso exame manual das listas de referência de todos os artigos considerados relevantes, foram incluídas mais 13 publicações, totalizando 62 estudos. Foram englobados 41 (66%) artigos sobre transmissão vertical natural do DENV em *Ae. aegypti*, 7 (11%) em *Ae. albopictus* e 14 (23%) em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* simultaneamente.

A quantidade de documentos obtidos sobre o estudo de transmissão vertical natural do DENV em condições naturais revela uma tendência geral crescente na quantidade de publicações científicas por ano, durante o período de 1983 a 2017 (Gráfico1).

Gráfico 1 – Número de artigos publicados sobre transmissão vertical natural por ano. Tendência anual crescente na quantidade de publicações científicas por ano sobre transmissão vertical natural do DENV, durante o período de 1983 a 2017.

América do Sul e Ásia foram os continentes com maior número de artigos publicados ($n = 51$; 82%), seguidos pela América do Norte ($n = 8$; 13%) e América Central ($n = 3$; 5%) (Figura 8). Na Ásia, a maioria dos estudos de transmissão vertical natural do DENV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram publicados na Índia (9/28; 32%) e na Tailândia (7/28; 25%). Na América do Norte, o México foi o único país onde esse fenômeno foi demonstrado para essas espécies, enquanto na América Central somente foi evidenciado na Costa Rica (1/3; 33%) e em Cuba (2/3; 67%). Todos os países em que a transmissão vertical natural do DENV foi confirmada são considerados endêmicos para este arbovírus.

Figura 8 – Transmissão vertical por continente. Distribuição de publicações sobre a transmissão vertical natural do DENV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* por região, no período de 1983 a 2017.

Na América do Sul, a maioria dos estudos publicados foi realizada no Brasil (17/23; 74%), indicando a importância deste país no estudo da dinâmica desses arbovírus em populações de mosquitos vetores. No entanto, esses estudos não são bem distribuídos geograficamente, pois 35% deles (6/17 artigos) foram realizados com espécimes provenientes de Minas Gerais, seguido de Mato Grosso (3/17; 18%), Amazonas (2/17; 12%), São Paulo (2/17; 12%), Roraima (1/17; 6%), Recife (1/17; 6%) e Ceará (1/17; 6%), indicando a importância da produção de conhecimento com

amostragens provenientes de outros Estados onde o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* estão presentes.

5.1.1 Transmissão vertical natural do DENV na Ásia

Na década de 1980, Khin e Than¹⁴⁰ investigaram a possibilidade de o DENV ser naturalmente transmitido verticalmente em *Ae. aegypti*. Em seu estudo, os autores sugeriram a transmissão vertical natural do sorotipo DENV-2 em machos adultos de *Ae. aegypti* de Mianmar. Entretanto, sua importância para a manutenção da circulação de sorotipos do DENV sob condições naturais foi questionada por Watts *et al.*¹⁴¹. Embora esses autores tenham realizado análise em mais de 5 mil larvas, 30 pupas e 80 machos de *Ae. aegypti* em Bangkok, Tailândia, nenhum dos pools foi considerado positivo para qualquer sorotipo, enquanto que fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-2 foram capturadas na mesma área¹⁴¹. Hutamai *et al.*¹⁴² evidenciaram a transmissão vertical natural do vírus da dengue em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Esses autores coletaram amostras de 17 áreas de re-epidemia de dengue nas províncias de Chiang Mai e Lampang, norte da Tailândia, bem como mantiveram as formas imaturas em condições laboratoriais até a fase adulta e testaram para presença do RNA viral do DENV por um ensaio de amplificação baseado em sequência de ácido nucléico (NASBA). No entanto, nenhuma amostra infectada foi encontrada nas amostras testadas (9.825 *Ae. aegypti* e 150 *Ae. albopictus*), corroborando o achado de Watts *et al.*¹⁴¹.

No entanto, em 2011, esse fenômeno foi finalmente observado em Bangkok¹⁰⁸, quando todos os quatro sorotipos do DENV foram detectados em fêmeas e machos adultos de *Ae. aegypti* mantidos continuamente até a fase adulta em laboratório. O DENV-4 foi o sorotipo mais prevalente, seguido pelo DENV-3, DENV-1 e DENV-2. Os autores sugeriram que a demonstração da presença do DENV em formas imaturas provenientes de ambientes naturais é essencial para a rápida identificação das áreas focais da doença^{108,143}, confirmando os resultados obtidos por Thavara *et al.*¹⁴⁴ e Rohani *et al.*¹⁴⁵ em estudos conduzidos em diversas localidades da Tailândia. A partir de então, o entendimento sobre esse fenômeno nesse país tem se aprofundado cada vez mais¹⁴⁶.

A possibilidade da transmissão vertical natural do DENV foi discutida pela primeira vez na Índia em 1991¹⁴⁷, mas nenhum dos pools de machos de *Ae. aegypti* foi positivo. No entanto, desde 2007, diversos estudos têm demonstrado a presença de transmissão vertical natural do DENV em machos e fêmeas *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes deste país^{148–155}. Ao longo dos anos, alguns outros países asiáticos, como a Malásia^{106,156,157}, Singapura^{158,159}, a Indonésia^{160–164} e as Filipinas¹⁶⁵ demonstraram a presença deste fenômeno nos seus territórios, contudo, apesar da tentativa, a transmissão vertical natural do DENV não foi observada em Taiwan¹⁶⁶. A distribuição dos artigos publicados por ano na Ásia encontra-se descrita no Quadro 5.

Quadro 5 – Transmissão vertical na Ásia. Distribuição anual dos artigos publicados sobre transmissão vertical natural na Ásia. Chave: ● artigos positivos para transmissão vertical natural; ○ artigos negativos para transmissão vertical natural.

5.1.2 Transmissão vertical natural do DENV nas Américas

O primeiro estudo de transmissão vertical natural do DENV nas Américas forneceu informações sobre esse fenômeno em espécimes de Trinidad e Tobago¹⁶⁷. Os autores sugeriram que, apesar de a transmissão vertical do DENV não ocorrer com grande frequência, poderia representar um mecanismo importante para o estabelecimento da endemidade, seguida de intensa atividade viral e consequente aumento dos níveis de imunidade em populações humanas. Este poderia ser um possível mecanismo relevante para a manutenção do vírus durante os períodos de baixa precipitação¹⁶⁷. Além disso, a transmissão vertical natural do DENV foi demonstrada em *Ae. aegypti* da Bolívia¹⁶⁸, Argentina¹⁶⁹ e Peru¹³², Cuba^{170,171} e, embora a presença do mesmo fenômeno na mesma espécie na Colômbia não fosse clara¹⁷², sua presença foi confirmada, posteriormente, na cidade de Medellín¹⁷³.

A transmissão vertical natural no Brasil foi descrita pela primeira vez através da detecção do DENV-1 em larvas de *Ae. albopictus* do estado de Minas Gerais, em 1993¹⁷⁴. Ao longo dos anos, outros estudos demonstraram a transmissão vertical natural dos demais sorotipos, com exceção do DENV-4, no mesmo estado. Por exemplo, Cecílio *et al.*¹⁷⁵ detectaram a transmissão vertical de DENV-1 e DENV-2 em larvas de *Ae. aegypti* e, posteriormente, estes mesmo sorotipos em machos e fêmeas de *Ae. albopictus* mantidos em laboratório¹⁷⁶. Vilela *et al.*¹⁷⁷ identificaram DENV-3 em machos e larvas de *Ae. aegypti* capturados em campo em Pompeu e Belo Horizonte, respectivamente. Pessanha *et al.*¹⁷⁸ coletaram ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em Belo Horizonte e após a eclosão subsequente, as larvas foram testadas quanto à presença do DENV. Os autores detectaram a presença de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, corroborando os achados de Vilela *et al.*¹⁷⁷. Mais recentemente, Cecílio *et al.*¹⁷⁹ coletaram ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e detectaram a presença de DENV-2 em quatro pools de larvas de *Ae. aegypti*.

Outros estudos corroboram a hipótese da transmissão vertical natural no Brasil. Em Santos, São Paulo, o sorotipo DENV-3 foi detectado em larvas de *Ae. albopictus*¹⁸⁰, bem como, mais recentemente, outro estudo foi conduzido na cidade de Taubaté, São Paulo, e a transmissão vertical para o DENV-1 não foi detectada nessa localidade¹⁸¹. DENV-2 e DENV-3 foram encontrados em *Ae. aegypti* e adultos de *Ae.*

albopictus provenientes de Fortaleza, Ceará¹⁸² e os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em *Ae. aegypti* na cidade de Recife. O DENV-1 foi isolado de um pool de machos de *Ae. aegypti* na cidade do Rio de Janeiro¹⁸⁴. Em Cuiabá, Mato Grosso, Cruz *et al.*¹⁸⁵ detectaram a presença de DENV-4 em machos e fêmeas de *Ae. aegypti* mantidos em condições de laboratório a partir de ovos coletados no campo. Tais achados corroboram com aqueles obtidos por Serra *et al.*¹⁸⁶, que detectaram transmissão vertical natural desse mesmo sorotipo, com adição do DENV-1, nesse mesmo estado, e com Maia *et al.*¹⁸⁷, que demonstraram transmissão vertical do DENV-4, também no Mato Grosso, em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

A transmissão vertical natural do DENV ainda não foi observada em Roraima¹⁸⁸. No estado do Amazonas, norte do Brasil, a análise de 1.816 exemplares de *Ae. aegypti* (674 adultos e 1.142 formas imaturas) provenientes de 35 municípios apresentaram resultados negativos, contudo, os autores atribuem esse fato ao baixo número de espécimes analisados¹⁸⁹. Por outro lado, em um estudo recente conduzido em municípios do estado do Amazonas analisou-se quase 4.000 larvas de *Ae. aegypti* e relataram 46% dos pools infectados. Todos os sorotipos foram detectados, estando presentes DENV-1 e DENV-4 em todos os municípios investigados¹⁹⁰.

Além disso, a ocorrência de transmissão vertical natural de todos os sorotipos do vírus DENV foi descrita no México. Íbanez-Bernal *et al.*¹⁹¹ realizaram coletas de machos e fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* durante um surto de dengue em 1995 em Reynosa, Tamaulipas, e um pool de dez machos de *Ae. albopictus* foi positivo para DENV-2 e DENV-3. Este foi o primeiro relato de *Ae. albopictus* naturalmente infectado com DENV na América do Norte¹⁹¹. Güther *et al.*¹⁹² coletaram larvas de *Ae. aegypti* de Oaxaca e os manteve em condições laboratoriais até a fase adulta. Os autores detectaram DENV-2, DENV-3 e DENV-4 em 2 pools de fêmeas de Tuxtepec e em 2 de Juchitán. Em Acapulco, Guerrero, Martínez *et al.*¹⁹³ coletou *Ae. aegypti* em uma área onde a dengue foi relatada (casos prováveis ou confirmados) e de um total de 4.146 adultos de *Ae. aegypti* testados, dois pools de machos foram considerados positivos para DENV-1. Da mesma forma, DENV-3 e DENV-4 foram detectados em machos de *Ae. aegypti* na mesma cidade¹⁹⁴. Em Nueva Leon, um pool de quatro fêmeas de *Ae. albopictus* criado em laboratório a partir da fase de ovo foi considerado positivo para DENV. Os autores não puderam, no entanto, determinar o sorotipo¹⁹⁵. Por fim, a transmissão vertical do DENV-2 já foi demonstrada em Cancún, litoral de Quintana

Roo¹⁹⁶ e em Culiacán, Sinaloa¹⁹⁷ em *Ae. aegypti*, bem como o DENV-1 em fêmeas nulíparas dessa mesma espécie, provenientes de um cemitério da cidade de Merida, Iucatã¹⁹⁸.

A única pesquisa realizada na Costa Rica demonstrou a presença de DENV em um pool de machos de *Ae. albopictus* coletado na borda de uma plantação de abacaxi orgânico, evidenciando a circulação natural deste vírus nesta espécie¹⁹⁹. A relação dos artigos publicados por ano nas Américas está descrita no Quadro 6, bem como os países que confirmaram a transmissão vertical natural do DENV nas Américas e na Ásia estão representados na Figura 9.

Quadro 6 – Transmissão vertical nas Américas. Distribuição anual dos artigos publicados sobre transmissão vertical natural nas Américas. Chave: ● artigos positivos para transmissão vertical natural; ○ artigos negativos para transmissão vertical natural.

Figura 9 – Transmissão vertical ao redor do mundo. Casos confirmados de transmissão vertical do DENV ao redor do mundo. Países com confirmação da transmissão vertical natural do DENV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Chave: 1, Brasil; 2, Trinidad e Tobago; 3, Perú; 4, Bolívia; 5, Argentina; 6, Costa Rica; 7, México; 8, Índia; 9, Mianmar; 10, Tailândia; 11, Malásia; 12, Filipinas; 13, Indonésia; 14, Singapura; 15, Cuba; 16, Colômbia.

5.2 Transmissão vertical natural do CHIKV e ZIKV

Utilizando a mesma metodologia e critérios de exclusão descritos, obtivemos 4 artigos sobre transmissão vertical natural do CHIKV e 5 sobre transmissão vertical natural do ZIKV, totalizando 9 artigos. CHIKV foi detectado em machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes da Tailândia²⁰⁰, machos de *Ae. aegypti* do México¹⁹⁴ e da Índia²⁰¹ e em larvas de *Ae. albopictus* desse último país²⁰². Além disso, evidências para a transmissão vertical natural do ZIKV foram relatadas no Brasil, inicialmente em machos de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro²⁰³ e, mais tarde, em machos e fêmeas de *Ae. albopictus*, de Camaçari, Bahia²⁰⁴. Recentemente, novos estudos foram publicados demonstrando a presença desse fenômeno em outras regiões do Brasil, tais quais os estado do Amazonas em *Ae. aegypti*²⁰⁵, e Mato Grosso em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*¹⁸⁷. Além disso, também foi demonstrado pela primeira vez na Tailândia em machos de *Ae. aegypti*²⁰⁶.

5.3 Detecção da transmissão vertical natural do DENV no Parque do Piqueri

Para a detecção da transmissão vertical natural do DENV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, 2.730 machos foram analisados, sendo 1.790 *Ae. albopictus* e 940 *Ae. aegypti* (Tabela 1). Destes espécimes, 400 exemplares foram coletados na primavera de 2014, 900 no outono de 2015, 1.030 na primavera de 2015 e 400 no outono de 2016 (Gráfico 6).

Tabela 1 – Mosquitos analisados. Quantidade total de mosquitos machos analisados de acordo com a espécie e estação do ano.

	2014		2015		Total
	Primavera	Outono	Primavera	Outono	
<i>Ae. aegypti</i>	210	90	580	60	940
<i>Ae. albopictus</i>	190	810	450	340	1.790
Total	400	900	1.030	400	2.730

Gráfico 2 – Mosquitos analisados para cada espécie e estação. Número de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes do Parque Municipal Piqueri durante duas primaveras e dois outonos, no período entre 2014 a 2016.

5.3.1 Detecção dos pools positivos

Para todos os 273 pools testados, verificou-se que 2 pools de machos de *Ae. albopictus* foram positivos com o sorotipo DENV-3, exibindo banda de 290 pb em gel de agarose. Um dos pools positivos de machos de *Ae. albopictus* foi proveniente da primavera de 2014 e o outro do outono de 2015 (Figura 10).

Figura 10– Eletroforese em gel de agarose das amostras positivas. Linhas 1 e 6: peso molecular; linha 2: controle negativo; linha 3: fragmento genômico de DENV-3 em um pool de machos de *Ae. albopictus* coletado durante a primavera de 2014; linha 4: fragmento genômico de DENV-3 em um pool de machos de *Ae. albopictus* coletados durante o outono de 2015; linha 5: fragmentos de DENV-3 de 290 pb como controle positivo.

As duas amostras positivas foram sequenciadas, editadas, alinhadas entre si e comparadas com sequências do GenBank, usando o Software BLAST. Ambas tiveram alto grau de identidade com as sequências de sorotipo DENV-3 do GenBank, e apenas três diferenças na sequência de nucleotídeos foram encontradas entre as amostras obtidas no Parque do Piqueri.

Ambas as amostras apresentaram 99% de identidade com cepas encontradas na cidade de Guarujá, SP, Brasil, e Belo Horizonte, MG, Brasil. A amostra de controle positivo também foi sequenciada e alinhada com as sequências do GenBank, mostrando 100% de identidade com cepas de origem completamente diferentes. As sequências de DENV-3 encontradas neste estudo e as do controle positivo foram depositadas no

GenBank, respectivamente, sob os números de acesso MN025404 / MN025405 / MN025406.

5.3.2 Taxa Mínima de Infecção (TMI)

Comparamos a Taxa Mínima de Infecção geral calculada, considerando todas as estações e espécimes estudados (TMI: 0,73); apenas para *Ae. albopictus* (TMI: 1,11); e para *Ae. albopictus* de cada estação com pools positivos (TMI da primavera de 2014: 5,26; TMI do outono de 2015: 1,23). Uma TMI mais alta para *Ae. albopictus* da primavera de 2014 foi observada quando comparado ao outono de 2015.

5.4 Análise das Taxas Mínimas de Infecção por meio da transmissão vertical natural em mosquitos vetores

Dos 62 artigos publicados sobre a transmissão vertical natural do DENV, foi possível a realização da análise das TMI's de 36 (58%) deles, sendo os dados adquiridos ao longo do presente trabalho também incluídos. Primeiramente, comparamos as TMI's de cada um dos sorotipos do DENV em *Aedes sp.* (análise conjunta de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) e de *Ae. aegypti* separadamente, por meio do teste estatístico de normalidade, para verificar se os dados são modelados por uma distribuição normal. O resultado demonstrou que se tratava de uma distribuição não-normal e, em razão disso, aplicamos o teste não-paramétrico Kruskal Wallis para todos os sorotipos. Não foi possível a realização da análise estatística dos sorotipos presentes em *Ae. albopictus* separadamente devido à baixa quantidade de dados amostrais.

Observamos que não existe diferença estatística entre as TMI's dos referidos sorotipos para o grupo *Aedes sp.* e, igualmente, não observamos diferença estatística entre os sorotipos para o grupo *Ae. aegypti* isoladamente ($p>0,05$) (Gráfico 2). Quando comparamos as TMI's detectadas nas formas larvais e nos adultos da espécie *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, utilizando o teste Mann-Whitney, também não foram constatadas diferença estatísticas ($p>0,05$) (Gráfico 3). Utilizando esse mesmo teste, também comparamos as TMI's descritas a partir de exemplares coletados em campo em

sua fase imatura e mantidos em condições de laboratório até a fase adulta com aqueles coletados diretamente em sua forma adulta no campo e, posteriormente, testados para transmissão vertical natural, com o objetivo de verificar se as TMI's encontradas nas duas circunstâncias são similares, tanto para *Ae. aegypti* quanto para *Ae. albopictus*. Assim como obtido anteriormente, encontramos variações nas TMI's, contudo, nenhuma diferença estatística foi observada ($p>0,05$) (Gráfico 4). Por fim, também comparamos as TMI's encontradas nas larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*,

Gráfico 3 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV. Chave: A, comparação das TMI's dos sorotipos encontrados em *Aedes*; B, comparação das TMI's dos sorotipos encontrados em *Ae. aegypti*.

Gráfico 4 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV. Chave: A, comparação das TMI's entre larvas e adultos de *Ae. aegypti*; B, comparação das TMI's entre larvas e adultos de *Ae. albopictus*.

* exemplares coletados em campo em sua fase imatura e mantidos em condições de laboratório até a fase adulta

** exemplares coletados diretamente em sua forma adulta no campo.

Gráfico 5 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV. Chave: A, TMI's de exemplares de *Ae. aegypti* coletados em campo em sua fase imatura e mantidos em condições de laboratório até a fase adulta com aqueles coletados diretamente em sua forma adulta no campo; B, TMI's de exemplares de *Ae. albopictus* coletados em campo em sua fase imatura e mantidos em condições de laboratório até a fase adulta com aqueles coletados diretamente em sua forma adulta no campo.

Gráfico 6 – Análise das Taxas Mínimas de Infecção do DENV. Chave: A, comparação das TMI's encontradas nas larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

6 DISCUSSÃO

Desde os primeiros relatos de transmissão vertical em condições naturais, discute-se o seu papel na persistência e na manutenção de arboviroses na natureza^{140,141}. Esse fenômeno foi apontado como sendo iniciador de casos humanos¹⁰⁶, um mecanismo determinante na invasão de genótipos competidores¹⁰⁷, bem como no estabelecimento de nível constante de endemicidade^{107,113}. A presença confirmada da transmissão vertical natural do DENV somente em países endêmicos corrobora com esses apontamentos, uma vez que pode indicar uma possível relação entre endemismo e a transmissão vertical, sugerindo que essa forma de transmissão possa representar um importante mecanismo para o estabelecimento da endemicidade¹⁶⁷. Essa observação também pode ser explicada pelo maior interesse da comunidade científica em compreender melhor a dinâmica da transmissão do DENV em países que sofrem com a transmissão constante dessa arbovirose. Nenhuma relação entre endemismo e transmissão vertical foi encontrada para ZIKV ou CHIKV, provavelmente, devido à sua recente introdução nas Américas e ao baixo número de publicações disponíveis para análise. América do Sul e Ásia são os maiores produtores de conhecimento sobre o assunto e isso pode estar relacionado ao elevado número de países endêmicos nos dois continentes. O baixo número de estudos realizados na América do Norte e Central indica a necessidade de melhor entendimento da dinâmica desse fenômeno nessas áreas.

Apesar de alguns países africanos serem considerados endêmicos para a dengue, há falta de publicações sobre nesse assunto neste continente, o que não significa, necessariamente, que a transmissão vertical natural não ocorra ou que áreas com maior quantidade de artigos científicos publicados sejam os locais mais epidemiologicamente relevantes, apenas destaca a importância da realização de estudos em localidades com carência de informação sobre transmissão vertical natural. A detecção desse fenômeno nas populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, em sua maioria, no México, Índia e Brasil destaca a importância do estudo dessas ocorrências na natureza em outras localidades. Adicionalmente, embora seja apontado como vetor do DENV, CHIKV e ZIKV em vários países do mundo, *Ae. albopictus* ainda é considerado vetor potencial desses arbovírus nos países da América, inclusive no Brasil. A confirmação da transmissão vertical natural nessa espécie é, portanto, crucial, pois

demonstra a circulação desses vírus nessas populações e alerta para a possibilidade desse vetor estar atuando na dinâmica de transmissão desses patógenos.

A similaridade das TMI's descritas em estudos realizados através da coleta de formas imaturas mantidas em condições de laboratório até a fase adulta e os exemplares adultos coletados em campo sugere que os resultados obtidos no presente estudo na cidade de São Paulo, com adultos mantidos em condições laboratoriais, são representativos para as populações adultas de campo de *Ae. albopictus*. Além disso, a ausência de diferença estatística entre larvas e adultos pode estar relacionada ao fato de que a maioria dos trabalhos realizados com larvas avaliou o estágio larval L4, portanto, por ser um estágio muito próximo à fase adulta³, pode ter influenciado nos resultados encontrados.

Em condições de laboratório, fêmeas de *Ae. albopictus* foram capazes de transmitir verticalmente todos os 4 sorotipos de DENV para a prole, embora as taxas de transmissão variassem de acordo com o sorotipo e linhagem do vírus, com o DENV-3 sendo menos transmitido verticalmente²⁰⁷. Quando analisamos essas taxas a nível mundial, apesar dos resultados apontarem para variações nas TMI's entre e intra-sorotipos, eles não corroboram com a hipótese de que exista uma tendência geral de favorecimento na transmissão vertical natural de um determinado sorotipo sobre o outro, uma vez que na natureza as TMI's não exibiram diferenças estatísticas. Os valores das TMI's encontradas em São Paulo são semelhantes aos anteriormente descritos na literatura, geralmente ocorrendo em baixas taxas e apresentando grandes variações de acordo com as populações de mosquitos¹¹⁵. Além disso, o fato de a TMI tipicamente exibir considerável variabilidade temporal nas populações vetoriais¹⁰⁸ explica os valores obtidos em diferentes estações do ano.

Da mesma forma, baixas taxas de transmissão vertical de DENV foram encontradas para *Ae. aegypti*, mesmo para cepas reconhecidamente mais suscetíveis à infecção oral²⁰⁷. Resultados semelhantes foram encontrados com cepas de DENV e populações brasileiras de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*⁹⁶, indicando que, apesar da importância do *Ae. aegypti* para transmissão horizontal, esta espécie pode ser menos relevante na manutenção do DENV em períodos de baixa densidade vetorial^{122,207}. Nossos resultados corroboram com esses achados, uma vez que analisamos ambas as espécies, mas não foram encontrados pools positivos para *Ae. aegypti*. Outra possível

hipótese para esse achado relaciona-se ao fato de termos analisado mais exemplares da espécie *Ae. albopictus* do que da espécie *Ae. aegypti*.

Neste estudo, relatamos a transmissão vertical natural do DENV em *Ae. albopictus* pela primeira vez na cidade de São Paulo. Especificamente, DENV-3 foi detectado em dois grupos de machos *Ae. albopictus*. Apenas três estudos demonstraram transmissão vertical natural do DENV-3 em populações brasileiras de *Ae. albopictus*: um em populações provenientes do estado de Minas Gerais¹⁷⁸, outro do estado do Ceará¹⁸² e outro último da cidade de Santos (litoral do Estado de São Paulo)¹⁸⁰. A presença de DENV-3 em *Ae. albopictus* provenientes do Parque Municipal do Piqueri sugere que este mosquito pode estar atuando na dinâmica de transmissão deste arbovírus e mantendo sua circulação neste ambiente.

Curiosamente, nenhum caso humano autóctone de DENV-3 foi relatado na cidade de São Paulo desde 2010²⁰⁸. Esse fato fortalece a hipótese de que a transmissão vertical poderia manter a circulação viral durante períodos interepidêmicos, sugerindo circulação silenciosa de DENV-3 em áreas verdes da cidade.

Em um trabalho realizado com cepas de alta e baixa susceptibilidade do sorotipo DENV-2 em *Ae. aegypti*, Mourya *et al.*¹²⁰ argumentam que a transmissão vertical é maior em larvas que eclodem após períodos mais longos, provavelmente devido ao aumento do número de cópias do vírus dentro dos ovos. Assim, parece que condições ambientais desfavoráveis, tal qual baixa disponibilidade de água, favorecem a ocorrência de transmissão vertical, o que pode explicar nossos achados de DENV-3 em *Ae. albopictus* durante a primavera de 2014 e outono de 2015, quando foram registrados baixos índices pluviométrico (primavera 2014: 5,1 mm e outono 2015: 3,3 mm) quando comparadas com os outros períodos (primavera 2015: 26,5 mm e outono 2016: 15,0 mm)²⁰⁹. Adicionalmente, a confirmada ocorrência de maiores taxas de transmissão vertical do DENV em países de clima árido, bem como em períodos secos¹⁰³, reforça essa hipótese e reafirma seu papel como um mecanismo de manutenção em períodos desfavoráveis¹⁶⁵.

É importante ressaltar que, para que a transmissão vertical natural seja detectada pelas condições estabelecidas neste estudo, é necessário que uma fêmea infectada, que tenha ovipostado nas ovitrampas, tenha transmitido com sucesso o vírus

verticalmente que as larvas tenham sobrevivido até a fase adulta para, finalmente, serem analisadas. Quando as taxas de infecção por mosquitos são baixas, mais mosquitos são necessários para maiores chances de detecção do vírus. Em nosso estudo, analisamos 940 *Ae. aegypti* e 1.790 *Ae. albopictus* adultos, que foram mantidos em laboratório a partir de ovos coletados no parque. No entanto, considerando que ambas as espécies depositam seus ovos em mais de um recipiente no mesmo ciclo gonotrófico^{210,211}, possivelmente a maioria dos mosquitos analisados não foram originários da mesma mãe. Assim, considerando a dificuldade em detectar esse fenômeno na natureza, o sucesso na detecção da transmissão vertical natural de um sorotipo sem casos autóctones recentes na cidade²⁰⁸, em *Ae. albopictus* machos, em duas estações diferentes, indica que o vírus estava circulando em taxas significativas nessa população de vetores e sendo transmitido verticalmente.

Devido ao fato de os parques urbanos serem áreas de acesso público aberto, a expansão de diversos arbovírus através de visitantes infectados é favorecida. Além disso, o contato contínuo entre humanos, vetores competentes e vírus torna essa área de alto risco de dengue e outras infecções por arbovírus, levantando a discussão sobre a relevância das áreas verdes urbanas na dinâmica de transmissão e manutenção de patógenos²¹². Devido às características biológicas do mosquito *Ae. albopictus*, tal qual sua competência vetorial para os vírus da dengue, febre amarela, Zika e chikungunya em condições de laboratório^{69,83,95,96}, nossos achados reforçam a importância da vigilância e controle dessa espécie, uma vez que pode estar atuando na manutenção da circulação do DENV, favorecendo a infecção da população humana que vive próximo ou mesmo visitantes que frequentam o parque, bem como a expansão do vírus para outras áreas e reforço das ações de controle também em períodos inter-epidêmicos.

7 CONCLUSÕES

- a) Nossos achados sugerem uma possível relação entre endemismo e a transmissão vertical do DENV e corroboram com a afirmação de que a transmissão vertical favorece a manutenção de patógenos na população de vetores.
- b) A quantidade de estudos que relata a presença da transmissão vertical natural do DENV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* confirma a veracidade do fenômeno;
- c) A confirmação da transmissão vertical natural de DENV, ZIKV e CHIKV em *Ae. albopictus* alerta para a possibilidade desse vetor estar atuando na dinâmica de transmissão desses arbovírus;
- f) A presença de DENV-3 em *Ae. albopictus* provenientes do Parque Municipal do Piqueri sugere que este mosquito pode estar atuando na dinâmica de transmissão deste patógeno e mantendo sua circulação neste ambiente;
- g) A detecção de DENV-3 em períodos em que nenhum caso autóctone humano desse sorotipo foi registrado sugere circulação silenciosa.
- h) Mesmo sem casos autóctones humanos relatados, o DENV-3 estava circulando em taxas significativas na população de *Ae. albopictus* e sendo transmitido verticalmente;
- d) As TMI's analisadas não corroboram com a hipótese de que exista uma tendência geral de favorecimento na transmissão vertical natural de um determinado sorotipo sobre o outro, bem como entre espécies;
- e) As TMI's encontradas no Parque do Piqueri do DENV-3 em *Ae. albopictus* são similares àquelas descritas na literatura;

REFERÊNCIAS

1. Higgs S, Beaty BJ. Natural Cycles of Vector-Borne Pathogens. In: Marquardt W, editor. *Biology of Disease Vectors*. EUA: Academic Press; 2004. p. 167–85.
2. Cann AJ. Genomes. In: Cann AJ, editor. *Principles of Molecular Virology*. Principles of Molecular Virology. Elsevier; 2012. p. 55–101.
3. Chouin-Carneiro T, dos Santos FB. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. In: Shields DC, editor. *Biological Control of Pest and Vector Insects*. InTech; 2017. p. 231–256.
4. Darwish M, Gorman B, Kalunda M. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. Geneva: WHO; 1985.
5. Davis LE, Beckham JD, Tyler KL. North American Encephalitic Arboviruses. *Neurol Clin*. 2008;26(3):727–57.
6. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002;33(4):330–42.
7. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;951(1):13–24.
8. Consoli RAGB, Lourenço-De-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.
9. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1102–53.
10. Chambers TJ, Hahn CS, Ricardo Galler L, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44(1):649–88.
11. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med*. 2016;17(6):671–9.
12. Bennett SN. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Wallingford: CABI; 1997. p. 322–33.
13. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):480–96.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Dengue – diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. 5th ed. Brasília; Ministério da Saúde; 2016.
15. Seneviratne S, Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol*. 2010;55(1):68.

16. Taail PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saude Publica*. 2002;18(3):867–71.
17. Campbell LP, Luther C, Moo-Llanes D, Ramsey JM, Danis-Lozano R, Peterson AT. Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015;370(1665):1-9.
18. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
19. Gubler DJ, Kuno G, Markoff L. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Wilkins; 2007. p. 1153–252.
20. Cunha RV, Geniole LA, Brito CA, França NP, Neto OG, Nascimento DD, et al. Zika: Abordagem clínica na atenção básica. Brasília: Fiocruz Mato Grosso do Sul; 2016.
21. Dias ÍK, Sobreira CL, Martins RM, Santana KF, Lopes MS, Joventino ES, et al. Zika virus: - a review of the main aspects of this type of arbovirosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(3):261–9.
22. Dick GW., Kitchen S., Haddow A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46(5):509–20.
23. Hayes EB. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1347–50.
24. MacNamara F. Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1954;48(2):139–45.
25. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360(24):2536–43.
26. Cardoso CW, Paploski IAD, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MM, Campos GS, et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(12):2274–6.
27. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1885–6.
28. Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
29. Zhang Q, Sun K, Chinazzi M, Pastore y Piontti A, Dean NE, Rojas DP, et al. Spread of Zika virus in the Americas. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(22):E4334–43.
30. Doughty CT, Yawetz S, Lyons J. Emerging Causes of Arbovirus Encephalitis in North America: Powassan, Chikungunya, and Zika Viruses. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17(2):12.

31. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*. 2014;19(9).
32. World Health Organization. Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré Syndrome. [acessado em 14 de novembro de 2019]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250633>
33. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016;534(7606):267–71.
34. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*. 2016;374(20):1981–7.
35. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653–60.
36. Cabral CM, Nóbrega ME, Leite PL, Souza MS, Teixeira DC, Cavalcante TF, et al. Descrição clínico-epidemiológica dos nascidos vivos com microcefalia no estado de Sergipe, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2017;26(2):245–54.
37. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016;352(6287):816–8.
38. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*. 2016;165(5):1081–91.
39. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Concludes Zika Causes Microcephaly and Other Birth Defects [cited 2019 Mar 1]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/media/releases/2016/s0413-zika-microcephaly.html>
40. Griffin DE. Alphaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1023–68.
41. Schmaljohn AL, McClain D. Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae). In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston: University of Texas; 1996.
42. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology*. 2009;393(2):183–97.
43. Zanotto PM de A, Leite LC de C. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Aug 28;9(1):1–6.
44. Ross RW. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)*. 2009;54(02):177–91.

45. Kucharz EJ, Cebula-Byrska I. Chikungunya fever. *Eur J Intern Med*. 2012;23(4):325–9.
46. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet* [Internet]. 2012 Feb;379(9816):662–71. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60281-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X)
47. Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016;50(36):1–7.
48. Azevedo RS, Oliveira CS, Vasconcelos PF. Chikungunya risk for Brazil. *Rev Saude Publica*. 2015;49:1–6.
49. Lo Presti A, Cella E, Angeletti S, Ciccozzi M. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. *Infect Genet Evol*. 2016;41:270–8.
50. Wielanek AC, Monredon J De, Amrani M El, Roger JC, Serveaux JP. Guillain-Barré syndrome complicating a Chikungunya virus infection. *Neurology*. 2007;69(22):2105–7.
51. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. *PLoS Med*. 2008;5(3):e60.
52. Gérardin P, Sampériz S, Ramful D, Boumahni B, Bintner M, Alessandri J-L, et al. Neurocognitive Outcome of Children Exposed to Perinatal Mother-to-Child Chikungunya Virus Infection: The Chimere Cohort Study on Reunion Island. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e2996.
53. Bandeira AC, Campos GS, Sardi SI, Rocha VFD, Rocha GCM. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: First report in Brazil. *IDCases*. 2016;5:57–9.
54. Lyra P, Campos G, Bandeira I, Sardi S, Costa L, Santos F, et al. Congenital Chikungunya Virus Infection after an Outbreak in Salvador, Bahia, Brazil. *Am J Perinatol Reports*. 2016;06(03):e299–300.
55. Osanai CH, Travassos AP, Tang AT, Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25(1):53–4.
56. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;81(2):245–6.
57. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):253.
58. Nogueira RM, Miagostovich MP, Filippis M, Pereira M, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(7):925–6.

59. Acosta PO, Maito RM, Granja F, Cordeiro JS, Siqueira T, Cardoso MN, et al. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1979–81.
60. Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):255–6.
61. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*. 1994;58(3):491–562.
62. Nunes MRT, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MUG, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 2015;13:102.
63. Souza TM, Vieira YR, Delatorre E, Barbosa-Lima G, Luiz RL, Vizzoni A, et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. *Sci Rep*. 2019;9(1):2760.
64. Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Lima AF, Cunha M dos P, Wiley MR, et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6): e0005630
65. Souza TMA, Azeredo EL, Badolato-Corrêa J, Damasco PV, Santos C, Petitinga-Paiva F, et al. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Curr*. 2017;9(2760).
66. Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017;546(7658):411–5.
67. Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 2017;546(7658):406–10.
68. Kantor IN. Dengue, Zika y Chikungunya. *Medicina (B Aires)*. 2016;76(2):93–7.
69. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004543.
70. Charlwood JD, Rafael JA, Wilkes TJ. Métodos de determinar a idade fisiológica em Díptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. *Acta Amaz*. 1980;10(2):311–33.
71. de Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2006;22(10):2079–84.
72. Silva HH, Silva LG, Lira KD. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop*. 1998;27(1):53–63.

73. Silva HH, Silva IG. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(4):349–55.
74. Forattini OP. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia e Epidemiologia*. 2nd ed. São Paulo: EdUsp; 2002.
75. Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*. 2002;64(2):205–7.
76. Bermudi PM, Kowalski F, Menzato MM, Ferreira MD, Passos WB, Oku VJ, et al. Criadouro de *Aedes aegypti* em reservatório subterrâneo de água da chuva: um alerta. *Rev Saude Publica*. 2017;51:122.
77. Silva VC, Scherer PO, Falcão SS, Alencar J, Cunha SP, Rodrigues IM, et al. Diversity of oviposition containers and buildings where *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* can be found. *Rev Saude Publica*. 2006;40(6):1106–11.
78. Lima-Camara TN, Urbinatti PR, Chiaravalloti-Neto F. Finding *Aedes aegypti* in a natural breeding site in an urban zone, São Paulo, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016;50(3):1–4.
79. Kay BH, Ryan PA, Russell BM, Holt JS, Lyons SA, Foley PN. The importance of subterranean mosquito habitat to arbovirus vector control strategies in north Queensland, Australia. *J Med Entomol*. 2000;37(6):846–53.
80. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. *Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose*. 2nd ed. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. 1–119 p.
81. Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. *Dengue: Vírus e Vetor* [citado 14 de novembro de 2019]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html>
82. Teixeira MG, Barreto ML, Costa MC, Ferreira LD, Vasconcelos PF, Cairncross S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Heal*. 2002;7(9):757–62.
83. Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux A-B, Lourenco-de-Oliveira R. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J Virol*. 2014;88(11):6294–306.
84. Teixeira MG, Barreto ML, Costa M da CN, Ferreira LDA, Vasconcelos PFC, Cairncross S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health*. 2002;7(9):757–62.
85. Sprenger D, Wuithiranyagool T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J Am Mosq Control Assoc*. 1986;2(2):217–9.
86. Forattini OP. Identificação de *Aedes (Stegomyia) Albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saude Publica*. 1986;20(3):244–5.

87. Brito M, Marques GR, Marques CC, Tubaki RM. Primeiro encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Estado de São Paulo (Brasil). Rev Saude Publica. 1986;20(6):489–489.
88. Gomes AC, Marques GR. Encontro de criadouro natural de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica. 1988;22(3):245–245.
89. Kambhampati S, Black WC, Rai KS. Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. Heredity (Edinb). 1991;67(1):85–94.
90. Santos RLC Dos. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). Rev Saude Publica. 2003;37(5):671–3.
91. Pancetti FG, Honório NA, Urbinatti PR, Lima-Camara TN. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(1):87–9.
92. Saraiva JF, Maitra A, Galardo AK, Scarpassa VM. First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the state of Amapá, northern Brazil. Acta Amaz. 2019;49(1):71–4.
93. Braks MA, Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. Convergent Habitat Segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil and Florida. J Med Entomol. 2003;40(6):785–94.
94. Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2004;18(3):215–27.
95. Miller BR, Ballinger ME. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82(3):476–7.
96. Castro MG, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenço-de-Oliveira R. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(8):809–14.
97. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, et al. Chikungunya Virus in *Aedes albopictus*, Italy. Emerg Infect Dis. 2008;14(5):852–4.
98. Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge J-M, Souarès Y, Failloux A-B, et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. Emerg Infect Dis. 2011;17(5):910–3.
99. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*?. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2):e2681.
100. Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do

- dengue. *Inf Epidemiol Sus.* 1999;8(4):5–33.
101. Clements AN. Arboviruses - characteristics and concepts. In: Clements AN, editor. *The biology of mosquitoes: Transmission of viruses and interactions with bacteria.* 3rd ed. Wallingford: CABI; 2012. p. 90–173.
 102. Rosen L. Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *C R Acad Sci III.* 1987;304(13):347–50.
 103. Lequime S, Paul RE, Lambrechts L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. Hobman TC, editor. *PLOS Pathog.* 2016;12(5):e1005548.
 104. Agarwal A, Dash PK, Singh AK, Sharma S, Gopalan N, Rao PV, et al. Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(7):e2990.
 105. Li C-X, Guo X-X, Deng Y-Q, Xing D, Sun A-J, Liu Q-M, et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(4):e23–e23.
 106. Lee HL, Rohani A. Transovarial transmission of dengue in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. *Dengue Bull.* 2005;29:106–111.
 107. Murillo D, Holechek SA, Murillo AL, Sanchez F, Castillo-Chavez C. Vertical Transmission in a Two-Strain Model of Dengue Fever. *Lett Biomath.* 2014;1(2):249–71.
 108. Thongrunkiat S, Maneekan P, Wasinpiyamongkol L, Prummongkol S. Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *J Vector Ecol.* 2011;36(1):147–52.
 109. Ciota AT, Bialosuknia SM, Ehrbar DJ, Kramer LD. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):880–2.
 110. Honório NA, Wiggins K, Eastmond B, Câmara DC, Alto BW. Experimental Vertical Transmission of Chikungunya Virus by Brazilian and Florida *Aedes albopictus* Populations. *Viruses.* 2019;11(4):353.
 111. Andraud M, Hens N, Marais C, Beutels P. Dynamic Epidemiological Models for Dengue Transmission: A Systematic Review of Structural Approaches. Nishiura H, editor. *PLoS One.* 2012;7(11):e49085.
 112. Nishiura H. Mathematical and statistical analyses of the spread of dengue. *Dengue Bull.* 2006;30(1):51–67.
 113. Esteva L, Vargas C. Influence of vertical and mechanical transmission on the dynamics of dengue disease. *Math Biosci.* 2000;167(1):51–64.

114. Adams B, Boots M. How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. *Epidemics*. 2010;2(1):1–10.
115. Grunnill M, Boots M. How Important is Vertical Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *J Med Entomol*. 2016;53(1):1–19.
116. Yang HM. The transovarial transmission in the dynamics of dengue infection: Epidemiological implications and thresholds. *Math Biosci*. 2017;286:1–15.
117. Murillo D, Murillo A, Lee S. The Role of Vertical Transmission in the Control of Dengue Fever. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(5):803.
118. Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(2):158–61.
119. Shroyer DA. Vertical maintenance of dengue-1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc*. 1990;6(2):312–4. 7
120. Mourya DT, Gokhale, Basu A, Barde P V, Sapkal GN, Padbidri VS, et al. Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virol*. 2001;45(2):67–71.
121. Ruiz-Guzmán G, Ramos-Castañeda J, Hernández-Quintero A, Contreras-Garduño J. Costs and benefits of vertical and horizontal transmission of dengue virus. *J Exp Biol*. 2016;219(22):3665–9.
122. Buckner EA, Alto BW, Lounibos LP. Vertical transmission of Key West dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. *J Med Entomol*. 2013;50(6):1291–7.
123. Fontaine A, Lequime S, Moltini-Conclois I, Jiolle D, Leparç-Goffart I, Reiner RC, et al. Epidemiological significance of dengue virus genetic variation in mosquito infection dynamics. *PLOS Pathog*. 2018;14(7):e1007187.
124. Armstrong PM, Rico-Hesse R. Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* to Infection by the American and Southeast Asian Genotypes of Dengue Type 2 Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2001;1(2):159–68.
125. Alto BW, Lounibos LP, Mores CN, Reiskind MH. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2008;275(1633):463–71.
126. Bosio CF, Thomas RE, Grimstad PR, Rai KS. Variation in the Efficiency of Vertical Transmission of Dengue-1 Virus by Strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1992;29(6):985–9.
127. Brasil. IBGE. Brasil em Síntese: São Paulo. [Acessado em 28 de junho de 2018]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/panorama>
128. Brasil. IBGE. Projeção da população. [Acessado em 28 de junho de 2018].

Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>

129. Demographia. Demographia World Urban Areas (Built-Up Urban Areas or Urban Agglomerations). Paris: Demographia. 2019.
130. Brasil. Sistema Único de Saúde. Coordenadoria de Vigilância em Saúde. Prefeitura de São Paulo. Plano de Contingência Municipal da Dengue: Município de São Paulo - 2015/2016. Brasil: Ministério da Saúde; 2016 [citado em 15 de dezembro de 2018]. Disponível em: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/chamadas/plano_contingencia_final_1462895236.pdf
131. Ferreira-de-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. Parasit Vectors. 2018;11(1):77.
132. Cabezas C, García MP, Valle J, Yañez P, Fachin L, Sinti C, et al. Transmisión vertical del virus del dengue en el *Aedes aegypti*, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015;32(1):191.
133. Medeiros-Sousa AR, Ceretti W, 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;29(3):275–9.
134. Gu W, Lampman R, Novak RJ. Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. Med Vet Entomol. 2004;18(2):200–4.
135. Brasil. Prefeitura de São Paulo. Piqueri. [acessado em 9 de fevereiro de 2019]. Disponível em: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/parques/regiao_leste/index.php?p=5761
136. Ferraz I, Rocha L. Estudo dos parques paulistanos. São Paulo: Sinaencon; 2008 [citado em 16 de dezembro de 2018]. Disponível em: <http://sinaenco.com.br/wp-content/uploads/2016/08/ParquesPaulistanos2008.pdf>
137. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992;30(3):545–51.
138. Hall T. BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP/Vista/7. Nucleic Acids Symp Ser. 1999;41(1):95–8.
139. Thompson J. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997;25(24):4876–82.
140. Khin MM, Than KA. Transovarial Transmission of Dengue 2 Virus by *Aedes aegypti* in Nature. Am J Trop Med Hyg. 1983;32(3):590–4.
141. Watts DM, Harrison BA, Pantuwatana S, Klein TA, Burke DS. Failure to Detect Natural Transovarial Transmission of Dengue Viruses by *Aedes aegypti* and

- Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) 1. J Med Entomol. 1985;22(3):261–5.
142. Hutamai S, Suwonkerd W, Suwannchote N, Somboon P, Prapanthadara L. A survey of dengue viral infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from re-epidemic areas in the north of Thailand using nucleic acid sequence based amplification assay. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007;38(3):448–54.
 143. Thongrungrat S, Wasinpiyamongkol L, Maneekan P, Prummongkol S, Samung Y. Natural transovarial dengue virus infection rate in both sexes of dark and pale forms of *Aedes aegypti* from an urban area of Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012;43(5):1146–52.
 144. Thavara U, Siriyasatien P, Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Anantapreecha S, Wongwanich R, et al. Double infection of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006;37(3):468–76.
 145. Rohani A, Zamree I, Lee HL, Mustafakamal I, Norjaiza MJ, Kamilan D. Detection of transovarial dengue virus from field-caught *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* larvae using C6/36 cell culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques. Dengue Bull. 2007;31(1):47–57.
 146. Bawalan RJG, Salazar NP, Heralde FM. Transovarial Transmission of Dengue Virus in *Aedes aegypti*: A Case in Quezon City, Philippines. Acta Med Philipp. 2014;48(4):23–9.
 147. Ilkal MA, Dhanda V, Hassan MM, Mavale M, Mahadev PV, Shetty PS, et al. Entomological investigations during outbreaks of dengue fever in certain villages in Maharashtra state. Indian J Med Res. 1991;93:174–8.
 148. Thenmozhi V, Hiriyani JG, Tewari SC, Philip Samuel P, Paramasivan R, Rajendran R, et al. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Kerala, a southern Indian state. Jpn J Infect Dis. 2007;60(5):245–9.
 149. Angel B, Joshi V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. J Vector Borne Dis. 2008;45(1):56–9.
 150. Arunachalam N, Tewari SC, Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. Indian J Med Res. 2008;127(4):395–7.
 151. Bina P Das, Katyal R, Abhay S, Raina VK, Saxena VK, Lal S. Natural vertical transmission of dengue virus in peak summer collections of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from urban areas of Jaipur (Rajasthan) and Delhi. J Commun Dis. 2008;40(2):155–7.
 152. Joshi V, Singhi M, Chaudhary RC. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90(6):643–4.

153. Thenmozhi V, Tewari SC, Manavalan R, Balasubramanian A, Gajanana A. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in southern India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94(5):507.
154. Dutta P, Khan SA, Chetry S, Dev V, Sarmah CK, Mahanta J. First evidence of dengue virus infection in wild caught mosquitoes during an outbreak in Assam, Northeast India. *J Vector Borne Dis.* 2015;52(4):293–8.
155. Angel A, Angel B, Joshi V. Rare occurrence of natural transovarial transmission of dengue virus and elimination of infected foci as a possible intervention method. *Acta Trop.* 2016;155(1):20–4.
156. Ahmad R, Ismail A, Saat Z, Lim LH. Detection of dengue virus from field *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adults and larvae. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1997;28(1):138–42.
157. Rohani A, Aidil Azahary AR, Malinda M, Zurainee MN, Rozilawati H, Wan Najdah WM, et al. Eco-virological survey of *Aedes* mosquito larvae in selected dengue outbreak areas in Malaysia. *J Vector Borne Dis.* 2014;51(4):327–32.
158. Kow CY, Koon LL, Yin PF. Detection of Dengue Viruses in Field Caught Male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by Type-Specific PCR. *J Med Entomol.* 2001;38(4):475–9.
159. Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(5):578–86.
160. Mulyatno KC, Yamanaka A, Yotopranoto S, Konishi E. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008-2011. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(3):274–6.
161. Sorisi AM, Umniyati SR, Satoto TB. Transovarial Transmission Index of Dengue Virus on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes in Malalayang District in Manado, North Sulawesi, Indonesia. *Trop Med J.* 2011;1(2):87–95.
162. Satoto TB, Umniyati SR, Astuti FD, Wijayanti N, Gavotte L, Devaux C, et al. Assessment of vertical dengue virus transmission in *Aedes aegypti* and serotype prevalence in Bantul, Indonesia. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2014;4:S563–8.
163. Wanti W, Sila O, Irfan I, Sinaga E. Transovarial Transmission and Dengue Virus Serotypes in *Aedes Aegypti* in Kupang. *Kemas J Kesehat Masy.* 2016;12(1):131–8.
164. Satoto TB, Listyantanto A, Agustjahjani SD, Josef HK, Widartono BS. Vertical transmission of dengue virus in the Yogyakarta airport area. *Environ Health Prev Med.* 2018;23(1):22.
165. Edillo FE, Sarcos JR, Sayson SL. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in selected sites in Cebu City, Philippines. *J Vector Ecol.* 2015;40(2):282–91.

166. Chen C-F, Shu P-Y, Teng H-J, Su C-L, Wu J-W, Wang J-H, et al. Screening of Dengue Virus in Field-Caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by One-Step SYBR Green-Based Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay During 2004–2007 in Southern Taiwan. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2010;10(10):1017–25.
167. Hull B, Tikasingh E, de Souza M, Martinez R. Natural Transovarial Transmission of Dengue 4 Virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33(6):1248–50.
168. Le Goff G, Revollo J, Guerra M, Cruz M, Barja Simon Z, Roca Y, et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. *Parasite.* 2011 Aug 15;18(3):277–80.
169. Espinosa M, Giamperetti S, Abril M, Seijo A. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56(2):165–7.
170. Gutiérrez-Bugallo G, Rodríguez-Roche R, Díaz G, Vázquez AA, Alvarez M, Rodríguez M, et al. First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. *Acta Trop.* 2017 Oct;174:146–8.
171. Gutiérrez-Bugallo G, Rodríguez-Roche R, Díaz G, Pérez M, Mendizábal ME, Peraza I, et al. Spatio-temporal distribution of vertically transmitted dengue viruses by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Arroyo Naranjo, Havana, Cuba. *Trop Med Int Heal.* 2018;23(12):1342–9.
172. Romero-Vivas CM, Leake CJ, Falconar AK. Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. *Med Vet Entomol.* 1998;12(3):284–8.
173. Pérez-Pérez J, Sanabria WH, Restrepo C, Rojo R, Henano E, Triana O, et al. Vigilancia virológica de *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Stegomyia) albopictus* como apoyo para la adopción de decisiones en el control del dengue en Medellín. *Biomédica.* 2017;37:155–66.
174. Serufo JC, Oca HM de, Tavares VA, Souza AM, Rosa R V., Jamal MC, et al. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993;88(3):503–4.
175. Cecílio AB, Resende MC, Jorge FCM, Resende SM, Brito MG, Kroon EG. Transovarial transmission of dengue virus 1 and 2 as showed by detection in *Aedes aegypti* larvae. *Soc Path.* 2004;9(1):57–60.
176. Cecílio AB, Campanelli ES, Souza KP, Figueiredo LB, Resende MC. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Braz J Biol.* 2009;69(1):123–7.
177. Vilela APP, Figueiredo LB, dos Santos JR, Eiras ÁE, Bonjardim CA, Ferreira PCP, et al. Dengue Virus 3 Genotype I in *Aedes aegypti* Mosquitoes and Eggs, Brazil, 2005–2006. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):989–92.

178. Pessanha JEM, Caiaffa WT, Cecilio AB, Iani FC de M, Araujo SC, Nascimento JC, et al. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):103–5.
179. Cecílio SG, Júnior WFS, Tótola AH, Magalhães CL, Ferreira JMS, de Magalhães JC. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae from southeastern Brazil. *J Vector Ecol*. 2015;40(1):71–4.
180. de Figueiredo ML, de C Gomes A, Amarilla AA, de S Leandro A, de S Orrico A, de Araujo RF, et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virol J*. 2010;7(1):152.
181. Moraes A, Cortelli FC, Miranda TB, Aquino DR, Cortelli JR, Guimarães MI, et al. Transovarial transmission of dengue 1 virus in *Aedes aegypti* larvae: real-time PCR analysis in a Brazilian city with high mosquito population density. *Can J Microbiol*. 2018;64(6):393–400.
182. Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, et al. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. Vasilakis N, editor. *PLoS One*. 2012;7(7):e41386.
183. Guedes DR, Cordeiro MT, Melo-Santos MA, Magalhaes T, Marques E, Regis L, et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J Vector Borne Dis*. 2010;47(2):67–75.
184. dos Santos TP, Cruz OG, da Silva KA, de Castro MG, de Brito AF, Maspero RC, et al. Dengue serotype circulation in natural populations of *Aedes aegypti*. *Acta Trop*. 2017;176:140–3.
185. Cruz LC de TA da, Serra OP, Leal-Santos FA, Ribeiro ALM, Shlessarenko RD, Santos MA dos. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(1):18–25.
186. Serra OP, Cardoso BF, Ribeiro ALM, Santos FA, Shlessarenko RD. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(1):20–9.
187. Maia LM, Bezerra MC, Costa MC, Souza EM, Oliveira ME, Ribeiro AL, et al. Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus*. *Med Vet Entomol*. 2019;33(3):437–442.
188. Zeidler JD, Acosta POA, Barrêto PP, Cordeiro J da S. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2008;42(6):986–91.
189. Pinheiro VC, Tadei WP, Barros PM, Vasconcelos PF, Cruz AC. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Mem Inst*

- Oswaldo Cruz. 2005;100(8):833–9.
190. da Costa CF, dos Passos RA, Lima JBP, Roque RA, de Souza Sampaio V, Campolina TB, et al. Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):249.
 191. Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martinez-Campos C, et al. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med Vet Entomol*. 1997;11(4):305–9.
 192. Günther J, Martínez-Muñoz JP, Pérez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. Evidence of Vertical Transmission of Dengue Virus in Two Endemic Localities in the State of Oaxaca, Mexico. *Intervirology*. 2007;50(5):347–52.
 193. Martínez NE, Dzul-Manzanilla F, Gutiérrez-Castro C, Ibarra-López J, Bibiano-Marín W, López-Damián L, et al. Natural Vertical Transmission of Dengue-1 Virus in *Aedes aegypti* Populations in Acapulco, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*. 2014;30(2):143–6.
 194. Dzul-Manzanilla F, Martínez NE, Cruz-Nolasco M, Gutiérrez-Castro C, López-Damián L, Ibarra-López J, et al. Evidence of vertical transmission and co-circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;110(2):141–4.
 195. Sanchez-Rodríguez OS, Sanchez-Casas RM, Laguna-Aguilar M, Alvarado-Moreno MS, Zarate-Nahon EA, Ramirez-Jimenez R, et al. Natural Transmission of Dengue Virus by *Aedes albopictus* at Monterrey, Northeastern Mexico. *Southwest Entomol*. 2014;39(3):459–68.
 196. Sanchez-Casas RM, Gaitan-Burns A, Diaz-Gonzalez EE, Grajales JS, Dector MA, Fernandez-Salas I. Evidence of DENV-2 Vertical Transmission in Larval *Aedes aegypti* Populations at Cancun, Quintana Roo, Mexico. *Southwest Entomol*. 2016;41(2):389–98.
 197. Apodaca-Medina AI, Torres-Avendaño JI, Rendón-Maldonado JG, Torres-Montoya EH, Flores-López BA, del Angel RM, et al. First Evidence of Vertical Infection of Dengue Virus 2 in *Aedes aegypti* Mosquitoes from Sinaloa, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2018;18(4):231–3.
 198. Garcia-Rejon JE, Ulloa-Garcia A, Cigarroa-Toledo N, Pech-May A, Machain-Williams C, Cetina-Trejo RC, et al. Study of *Aedes aegypti* population with emphasis on the gonotrophic cycle length and identification of arboviruses: implications for vector management in cemeteries. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60:e44.
 199. Calderón-Arguedas O, Troyo A, Moreira-Soto RD, Marín R, Taylor L. Dengue viruses in *Aedes albopictus* Skuse from a pineapple plantation in Costa Rica. *J Vector Ecol*. 2015;40(1):184–6.

200. Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, et al. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009;40(5):951–62.
201. Jain J, Kushwah RB, Singh SS, Sharma A, Adak T, Singh OP, et al. Evidence for natural vertical transmission of chikungunya viruses in field populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana states in India — a preliminary report. *Acta Trop*. 2016;162:46–55.
202. Niyas KP, Abraham R, Unnikrishnan R, Mathew T, Nair S, Manakkadan A, et al. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virol J*. 2010;7(1):189.
203. Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda RM de, Fernandes RS, Campos SS, Silva KAB da, et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(10):655–8.
204. Smartt CT, Stenn TM, Chen T-Y, Teixeira MG, Queiroz EP, Souza Dos Santos L, et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. *J Med Entomol*. 2017;54(4):1085–7.
205. Costa CF da, Silva AV da, Nascimento VA do, Souza VC de, Monteiro DC da S, Terrazas WCM, et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. Turell MJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(7):e0006594.
206. Phumee A, Buathong R, Boonserm R, Intayot P, Aungsananta N, Jittmittraphap A, et al. Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of Zika Virus from Field-Caught Mosquitoes in Various Regions of Thailand. *Pathogens*. 2019;8(1):30.
207. Rosen L, Shroyer DA, Lien JC, Freier JE, Tesh RB. Transovarial Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(5):1108–19.
208. Brasil. Secretaria Municipal de Saúde. Plano de Contingência de Arboviroses 2018-2019. São Paulo: Secretaria Municipal de Saúde; 2019 [citado em maio de 2019]. Disponível em: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/ARBO_SIT_EPID_12_12_2018.pdf
209. Heinisch MR, Diaz-Quijano FA, Chiaravalloti-Neto F, Menezes Pancetti FG, Rocha Coelho R, Andrade PS, et al. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. *Acta Trop*. 2019;189:104–13.
210. Apostol BL, Black WC, Reiter P, Miller BR. Use of randomly amplified

- polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51(1):89–97.
211. Colton YM, Chadee DD, Severson DW. Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. *Med Vet Entomol.* 2003;17(2):195–204.
 212. Carvalho GC, Ceretti-Junior W, Barrio-Nuevo KM, Wilk-da-Silva R, Christe RO, Paula MB de, et al. Composition and diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban parks in the South region of the city of São Paulo, Brazil. *Biota Neotrop.* 2017;17(2).

APÊNDICE – Relação dos artigos incluídos no estudo de revisão sistemática sobre transmissão vertical natural do DENV, ZIKV e CHIKV.

TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO VÍRUS DENGUE					
Continente	País	Espécie	Resultado	Autor	Citação
Ásia	Myanmar	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Khin & Than.	140
Ásia	Tailândia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Negativo	Watts <i>et al.</i>	141
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Negativo	Ilkal <i>et al.</i>	147
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Joshi <i>et al.</i>	152
Ásia	Malásia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Positivo	Ahmad <i>et al.</i>	156
Ásia	Singapura	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Negativo	Chow <i>et al.</i>	159
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Thenmozhi <i>et al.</i>	153
Ásia	Singapura	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Positivo	Kow <i>et al.</i>	158
Ásia	Tailândia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Thavara <i>et al.</i>	144
Ásia	Tailândia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Negativo	Hutamai <i>et al.</i>	142
Ásia	Malásia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Positivo	Rohani <i>et al.</i>	106
Ásia	Índia	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Thenmozhi <i>et al.</i>	148
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Bina <i>et al.</i>	151
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Positivo	Angel & Josh.	149
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Arunachalam <i>et al.</i>	150
Ásia	Taiwan	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Negativo	Chen <i>et al.</i>	166
Ásia	Indonésia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Positivo	Sorisi <i>et al.</i>	161
Ásia	Tailândia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Thongrungrat <i>et al.</i>	108
Ásia	Indonésia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Mulyatno <i>et al.</i>	160
Ásia	Tailândia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Thongrungrat <i>et al.</i>	143
Ásia	Tailândia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Bawalan <i>et al.</i>	146
Ásia	Malásia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Positivo	Rohani <i>et al.</i>	157
Ásia	Indonésia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Satoto <i>et al.</i>	162
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Dutta <i>et al.</i>	154
Ásia	Filipinas	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Edillo <i>et al.</i>	165
Ásia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Angel <i>et al.</i>	155
Ásia	Indonésia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Wanti <i>et al.</i>	163
Ásia	Indonésia	<i>Ae. aegypti e Ae. albopictus</i>	Positivo	Satoto <i>et al.</i>	164
América do Sul	Trinidad e Tobago	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Hull <i>et al.</i>	167

Continua

Continuação

TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO VÍRUS DENGUE					
Continentes	País	Espécie	Resultado	Autor	Citação
América do Sul	Brasil	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Serufó <i>et al.</i>	174
América do Sul	Colômbia	<i>Ae. aegypti</i>	Negativo	Romero-Vivas <i>et al.</i>	172
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Cecílio <i>et al.</i>	175
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Negativo	Pinheiro <i>et al.</i>	189
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Negativo	Zeidler <i>et al.</i>	188
América do Sul	Brasil	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Cecílio <i>et al.</i>	176
América do Sul	Brasil	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	De Figueiredo <i>et al.</i>	180
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Guedes <i>et al.</i>	183
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Vilela <i>et al.</i>	177
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti e</i> <i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Pessanha <i>et al.</i>	178
América do Sul	Bolívia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Le Goff <i>et al.</i>	168
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti e</i> <i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Martins <i>et al.</i>	182
América do Sul	Argentina	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Espinosa <i>et al.</i>	169
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Cruz <i>et al.</i>	185
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Cecílio <i>et al.</i>	179
América do Sul	Perú	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Cabezas <i>et al.</i>	132
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Serra <i>et al.</i>	186
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Dos Santos <i>et al.</i>	184
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Da Costa <i>et al.</i>	190
América do Sul	Colômbia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Pérez-Pérez <i>et al.</i>	173
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Negativo	Moraes <i>et al.</i>	181
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti e</i> <i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Maia <i>et al.</i>	187
América do Norte	México	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Íbanez-Bernal <i>et al.</i>	191
América do Norte	México	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Günther <i>et al.</i>	192
América do Norte	México	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Martínez <i>et al.</i>	193
América do Norte	México	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Sanchez-Rodríguez <i>et al.</i>	195
América do Norte	México	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Dzul-Manzanilla <i>et al.</i>	194
América do Norte	México	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Sanchez-Casas <i>et al.</i>	196
América do Norte	México	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Apodaca-Medina <i>et al.</i>	197
América do Norte	México	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Garcia-Rejonet <i>et al.</i>	198
América Central	Costa Rica	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Calderón-Arguedas <i>et al.</i>	199

Continua

Continuação

TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO VÍRUS DENGUE

Continente	País	Espécie	Resultado	Autor	Citação
América Central	Cuba	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Gutiérrez-Bugallo <i>et al.</i>	170
América Central	Cuba	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Gutiérrez-Bugallo <i>et al.</i>	171

TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

Continente	País	Espécie	Resultado	Autor	Citação
Àsia	Tailândia	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Thavara <i>et al.</i>	200
Àsia	Índia	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Niyas <i>et al.</i>	202
Àsia	Índia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Jain <i>et al.</i>	201
América do Norte	México	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Dzul-Manzanilla <i>et al.</i>	194

TRANSMISSÃO VERTICAL NATURA DO VÍRUS ZIKA

Continente	País	Espécie	Resultado	Autor	Citação
Àsia	Tailândia	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Phumee <i>et al.</i>	206
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Ferreira-de-Brito <i>et al.</i>	203
América do Sul	Brasil	<i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Smartt <i>et al.</i>	204
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i>	Positivo	Costa <i>et al.</i>	205
América do Sul	Brasil	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	Positivo	Maia <i>et al.</i>	187

Conclusão