

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina**

**Esmenia Coelho Rocha**

**Identificação de culicídeos, fontes sanguíneas e vírus em  
sequenciamento único por nanoporos durante surto de febre  
amarela na Serra da Cantareira, São Paulo**

**São Paulo  
2023**

**Esmenia Coelho Rocha**

**Identificação de culicídeos, fontes sanguíneas e vírus em  
sequenciamento único por nanoporos durante surto de febre  
amarela na Serra da Cantareira, São Paulo**

**Versão original**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências

Programa de Medicina Tropical  
Área de concentração: Doenças Tropicais  
e Saúde Internacional

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tamara Nunes  
Lima Camara  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Licia Natal Fernandes

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Esmenia Coelho

Identificação de culicídeos, fontes sanguíneas e vírus em sequenciamento único por nanoporos durante surto de febre amarela na Serra da Cantareira, São Paulo / Esmenia Coelho Rocha. -- São Paulo, 2023.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Medicina Tropical. Área de  
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.  
Orientadora: Tamara Nunes Lima Camara.  
Coorientadora: Licia Natal Fernandes.

Descritores: 1.Culicidae 2.Fonte sanguínea  
3.Febre amarela 4.Nanoporos 5.Arbovírus  
6.Metagenômica

USP/FM/DBD-369/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: ROCHA, Esmenia Coelho

Título: Identificação de culicídeos, fontes sanguíneas e vírus em sequenciamento único por nanoporos durante surto de febre amarela na Serra da Cantareira, São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho aos meus pais, de quem me orgulho muito. Também às pessoas que perderam suas vidas durante a pandemia de COVID-19 e às famílias afetadas por isso.

## **AGRADECIMENTOS**

Às minhas orientadoras Dra. Tamara Nunes de Lima-Camara e Dra. Licia Natal Fernandes, por acreditarem em mim e me aceitarem como aluna, mesmo não me conhecendo tão bem no início. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, confiança, por estarem sempre dispostas a tirar minhas dúvidas e agradeço, principalmente, por toda a paciência que tiveram comigo. Obrigada por não alimentarem o meu pânico e me manterem com a cabeça no lugar todas as vezes que eu me perdia. Isso foi muito importante pra mim. De verdade! Agradeço a Dra. Juliana Telles de Deus, que me orientou durante o aprimoramento profissional e continuou me ajudando durante o mestrado. Obrigada por me abrir para o mundo mágico (mas real) da ciência. Obrigada por todos os conselhos profissionais e pessoais e por todas as conversas profundas que compartilhamos. Obrigada por ser como uma irmã pra mim, puxando a orelha quando necessário, mas sempre com muito carinho e amizade. Agradeço também a Dra. Ester Cerdeira Sabino, por me aceitar no grupo CADDE, por acreditar em mim e por ser essa grande fonte de inspiração para todas as mulheres do laboratório. De fato, eu me sinto muito privilegiada por ter tido como orientadoras mulheres incríveis da ciência.

Agradeço aos pesquisadores Dra. Mariza Pereira, Dr. Luis Filipe Mucci e Dr. Eduardo Bergo do Instituto Pasteur (SUCEN, por carinho) por todo conhecimento e experiência passados desde o início da elaboração do projeto Cantareira. Agradeço a Dra. Marcia Bicudo, a Dra. Regiane Maria Tironi de Menezes e ao Aristides Fernandes pela disponibilidade para me passarem um pouco de seu conhecimento em taxonomia e por me fazerem amar passar horas na mesa fria identificando culicídeos. Agradeço a Dra. Jaqueline Goes de Jesus por ensinar tudo sobre sequenciamento por nanoporos e tudo sobre práticas de laboratório molecular. Agradeço também ao Dr. Jeremy Mirza, a Dra. Ingra Morales Claro, ao Ian Nunes e a Pamela dos Santos Andrade por me auxiliarem com tudo durante a adaptação dos protocolos com os mosquitos.

Agradeço ao melhor grupo de amigas que eu poderia ter feito durante o mestrado: Amanda Miyuki Hidifira, Bianca Costa Silva, Camila Alves Maia da Silva Fonzaghi, Flávia Cristina da Silva Salles, Franciane Mendes de Oliveira, Geovana Maria Pereira, Giulia Magalhães Ferreira, Raissa Heloisa de Araujo Eliodoro, Ingra Morales Claro, Jaqueline Goes de Jesus, Mariana Pinho, Mariana Severo Raimundo,

Marissa da Silva Lima, Mayara Bertanhe, Melina Mosquera Navarro Borba, Midiã Silva Ferreira, Milena Gomes Cabral, Pamela dos Santos Andrade, Thaís de Moura Coletti, Valquíria Reis de Souza, Vanessa Moraes. Não consigo explicar o tanto que vocês me fizeram bem. Obrigada por serem meu refúgio, minhas companheiras de risada e de reflexões filosóficas. Incluo aqui os queridos Ian Nunes e Moisés Santos, aos quais agradeço por todos os momentos divertidos, e sei que eles entenderão meu desejo de mencionar primeiro as mulheres, rs.

Agradeço ao grupo mais lindo e divertido de pupilos da DPE-SUCEN, amigos que amo e que levarei pra vida toda: Iris Braz Ribeiro de Oliveira, Tatiane Eni, Hélio Benites Gil, Thays Rossignoli e Fabiana Fernandes Souza. Obrigada por todos os momentos.

Agradeço ao Dr. Paulo Roberto Urbinatti e Rosa Maria Marques Sá de Almeida por todos os ensinamentos e ajuda durante os experimentos no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública, assim como às colegas do laboratório Marta Ribeiro e Marcela Mori.

Agradeço a todos os membros do grupo CADDE, com quem aprendi muitas coisas durante os cursos e workshops, ao Dr. Nuno Rodrigues Faria. A todos que conheci no laboratório de parasitologia LIM/46, por toda a ajuda: Ana Carolina Mamana, Erika Regina Manuli, Fabio Ghilardi, Felipe Silva, Gabriel Castanheira, Joyce Vanessa, Juliana Borges, Léa Campos de Oliveira da Silva, Leandro Menezes de Souza, Luca Rocha, Lucas Franco, Monike Olliveira, Natalia Souza de Godoy, Regilane França, Regina Maia, Roberta Cristina Ruedas. Também ao Gabriel Matheus do Nascimento, a Izilda Curado e Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, do laboratório de protozoologia LIM/49.

Sou grata também a todos que conheci na SUCEN: Agnaldo Duarte, Dr. Adriano Pinter, Bruno Mathias, Carol Anjos, Dr. Carlos José Coutinho, Eliana Ferreira Monteiro, Dra. Fernanda Ohlweiler, Gabriella Ricomini, Iole Arumi Sei, Dra. Karin Kirchgatter, Lilian Guimarães, Marcelo Pimont, Dra. Margareth Dibo, Maria Socorro Silva, Thiago Fernandes Martins, Valéria Cristina de Araujo, Vanessa Christe Helfstein, Vanessa Moraes, Vinicio Rodrigues.

Agradecimento mais que especial a todos da equipe de febre amarela da DPE-SUCEN com quem aprendi muito sobre coleta. Como bióloga, as saídas de campo estavam entre as minhas atividades favoritas. Obrigada aos queridos Vanessa Christe Helfstein, Renato Servigne, Renato da Silva Vilas Boas, Marlon

Pires, Ailton Rodrigues dos Santos, Dirceu Moraes Pereira e Washington Luis Teles Serrão.

Agradeço aos meus pais Maria Angélica Coelho Rocha e Hildo da Silva Rocha por tudo que tiveram que enfrentar para que hoje eu pudesse estar concluindo essa etapa dos meus estudos, os grandes responsáveis por tudo. Aos meus irmãos e cunhados e ao meu sobrinho Benício Rocha, a pessoa mais linda da minha vida, que me dá vontade de continuar. Ao Kaique Gomes, meu melhor amigo e parceiro de vida, agradeço por me confortar e, principalmente, por todos os sorvetes nos meus piores dias (e nos dias bons também). A todos os familiares e amigos. Amo vocês!

Por fim, agradeço pelo apoio e financiamento de todas as instituições envolvidas nesse trabalho: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) - Processo: 18/14389-0, Instituto Pasteur de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina e Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.



“Eu amo prazos. Adoro prazos. Adoro o barulho de vento que eles fazem quando os dias vão passando” (Douglas Adams).

## RESUMO

Rocha EC. Identificação de culicídeos, fontes sanguíneas e vírus em sequenciamento único por nanoporos durante surto de febre amarela na Serra da Cantareira, São Paulo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O vírus da febre amarela é transmitido por fêmeas de mosquitos infectadas durante o repasto sanguíneo. Na epidemia de febre amarela de 2017/2018, regiões metropolitanas do país próximas a áreas de Mata Atlântica foram atingidas, despertando a preocupação de estabelecimento de ciclo enzoótico. No estado de São Paulo, especialmente no Parque Estadual Alberto Löfgren a população de *Alouatta guariba clamitans* (bugio-ruivo) foi praticamente extinta, mas outras espécies de primatas não-humanos (PNH) de menor densidade resistiram. Neste trabalho, identificamos as fontes sanguíneas de mosquitos do parque e de outras localidades da Serra da Cantareira. As coletas foram realizadas no período diurno, a partir do pico da epidemia, em dezembro de 2017, até março de 2020, totalizando 130 dias de coleta. Do total de 5001 fêmeas coletadas, 163 possuíam vestígio de sangue no abdômen, que foram individualizadas para detecção da fonte alimentar, com cabeça e tórax separados. Foi utilizada a técnica de sequenciamento por nanoporos com *primers* mitocondriais, para a identificação dos hospedeiros vertebrados, e *primers* randômicos, a fim de detectar o vírus amarílico possivelmente presente nas amostras. Foi identificada a fonte alimentar de 107 (65,6%) fêmeas distribuídas em 19 diferentes espécies. Dessas, 54,6% continham sangue de mamíferos, 6,7% continham sangue de aves e 4,3% apresentaram repastos sanguíneos mistos. As espécies de vertebrados detectadas foram: humano, *Callicebus nigrifrons* (PNH), cão, gambá-de-orelha-preta, rato-do-mato, urubu-preto, garça e nove diferentes espécies de aves passeriformes. Os repastos mistos foram humano e cão, e humano e ave. Não foi encontrado sangue de bugio nas amostras. *Haemagogus leucocelaenus*, reconhecidamente vetor do vírus amarílico, teve uma amostragem de 37 fêmeas com repasto sanguíneo, sendo 35 com sangue humano e 2 com sangue de PNH. Dois espécimes de *Haemagogus janthinomys/capricornii*, outro vetor conhecido, se alimentaram apenas de sangue humano. Foi detectado vírus amarílico em uma fêmea de *Hg. leucocelaenus* ingurgitada com sangue humano, sendo a infecção do mosquito confirmada por RT-qPCR, que apresentou resultados positivos em cabeça e tórax, separadamente. Nossos dados alertam para a antropofilia das espécies que atuam no ciclo de transmissão do vírus da febre amarela, principalmente na ausência de bugios. Além disso, os resultados confirmam a circulação do vírus na região estudada e o papel de *Hg. leucocelaenus* na região.

Palavras-chave: Culicidae. Fonte sanguínea. Febre amarela. Nanoporos. Arbovírus. Metagenômica.

## ABSTRACT

Rocha EC. Identification of Culicidae, blood sources and viruses in single Nanopore sequencing during yellow fever outbreak in Serra da Cantareira, São Paulo [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

The yellow fever virus is transmitted by infected female mosquitoes during blood meals. In the 2017/2018 yellow fever epidemic, metropolitan regions of the country close to the Atlantic Forest areas were affected, raising concerns about the establishment of an enzootic cycle. In the state of São Paulo, especially in the Alberto Löfgren State Park, the population of *Alouatta guariba clamitans* (red howler monkey) was practically extinct, but other species of non-human primates (NHP) of lesser density resisted. In this work, we identified the blood sources of mosquitoes in the park and other locations in Serra da Cantareira. Collections were carried out during the day, from the peak of the epidemic, in December 2017, until March 2020, totaling 130 days of collection. Of the total of 5001 females collected, 163 had traces of blood in the abdomen, which were individualized for detection of the blood source, with head and thorax separated. The technique of Nanopore sequencing with mitochondrial primers was used, for the identification of vertebrate hosts, and random primers, in order to detect the yellow fever virus possibly present in the samples. The blood source of 107 (65.6%) females distributed in 19 different species was identified. Of these, 54.6% contained mammalian blood, 6.7% contained bird blood, and 4.3% contained mixed blood meals. The vertebrate species detected were: human, *Callicebus nigrifrons* (NHP), dog, big-eared opossum, montane grass mouse, black vulture, great egret and nine different species of passerines. The mixed meals were human and dog, and human and bird. No red howler monkey blood was found in the samples. *Haemagogus leucocelaenus*, a known vector of the yellow fever virus, had a sampling of 37 females with blood source, 35 with human blood and 2 with NHP blood. Two specimens of *Haemagogus janthinomys/capricornii*, another known vector, fed only on human blood. Yellow fever virus was detected in a female *Hg. leucocelaenus* engorged with human blood, and the mosquito infection was confirmed by RT-qPCR, which showed positive results in the head and thorax, separately. Our data point to the anthropophily of the species that act in the yellow fever virus transmission cycle, especially in the absence of red howler monkeys. In addition, the results confirm the circulation of the virus in the studied region and the role of *Hg. leucocelaenus* in the region.

Keywords: Culicidae. Blood source. Yellow fever. Nanopore. Arboviruses. Metagenomics.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Localização da Serra da Cantareira, na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP).

**Figura 2** - Locais de coleta entomológica em São Paulo e em Mairiporã e ligação dos dois parques estaduais.

**Figura 3** - Pontos de coletas entomológicas no PEAL, no PEC e em Terra Preta (A, B, e C, respectivamente).

**Figura 4** - Técnicas de coleta entomológica: aspiração humana móvel com puçá (à esquerda) e aspiração Nasci (à direita).

**Figura 5** - Quantidade de coletas entomológicas por mês no PEAL, no PEC e no distrito de Terra Preta, de dezembro/2017 a março/2020.

**Figura 6** - Mesa fria e lupa utilizadas para identificação taxonômica de culicídeos.

**Figura 7** - Fêmea de *Haemagogus janthinomys/capricornii* capturada com vestígio de alimentação sanguínea.

**Figura 8** - Ovos de *Aedes aegypti* para eclosão em recipiente com água e ração de peixe Tetramin®.

**Figura 9** - Equipamentos utilizados na alimentação sanguínea artificial de mosquitos.

**Figura 10** - Fêmeas de *Aedes aegypti* alimentando-se de sangue em gaiola entomológica, a partir de alimentador artificial de insetos hematófagos, com membrana de tecido TNT.

**Figura 11** - Separação das fêmeas completamente ingurgitadas após alimentação artificial com sangue.

**Figura 12** - Diferentes estágios de digestão em fêmeas de *Aedes aegypti*, baseados na escala Sella, com indicação do tempo aproximado de digestão.

**Figura 13** - Estágios de digestão sanguínea de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue humano ou bovino.

**Figura 14** - Foto de gel de agarose 2% do produto da PCR que amplifica fragmento de gene humano, com 228 pb.

**Figura 15** - Foto de gel de agarose 2% do produto da PCR que amplifica fragmento de gene bovino, com 271pb.

**Figura 16** - Sequências similares ao Zika vírus identificadas pelo BLAST.

**Figura 17** - Cobertura do sequenciamento da amostra de *Ae. aegypti* infectada com Zika vírus contra o genoma de referência visualizado no Tablet.

**Figura 18** - Número de *reads* de COI e Cyt *b* por espécie de mosquito e proporção por fonte sanguínea.

**Figura 19** - Curva de amplificação de flavivírus em amostra de fêmea de *Hg. leucocelaenus* ingurgitada, confirmando a presença do vírus da febre amarela.

**Figura 20** - Identificação pelo MiniKraken (à esquerda) e pelo BLAST (à direita) do vírus da febre amarela a partir da amostra do abdômen da fêmea de *Hg. leucocelaenus* ingurgitada.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Quantidade de mosquitos coletados na Serra da Cantareira de acordo com a espécie, de dezembro de 2017 a março de 2020.

**Tabela 2** - Espécies de fêmeas ingurgitadas coletadas no PEAL, PEC e distrito de Terra Preta, no período de dezembro de 2017 a março de 2020.

**Tabela 3** - Número de fêmeas ingurgitadas coletadas nos diferentes estratos, de acordo com a espécie.

**Tabela 4** - Amostras de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue humano e bovino, em diferentes níveis de digestão sanguínea, testadas com o sequenciamento por nanoporos.

**Tabela 5** - Número de culicídeos vetores e potenciais vetores coletados no PEAL durante e após surto de febre amarela, com suas respectivas fontes sanguíneas.

**Tabela 6** - Quantidade de mosquitos fêmeas e suas respectivas fontes sanguíneas de acordo com a espécie, coletadas na Serra da Cantareira entre dezembro de 2017 e março de 2020.

**Tabela 7** - Quantidade de repastos sanguíneos de acordo com espécie e estrato.

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** - Quantidade e período das coletas entomológicas realizadas nos Parques Estaduais Alberto Loefgren e da Cantareira e no Bairro Terra Preta.

**Quadro 2** - Iniciadores utilizados para a PCR com alvos específicos para humano e bovino.

**Quadro 3** - Parâmetros utilizados em PCR convencional com *primers* de humano e bovino.

**Quadro 4** - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do DNA de vertebrados e de mosquitos.

**Quadro 5** - Parâmetros utilizados no termociclador para programação da PCR de espécies de vertebrados e espécies de mosquito.

**Quadro 6** - Sequências dos *primers* utilizados para amplificação por metagenômica.

**Quadro 7** - Parâmetros utilizados para amplificação por metagenômica.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BOLD - Barcode of Life Database

CADDE - Centre for Arbovirus Discovery, Diagnosis, Genomics and Epidemiology

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

COVID-19 - Coronavirus Disease 2019 (Doença do coronavírus 2019)

Ct - Cycle threshold

Cyt b - Citocromo B

dNTP - Deoxyribonucleoside Triphosphate (Desoxirribonucleosídeo Trifosfato)

DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DNase - Desoxirribonuclease

EPI - Equipamento de Proteção Individual

FA - Febre Amarela

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FSP - Faculdade de Saúde Pública

LATHEMA - Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários

mM - milimolar

MPBio - MP Biomedicals

NAS - Nanopore Adaptive Sampling

NEB - New England Biolabs

ng - nanogramas

ONT - Oxford Nanopore Technologies

PEC - Parque Estadual da Cantareira

PEAL - Parque Estadual Alberto Löfgren

PNH - Primata Não Humano

qPCR - Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RMSP - Região Metropolitana de São Paulo

RNA - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)



RNase - Ribonuclease

RT-qPCR - Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa Com Transcriptase Reversa)

SARS-CoV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2)

SMART - Switch Mechanism at the 5' End of RNA Templates

SSP - Strand Switching Primer

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

uM - micromolar

ul - microlitros

USP - Universidade de São Paulo

YFV - Yellow Fever Virus (Vírus da Febre Amarela)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 A febre amarela.....	19
1.2 Aspectos epidemiológicos da febre amarela no Brasil.....	20
1.3 Hábito alimentar de culicídeos.....	21
1.4 Tecnologia de sequenciamento por nanoporos.....	22
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 Área de estudo.....	25
4.1.1 Locais de coleta entomológica.....	26
4.1.1.1 Parque Estadual da Cantareira.....	26
4.1.1.2 Parque Estadual Alberto Loefgren.....	26
4.1.1.3 Distrito de Terra Preta (Mairiporã).....	27
4.1.2 Coletas entomológicas.....	27
4.1.3 Identificação taxonômica dos mosquitos.....	31
4.2 Alimentação sanguínea artificial de mosquitos com diferentes estágios de digestão.....	32
4.3 Adaptação do sequenciamento por nanoporos para identificação de hospedeiro vertebrado, da espécie de mosquito e patógenos em um mesmo ensaio.....	36
4.3.1 Obtenção de controles positivos.....	36
4.3.2 Extração de ácido nucléico total.....	36
4.3.3 Amplificação com primers específicos.....	37
4.3.4 Amplificação de genes mitocondriais para sequenciamento.....	38
4.3.5 Amplificação de RNA viral.....	39
4.3.6 Sequenciamento genético por tecnologia de nanoporos.....	41
4.3.7 Criação de banco de dados e análises de bioinformática.....	42
4.4 Identificação de fontes sanguíneas e vírus em mosquitos nas áreas de estudo	43
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1 Identificação taxonômica dos mosquitos.....	44
5.2 Eficácia do protocolo de sequenciamento por nanoporos quanto aos diferentes estágios de digestão sanguínea.....	47
5.3 Adaptação do protocolo de sequenciamento por nanoporos.....	50
5.4 Identificação das fontes sanguíneas durante e após surto no PEAL.....	51
5.5 Identificação das fontes sanguíneas nas áreas de estudo na Serra da Cantareira.....	52
5.6 Detecção de vírus amarílico nas áreas de estudo.....	55

<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A febre amarela

A febre amarela (FA) é uma arbovirose zoonótica endêmica em florestas tropicais da América e da África. A doença é causada por vírus da família *Flaviviridae* que, por sua vez, é transmitido por mosquitos da família *Culicidae* (1). O vírus da febre amarela (YFV) é transmitido através da picada de fêmeas de culicídeos infectados ao se alimentarem de sangue de hospedeiros vertebrados. A doença possui ciclo de transmissão urbano e ciclo de transmissão silvestre, além de um ciclo intermediário.

No ciclo urbano, o vírus é transmitido de humano para humano pela espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti*, não havendo casos desse ciclo no Brasil desde 1942 (2). Entretanto, o ciclo urbano da doença ainda ocorre em países da África (3). Já no ciclo silvestre, os hospedeiros são principalmente os primatas não-humanos e os vetores são espécies de culicídeos que habitam as florestas, sendo o homem um hospedeiro acidental (2). No Brasil, a transmissão do YFV no ciclo silvestre tem sido associada principalmente à espécie *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* (4, 5). No entanto, *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* foi incriminado como vetor nos surtos das regiões Sul e Sudeste (6, 7, 8, 9). No terceiro ciclo, denominado intermediário, estão envolvidos os humanos e os primatas não humanos, sendo os vetores mosquitos do gênero *Aedes*. Esse ciclo de transmissão acontece apenas nas savanas africanas, em ambientes de transição de mata e cidade (3).

Além das espécies vetoras citadas, outras já foram encontradas naturalmente infectadas com o vírus, como *Haemagogus (Hag.) capricornii*, *Haemagogus (Hag.) albomaculatus*, *Sabethes (Peytonulus) soperi*, *Sabethes (Sabethes) cyaneus*, *Sabethes (Sabethinus) chloropterus* (10), *Sabethes (Sab.) albiprivus* (11), *Sabethes (Sabethoides) glaucodaemon*, *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (4), *Aedes (Och.) fulvus*, *Aedes (Och.) serratus* (7), *Psorophora (Janthinosoma) albipes* e *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (12). Em infecção experimental, foi relatada a competência vetorial em algumas espécies como *Aedes (Stg.) albopictus* (13), *Aedes (Georgecraigius) fluviatilis* (14), *Aedes (Protomacleaya) terrens* e *Aedes (Och.) serratus* (15).

Os gêneros *Aedes* e *Haemagogus* pertencem à tribo Aedini e o gênero *Sabethes* à tribo Sabethini, porém todos apresentam atividade diurna e crepuscular. Na tribo Aedini, os criadouros apresentam caráter transitório, como ocos de árvore, recipientes naturais e artificiais, sendo dependentes das chuvas. Já os mosquitos da tribo Sabethini são essencialmente silvestres, sendo seus criadouros preferencialmente naturais, como ocos de árvores, bromélias, internódios de bambu e folhas caídas (1, 2).

Quanto aos hospedeiros amplificadores do vírus, além de primatas não humanos, outras espécies de mamíferos já foram encontradas com anticorpos para esse antígeno. Dentre elas, podemos citar a preguiça-real, preguiça-de-três-dedos, tamanduá-mirim, cotia, ouriço, irara e cateto (16).

## **1.2 Aspectos epidemiológicos da febre amarela no Brasil**

Nos anos 40, no Brasil, houve a erradicação do ciclo urbano da febre amarela e todos os casos, desde então, foram considerados acidentais, quando humanos adentraram áreas de matas com circulação do YFV (3, 17). A febre amarela silvestre se manteve endêmica na região da Amazônia Legal, nos estados do Norte, Centro-Oeste, além de parte do Maranhão. Já as regiões mais próximas do litoral e mais densamente habitadas no Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil eram tidas como áreas indenes (17).

Apenas a partir de 2000 iniciou-se uma expansão da transmissão silvestre no sentido Leste e Sul do país (17). No estado de São Paulo, em 2008, casos humanos foram confirmados nas regiões de São José do Rio Preto, Ribeirão Preto e Araraquara, chegando a atingir, em 2009, regiões de Botucatu e Sorocaba, áreas até então sem recomendação de vacina da febre amarela (18). Em 2016 iniciou-se uma epidemia que estendeu-se pelas zonas rural e periurbana de municípios das regiões metropolitanas de Campinas e São Paulo, áreas sem recomendação de vacina e contingente populacional correspondente a 2/3 do total do estado (19). Outros estados da região Sudeste, considerados até então não endêmicos, como Rio de Janeiro e Espírito Santo, também foram atingidos com elevado número de casos humanos (20). A ocorrência de FA foi detectada no Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal de São Paulo) em outubro de 2017. Primatas não humanos da espécie *Alouatta guariba clamitans* (bugio-ruivo) tiveram elevada mortalidade nos 60

dias subsequentes. Isso causou a eliminação dos cerca de 90 bugios do parque, que eram distribuídos em 17 famílias conhecidas da região. Alguns indivíduos de outros gêneros também foram afetados, totalizando cerca de 200 epizootias por FA, laboratorialmente confirmadas (21). Em 2018, o vírus avançou pelo bioma da Mata Atlântica, em municípios da Região Metropolitana de São Paulo, Baixada Santista, Vale do Ribeira, Vale do Paraíba e Litoral Norte, causando 503 casos humanos autóctones e 261 epizootias confirmadas (21). Em todo o estado de São Paulo foram 595 epizootias de febre amarela em primatas não humanos (19). Vale ressaltar que, entre 2017 e 2018, os municípios de São Paulo e Mairiporã contabilizaram a maior parte das epizootias confirmadas (19, 21). Grande parte das notificações destes dois municípios foram registradas na região da Serra da Cantareira, que é um importante fragmento florestal de Mata Atlântica, situada na zona Norte da região metropolitana de São Paulo, que abrange parte dos municípios de São Paulo e Mairiporã, além de Caieiras e Guarulhos. Nesta área, foi detectada não apenas a intensa e ampla circulação de YFV em primatas não humanos, como também em humanos. Até junho de 2018, a Serra da Cantareira correspondeu, aproximadamente, a 36% das epizootias confirmadas e 39% dos casos humanos notificados no Estado (21).

### **1.3 Hábito alimentar de culicídeos**

Como citado anteriormente, a transmissão do vírus amarelíco ocorre quando a fêmea do mosquito infectada realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro suscetível. Sendo assim, o padrão de comportamento alimentar desses mosquitos é essencial para que representem bons vetores do YFV para humanos ou para que mantenham o ciclo silvestre da doença. Com efeito, a caracterização das fontes alimentares de fêmeas ingurgitadas pode ajudar a trazer respostas em relação ao seu comportamento antropofílico ou zoofílico. Bem como, a identificação das fontes alimentares dos mosquitos presentes em áreas urbanas e em áreas verdes limítrofes a elas, onde ocorre circulação de arbovírus, pode apontar a participação de diferentes espécies potencialmente envolvidas na transmissão de vírus (22).

Para realizar a identificação do hábito alimentar de insetos, o método molecular por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar as fontes alimentares de insetos hematófagos com alta sensibilidade e especificidade (23). Trata-se de uma técnica que já foi empregada com sucesso em diferentes

estudos de determinação de fonte alimentar de fêmeas de culicídeos ingurgitadas, sendo o *citocromo b* um gene frequentemente escolhido como alvo, uma vez que sequências deste gene de muitas espécies estão disponíveis no *GenBank* (24, 25, 26, 27). Sendo uma região conservada no DNA mitocondrial e sendo encontrada em todos os eucariotos, é comumente usada para identificação de espécies.

#### 1.4 Tecnologia de sequenciamento por nanoporos

O MinION é um sequenciador de terceira geração da Oxford Nanopore Technologies (ONT) capaz de detectar bases nitrogenadas quando uma fita de DNA atravessa um nanoporo em uma célula de fluxo acoplada. É um dispositivo portátil de apenas 90g e 10cm de comprimento. O sequenciamento genético por nanoporos é uma tecnologia capaz de fazer a leitura do DNA e RNA em tempo real. Suas características como dispositivo portátil e de simples preparo de biblioteca, o levaram a ser um ótimo candidato para pesquisadores de campo (28).

O sequenciamento por nanoporos funciona com o acoplamento de uma célula de fluxo, que inclui um chip sensor e uma matriz de nanoporos, que consistem em canais eletrônicos endereçados individualmente. As fitas de DNA da biblioteca carregada no sequenciador se aproximam da matriz e se encaixam na abertura dos nanoporos e, à medida que cada base atravessa o poro, é gerada uma interrupção na corrente elétrica que pode ser usada para determinar todas as bases das fitas (29).

O MinION foi responsável pelo sequenciamento genético do primeiro caso de COVID-19 no Brasil (30). Também tem sido usado em conjunto com a metagenômica. A abordagem por metagenômica consiste no processo de sequenciamento do conteúdo total de ácido nucleico em uma amostra (tipicamente cDNA ou DNA), e tem sido aplicada com sucesso tanto na descoberta, como no diagnóstico de patologias virais (31, 32).

## 2 JUSTIFICATIVA

Esse trabalho está inserido em um projeto maior desenvolvido pela antiga Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), atual Instituto Pasteur de São Paulo. O projeto surgiu a partir do agravamento da situação epidemiológica da FA na Região Metropolitana de São Paulo, com ênfase para a região da Serra da Cantareira, com a quase eliminação dos grupos de bugios no PEAL (surto 2017/2018).

O cenário epidemiológico da Serra da Cantareira mostra que, após muitas décadas, o YFV está reintroduzido e amplamente disperso em contínuos de Mata Atlântica, onde há possibilidade de estabelecimento de um ciclo enzoótico com subsequente endemização da doença. Isto torna necessário estudos que considerem aspectos particulares deste bioma (33).

A análise das fontes alimentares dos mosquitos da Serra da Cantareira (Mata Atlântica) pode ajudar a entender o comportamento alimentar desses mosquitos, especialmente no PEAL, após intensa mortalidade de bugios, principal hospedeiro no ciclo silvestre da febre amarela. Para isso, propomos uma adaptação do sequenciamento por nanoporos (MinION) capaz de detectar simultaneamente a fonte sanguínea de culicídeos, presença de arbovírus e confirmação da espécie vetora em um mesmo ensaio.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

➤ Identificar os mosquitos (Diptera: Culicidae), as fontes sanguíneas de fêmeas ingurgitadas e vírus da febre amarela em áreas de epizootias e casos humanos na Serra da Cantareira, com a adaptação de sequenciamento por nanoporos.

#### 3.2 Objetivos específicos

➤ Identificar as espécies de culicídeos e selecionar as fêmeas com vestígios de sangue na área de estudo;

➤ Testar a eficácia do sequenciamento por nanoporos aos diferentes estágios de digestão sanguínea de mosquitos alimentados artificialmente;

➤ Adaptar um protocolo para detecção da espécie de mosquito, da espécie de vertebrado e de arbovírus em uma única biblioteca de sequenciamento por nanoporos;

➤ Identificar as fontes sanguíneas dos mosquitos durante o surto de febre amarela e após redução de populações de *Alouatta guariba clamitans* (bugio-ruivo);

➤ Determinar as fontes sanguíneas de fêmeas ingurgitadas em diferentes áreas de circulação do vírus amarílico na Serra da Cantareira;

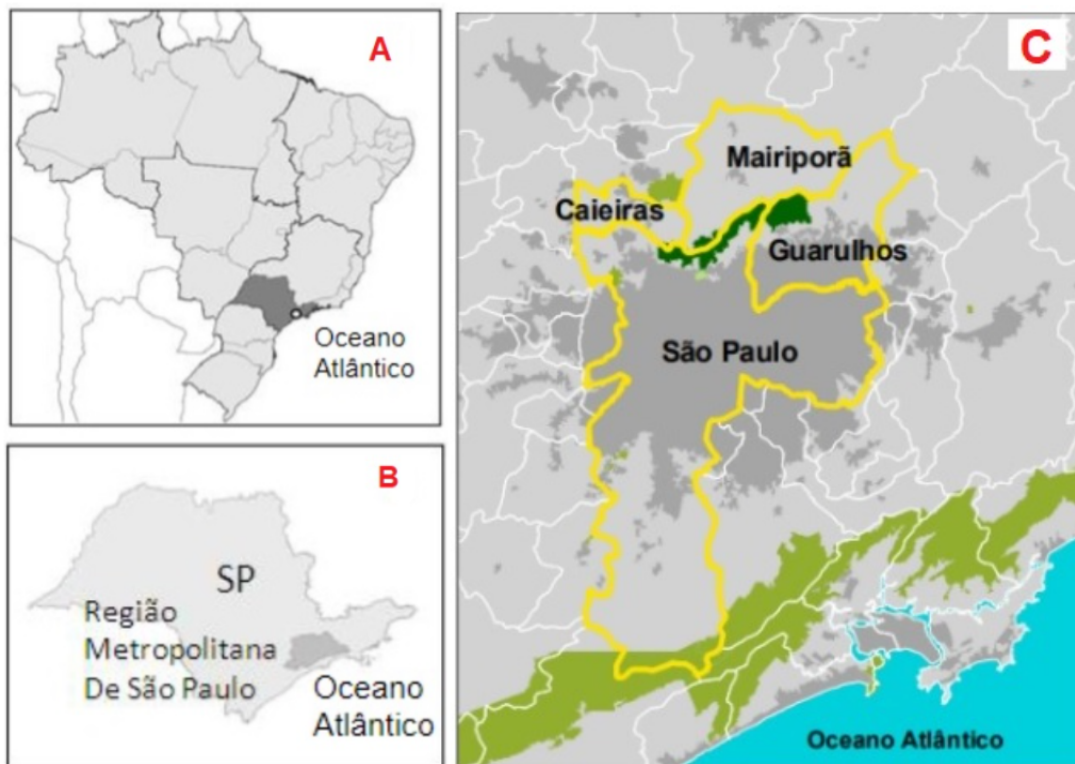
➤ Detectar presença de vírus amarílico nas fêmeas ingurgitadas da área de estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

A Serra da Cantareira é uma das áreas remanescentes da Mata Atlântica na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) e ocupa uma área de cerca de 320 km<sup>2</sup>, estendendo-se por 30 km na direção nordeste-sudoeste (Figura 1). A cobertura vegetal é heterogênea e característica de Mata Atlântica, com elementos da Mata Semi-Caducifólia do Planalto, caracterizando-se, assim, como uma área de transição entre ambas as Matas. Nessa área, se encontra o Parque Estadual Alberto Löfgren (PEAL), e o Parque Estadual da Cantareira (PEC). Ambos os parques são Unidades de Conservação Ambiental inseridas na Reserva da Biosfera do Cinturão Verde de São Paulo (34).

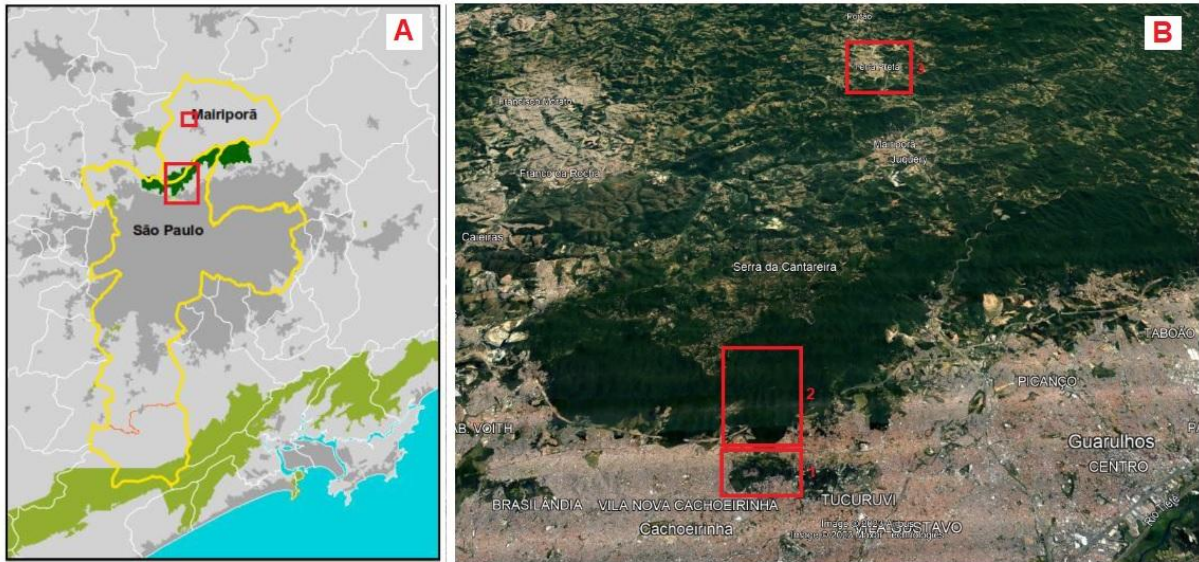
**Figura 1** - Localização da Serra da Cantareira, na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP).



Legenda: A = Localização do estado de São Paulo no território brasileiro; B = Localização da RMSP no estado de São Paulo; C = Localização da Serra da Cantareira (faixa verde escuro) na RMSP, abrangendo os quatro municípios (Mairiporã, Caieiras, Guarulhos e São Paulo). Fonte: Adaptado do Plano de Manejo do PEC (34).

Para esse estudo, foram definidos três principais locais de coleta entomológica: o PEAL, o PEC e o distrito de Terra Preta, em Mairiporã (Figura 2).

**Figura 2** - Locais de coleta entomológica em São Paulo e em Mairiporã e ligação dos dois parques estaduais.



Legenda: Em A = Locais de coleta em São Paulo e em Mairiporã demarcados nos retângulos vermelhos; B = Imagem de satélite com os três locais de coleta: 1 = PEAL, 2 = PEC e 3 = Terra Preta.  
Fonte: A = Adaptado do Plano de Manejo do PEC (34) e B = Google Earth, 2023.

#### 4.1.1 Locais de coleta entomológica

##### 4.1.1.1 *Parque Estadual da Cantareira*

O PEC tem uma área de 7.916,52 hectares, abrangendo parte de quatro municípios da RMSP: São Paulo, Mairiporã, Caieiras e Guarulhos. A média anual de visitantes do parque é de 60 mil. O número estimado da fauna de vertebrados é de 388 espécies, sendo 97 espécies de mamíferos, 233 de aves, 28 de anfíbios, 20 répteis e 10 espécies diferentes de peixes (34).

##### 4.1.1.2 *Parque Estadual Alberto Loeffgren*

O PEAL apresenta área de 187 hectares e abrange parte de quatro distritos do município de São Paulo: Cachoeirinha, TUCURUVI, Mandaqui e Tremembé. O

parque possui diversas áreas de acesso ao público e residências em seu perímetro, chegando a ter 720 mil visitantes ao ano (35). De acordo com o último Plano de Manejo do PEAL, em 2012, há uma carência de dados mais precisos sobre os mamíferos e anfíbios do parque e uma ausência de informações acerca dos répteis e peixes, o que faz com que a fauna do PEAL seja subestimada. A Avaliação Ecológica Rápida registrou 20 espécies de mamíferos, 38 de aves e 11 de anfíbios. Entretanto, dados secundários já registraram 182 espécies diferentes apenas de aves, além de seis espécies de répteis e uma espécie de peixe (35).

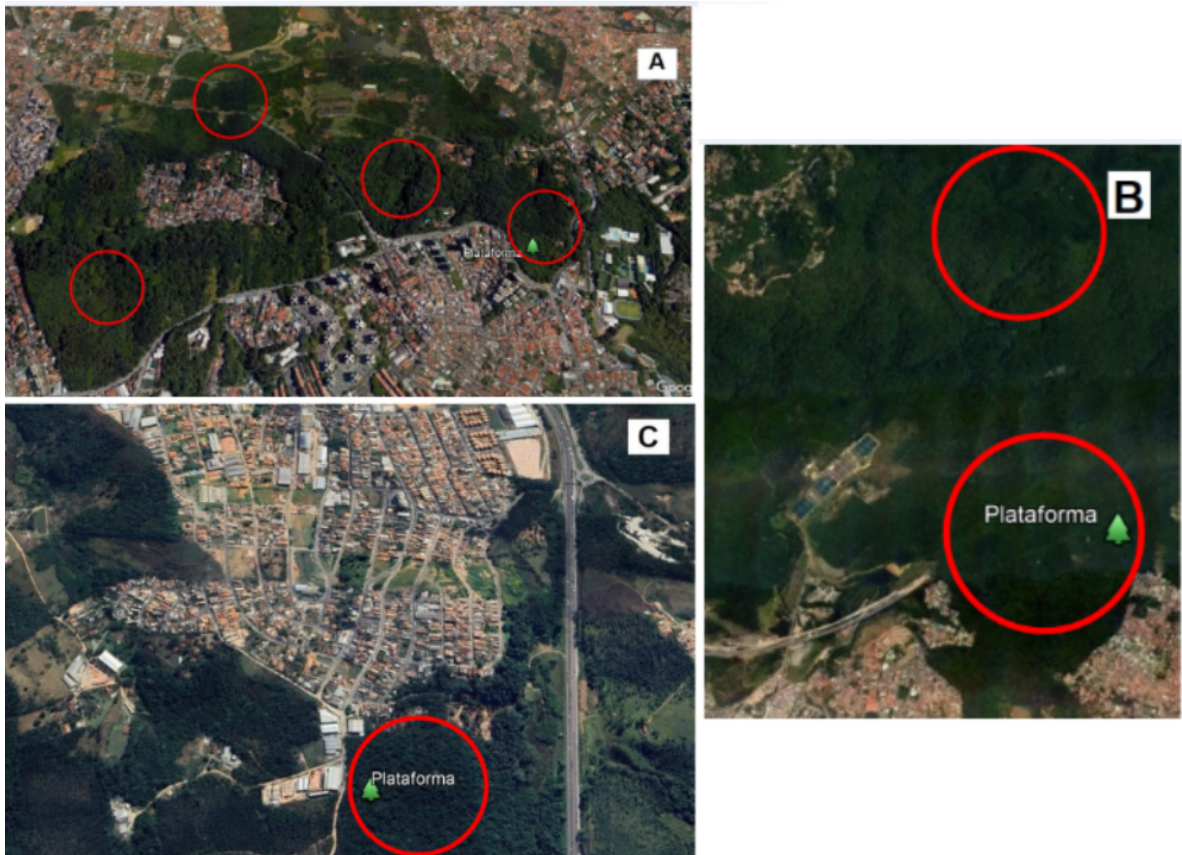
#### **4.1.1.3** *Distrito de Terra Preta (Mairiporã)*

O distrito de Terra Preta situa-se na cidade de Mairiporã, na Região Metropolitana de São Paulo, ao norte da capital paulista. A população do município é de 103.645 habitantes, em uma área de cerca de 321 km<sup>2</sup>. De acordo com o Inventário Florestal do Estado de São Paulo (36), 59,9% do território da cidade de Mairiporã ainda possui cobertura vegetal nativa, sendo os maiores fragmentos encontrados nos Parques Estaduais da Cantareira e do Itapetinga. Como parte da RMSP e da Serra da Cantareira, a cidade é muito procurada para lazer e turismo dos paulistanos (37).

#### **4.1.2 Coletas entomológicas**

Todos os locais de coleta entomológica foram escolhidos a partir de epizootias de primatas não humanos e também de casos humanos confirmados de febre amarela. Ambos os parques estaduais possuem área florestal protegida, enquanto que o distrito de Terra Preta possui matas sujeitas à ação antrópica contínua (Figura 3). Todos os pontos passaram por avaliação e delimitação prévias, priorizando as coletas em locais com muita vegetação, a fim de otimizar a amostragem de culicídeos silvestres.

**Figura 3** - Pontos de coletas entomológicas no PEAL, no PEC e em Terra Preta (A, B, e C, respectivamente).



Legenda: círculos vermelhos = áreas percorridas pelos coletores; árvores verdes = pontos de coleta com plataformas nas copas. Fonte: Google Earth, 2020.

As coletas entomológicas foram realizadas entre dezembro de 2017 e março de 2020. O horário foi entre nove horas da manhã e quinze horas, com o objetivo de coletar culicídeos de hábitos diurnos. As coletas tiveram financiamento e apoio da equipe técnica da antiga Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), atual Instituto Pasteur de São Paulo. Foram empregadas três técnicas de coleta entomológica: armadilha humana móvel com uso do puçá entomológico (38), armadilha luminosa CDC (39) e aspirador Nasci (40) (Figura 4). Para utilização do puçá, o humano coletor serviu como atrativo. Já para a CDC, foi utilizado como isca o gelo seco, que imita a liberação de CO<sub>2</sub> pelos animais. A armadilha foi instalada em copas de árvores, a cerca de 8 metros do solo, para coleta de mosquitos acrodendrófilos. O aspirador de Nasci foi utilizado para aumentar a amostragem de fêmeas ingurgitadas, já que estas ficam, geralmente, em repouso na vegetação. As

aspirações eram realizadas por cerca de 30 minutos no período da manhã e no período da tarde.

**Figura 4** - Técnicas de coleta entomológica: aspiração humana móvel com puçá (à esquerda) e aspiração Nasci (à direita).



Fotos: Juliana Telles de Deus, 2018

A partir de dezembro de 2018, iniciaram-se também coletas de mosquitos em plataformas nas copas das árvores. Foram construídas três plataformas de madeira em árvores, uma em cada local de coleta, em altura aproximada de oito a dez metros. Cada plataforma comportava um humano coletor, que utilizava o puçá para a captura dos mosquitos de copa. Para a realização dessa etapa, a equipe técnica da SUCEN recebeu treinamento específico para trabalho em altura e em técnicas de escalada, munida dos respectivos equipamentos de proteção individual (EPIs).

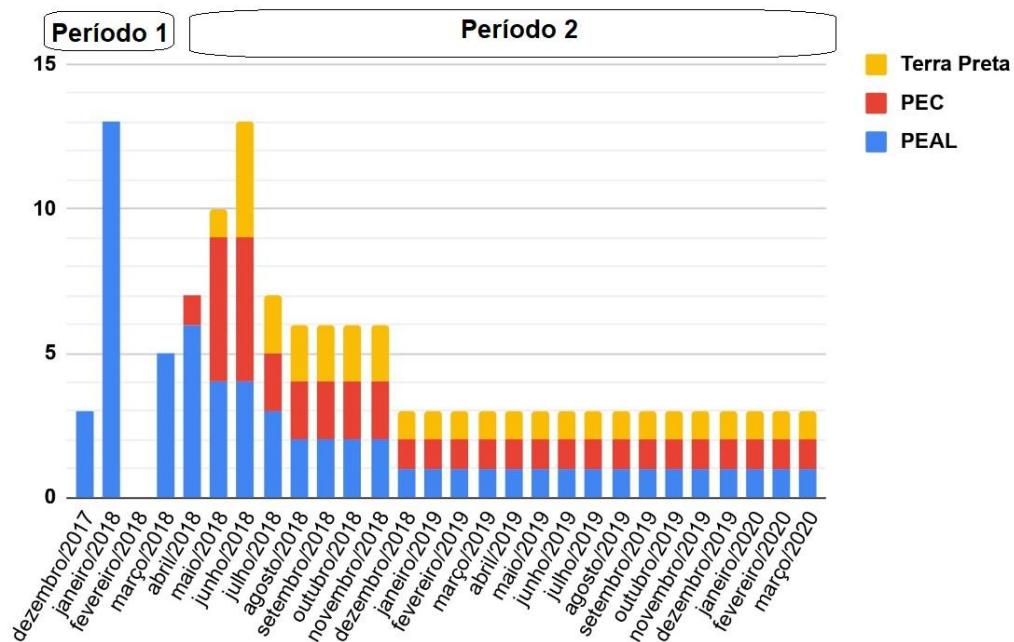
A quantidade de coletas entomológicas realizadas em cada local é apresentada no Quadro 1. O PEAL teve um maior número de coletas (N=62) em relação aos outros dois locais (N=37 e N=31) por ter tido a definição de seus pontos no pico da epidemia de febre amarela, durante alta mortalidade de primatas não-humanos no parque. Os outros locais foram adicionados posteriormente, seguindo o aumento de epizootias e casos humanos nessas áreas, para monitoramento de período após morte de bugios. A partir de agosto/2018, as coletas foram realizadas de forma quinzenal em cada local e, a partir de dezembro/2018, de forma mensal (Figura 5). A frequência das coletas foi sendo modificada ao longo do período, por terem sido realizadas em paralelo com a vigilância, de acordo com as notificações e com a disponibilidade de insumos e equipe.

**Quadro 1** - Quantidade e período das coletas entomológicas realizadas nos Parques Estaduais Alberto Loeffgren e da Cantareira e no Bairro Terra Preta.

Ponto de Coleta	N. de Coletas (Dias de coleta)	Período
Parque Estadual Alberto Löffgren (PEAL)	62	Dez/2017 até Mar/2020
Parque Estadual da Cantareira (PEC)	37	Abr/2018 até Mar/2020
Distrito Terra Preta (Mairiporã)	31	Mai/2018 até Mar/2020

Aqui consideramos os meses de dezembro/2017 e janeiro/2018, quando ocorreram as epizootias em bugios, como sendo o período 1, e os demais meses após eliminação dos grupos de bugios, como sendo o período 2.

**Figura 5** - Quantidade de coletas entomológicas por mês no PEAL, no PEC e no distrito de Terra Preta, de dezembro/2017 a março/2020.



Com auxílio de um capturador de Castro (aspirador bucal), os mosquitos coletados foram mantidos vivos em tubo de contenção até que fossem congelados em nitrogênio líquido, para possibilitar testes virológicos. Os espécimes foram

aconicionados em criotubos devidamente identificados com etiquetas. Os dados das coletas entomológicas foram registrados em boletim específico, com informações sobre a técnica empregada, altura (solo ou copa), localização, coordenadas geográficas, data e horário de coleta. Em laboratório, as amostras nos criotubos foram transferidas do botijão de nitrogênio líquido para freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e mantidos assim até a identificação taxonômica.

#### 4.1.3 Identificação taxonômica dos mosquitos

Todos os culicídeos adultos capturados foram identificados morfologicamente em nível de espécie ou, ao menos, em nível de gênero, quando o material não estava em condições adequadas para a identificação taxonômica completa. A identificação foi realizada em mesa fria ( $-40^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 6), no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP), com base em chaves taxonômicas propostas por Lane (41), Consoli e Lourenço de Oliveira (2) e Forattini (1).

**Figura 6** - Mesa fria e lupa utilizadas para identificação taxonômica de culicídeos.



Foto: Juliana Telles de Deus, 2021

As fêmeas de todas as espécies de culicídeos com vestígio de sangue (Figura 7) ou ovos no abdômen foram selecionadas e tiveram o abdômen separado



da cabeça e do tórax, com o auxílio de pinça e agulha entomológicas. Os instrumentos eram higienizados com hipoclorito de sódio e álcool a cada troca de manipulação dos espécimes. Os abdomens foram acondicionados individualmente em tubos Lysing Matrix A (MP Biomedicals) e cabeça/tórax foram acondicionados em microtubos para eventuais testes. As amostras foram mantidas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até as próximas etapas.

**Figura 7** - Fêmea de *Haemagogus janthinomys/capricornii* capturada com vestígio de alimentação sanguínea.



Foto: Esmenia Coelho, 2021; Lupa Estereoscópica Leica, SUCEN.

#### **4.2 Alimentação sanguínea artificial de mosquitos com diferentes estágios de digestão**

Fêmeas de culicídeos foram alimentadas com sangue em laboratório a fim de obter amostras com fonte alimentar conhecida. Para testar a eficácia do protocolo de sequenciamento por meio das plataformas da Nanopore, foram utilizadas fêmeas ingurgitadas com diferentes estágios de digestão.

Mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foram obtidos a partir de ovos cedidos pelo Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA) da Fundação Oswaldo Cruz (RJ), assim como descrito por Lima-Camara e colaboradores (42). A formação da colônia para alimentação artificial ocorreu no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da USP. Fitas com aproximadamente 200 ovos foram colocadas em recipientes com 1 litro de água e ração de peixe Tetramin® para a eclosão das larvas (Figura 8). Depois da formação das pupas, cerca de 8 dias após a eclosão das larvas, estas foram distribuídas em duas gaiolas para a emergência dos mosquitos adultos. Cada gaiola continha,

aproximadamente, com mosquitos. Uma solução açucarada a 15% ficou à disposição para os mosquitos se alimentarem nas duas gaiolas.

**Figura 8** - Ovos de *Aedes aegypti* para eclosão em recipiente com água e ração de peixe Tetramin®.

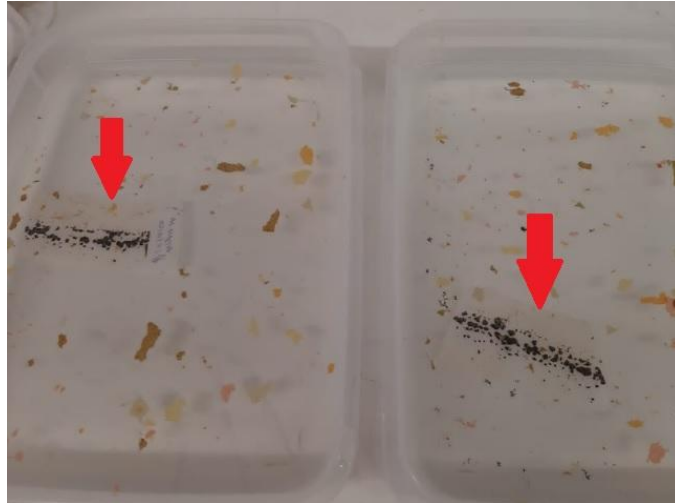


Foto: Tamara Nunes Lima-Camara, 2021.

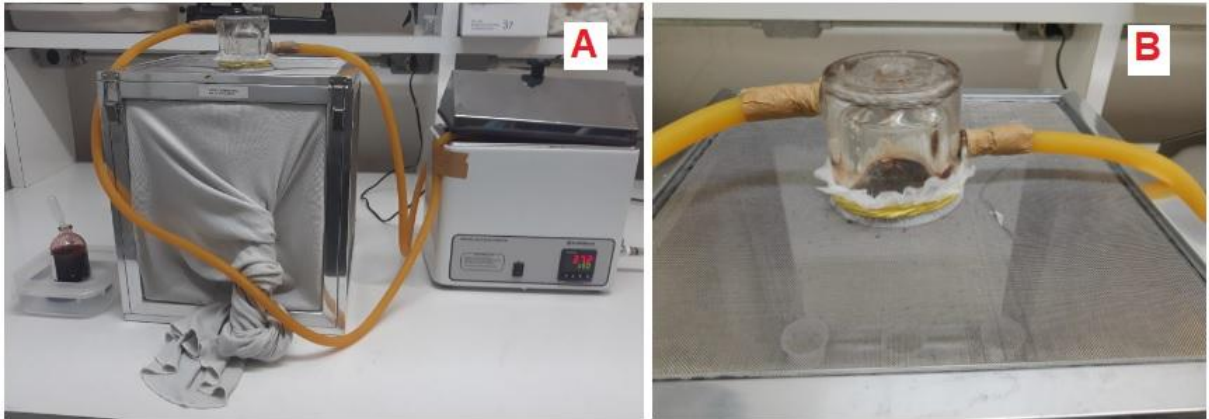
Após a emergência, cerca de dez machos adultos foram congelados individualmente em microtubos para serem utilizados como controle nos experimentos moleculares. Com três dias de idade e após jejum de 24 horas, as fêmeas foram alimentadas artificialmente com sangue bovino e com sangue humano. O sangue de boi utilizado era subproduto de abate e o uso foi aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-SUCEN (nº 0004). Já o sangue humano foi retirado de voluntário com o devido Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Parecer Comitê Ética da FSP-USP (nº 5.421.728).

Foi utilizado um alimentador artificial para insetos hematófagos (Figura 9B), conectado a um banho-maria a 37°C (Figura 9A), que manteve o sangue atrativo para os mosquitos. Para servir como membrana, foi utilizado tecido TNT (Figura 10), que se mostrou mais eficaz do que parafilme ou membrana de intestino de pinto. Duas colônias foram alimentadas artificialmente com sangue, sendo uma com sangue humano e outra com sangue bovino. As colônias foram mantidas ainda por mais uma semana para amostragem de fêmeas com sangue digerido.

Para a manipulação dos mosquitos, foi utilizado o capturador de Castro (Figura 11), e este foi mantido em freezer -20°C por alguns minutos, até a eutanásia

dos adultos. Todas as amostras de fêmeas ingurgitadas e de machos para controle foram armazenadas em microtubos Lysing Matrix A (MP Biomedicals) e, em seguida, mantidas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a etapa de sequenciamento genético.

**Figura 9** - Equipamentos utilizados na alimentação sanguínea artificial de mosquitos.



Legenda: Em A = gaiola entomológica, à esquerda, e banho-maria, à direita; B = alimentador de insetos hematófagos. Fotos: Esmenia Coelho Rocha, 2021.

**Figura 10** - Fêmeas de *Aedes aegypti* alimentando-se de sangue em gaiola entomológica, a partir de alimentador artificial de insetos hematófagos, com membrana de tecido TNT.



Fotos: Paulo Urbinatti, 2021

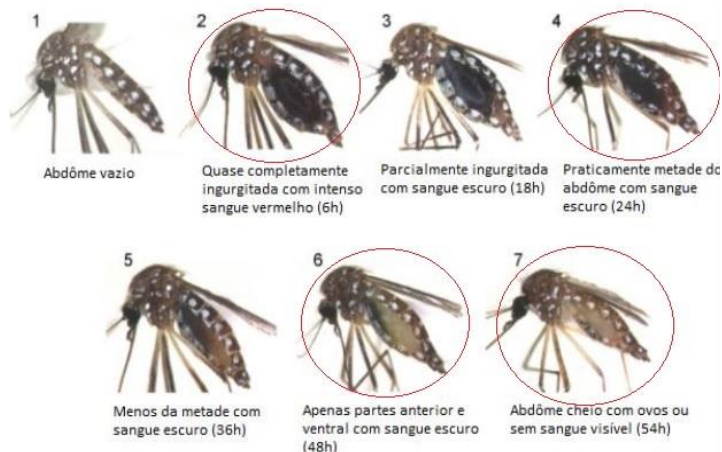
**Figura 11** - Separação das fêmeas completamente ingurgitadas após alimentação artificial com sangue.



Fotos: Licia Natal Fernandes, 2021

Das fêmeas alimentadas artificialmente com sangues humano e bovino, foram separados três grupos: o primeiro grupo era de fêmeas recém alimentadas e com abdômen completamente distendido, condizentes com o estágio 2 da escala Sella (43) (Figura 12); as fêmeas do segundo grupo foram correspondentes ao estágio 4, digestão de 24 horas; e o terceiro grupo de fêmeas correspondeu ao estágio 6 (Figura 12), com 48 horas de digestão. Também foram separadas fêmeas em estágio de digestão completa, ou seja, sem mais vestígios de sangue no abdômen (estágio 7 da escala Sella) (Figura 12), foram também congeladas. Foram separadas cerca de dez fêmeas de cada um dos grupos.

**Figura 12** - Diferentes estágios de digestão em fêmeas de *Aedes aegypti*, baseados na escala Sella, com indicação do tempo aproximado de digestão.



Legenda: círculos vermelhos = estágios utilizados no experimento. Fonte: Adaptado de Santos e colaboradores (44).

### **4.3 Adaptação do sequenciamento por nanoporos para identificação de hospedeiro vertebrado, da espécie de mosquito e patógenos em um mesmo ensaio**

#### **4.3.1 Obtenção de controles positivos**

Para controles positivos virais, foram utilizadas fêmeas alimentadas artificialmente com sangue infectado com Zika vírus. As amostras foram provenientes de ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, igualmente cedidos pelo LATHEMA-Fiocruz. As infecções foram realizadas em laboratório com condições de isolamento dos mosquitos (insetário), de nível de segurança II, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo. O sangue utilizado foi de humano voluntário e o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-USP (número 6.049.131). Utilizando o sistema Hemotek de alimentação, o sangue infectado foi oferecido para os mosquitos, dentro de uma cabine de segurança, que impede que os mosquitos escapem. Essas fêmeas foram, então, adormecidas em CO<sub>2</sub>, congeladas e armazenadas individualmente em microtubos Lysing Matrix A (MPBio), permanecendo em freezer -80°C até o processamento. Foram separadas dez fêmeas *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* com abdômen completamente distendido.

#### **4.3.2 Extração de ácido nucléico total**

Todas as fêmeas infectadas por alimentação em laboratório foram maceradas individualmente. O primeiro passo foi adicionar 500 ul de tampão HBSS em cada tubo para, em seguida, processar no instrumento FastPrep-24 (MPBio) por 40 segundos. Esse equipamento macera rapidamente as amostras, de forma a não ter partes inteiras dos mosquitos. Finalizada a maceração, foi acrescentado tampão HBSS em quantidade suficiente para completar 1000 ul em cada tubo. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos.

A extração do ácido nucléico total a partir do macerado dos mosquitos foi realizada seguindo o protocolo Easy Mag Specific B Lysis off board. Este extrator automático realiza a extração simultaneamente de DNA e RNA contido nas amostras. Neste processo, foram transferidos 350ul do macerado das amostras para

o vessel do equipamento Easy Mag (bioMérieux), juntamente com 2000ul de tampão de lise, incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, 100ul de sílica magnética, previamente eluída em água, foram adicionados às amostras. As amostras foram, então, inseridas no extrator para as demais etapas da extração, terminando com o produto eluído em 70ul, que foi transferido para um microtubo e armazenado em freezer -80°C. Todas as extrações contaram com um controle negativo, composto por apenas os reagentes do experimento.

#### 4.3.3 Amplificação com primers específicos

Para confirmar a extração de DNA, algumas das amostras alimentadas artificialmente foram submetidas à PCR convencional com primers de DNA mitocondrial de humano e boi (Quadro 2). Foram necessários 5 ul de cada amostra extraída, adicionados de 13,8ul de água livre de nuclease, 2,5 ul de tampão (10x), 1,5 ul de cloreto de magnésio (50mM), 0,5ul de dNTP (10mM), 0,2ul da enzima Taq (5U/ul) e 0,75 ul de cada um dos iniciadores (forward e reverse) (10µM). Foram adicionados controles negativos em todas as reações. Os parâmetros no termociclador estão descritos no Quadro 3. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em E-gel Agarose 2% (Thermo Fisher Scientific) corado com SYBR gold, e visualizados no equipamento E-gel (Thermo Fisher Scientific).

**Quadro 2** - Iniciadores utilizados para a PCR com alvos específicos para humano e bovino.

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)
Humano (F)	TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC	228
Humano (R)	TATGCGGGGAAACGCCATATCG	
Bovino (F)	GCCATATACTCTCCTTGGTGACA	271
Bovino (R)	GTAGGCTTGGGAATAGTACGA	

Fonte: *Primer* humano retirado de Parodi e colaboradores (45) e *primer* bovino retirado de Tartaglia e colaboradores (46).

**Quadro 3** - Parâmetros utilizados em PCR convencional com *primers* de humano e bovino.

Etapa	Primer de humano			Primer de boi		
	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)	Ciclos
Ativação	94	02:00	1	94	02:00	1
Desnaturação	94	00:30		94	00:30	
Anelamento	70	00:30	35	61	00:30	35
Extensão	72	00:30		72	00:30	
Extensão final	72	10:00	1	72	10:00	1
Manter	4	Indefinido	1	4	Indefinido	1

Fonte: Chang e colaboradores (47).

#### 4.3.4 Amplificação de genes mitocondriais para sequenciamento

Para amplificação do DNA de vertebrados, assim como do DNA de mosquito, foram utilizados iniciadores para a subunidade I do *citocromo c oxidase* (COI) e para o *citocromo b* (Cyt *b*). Para COI de vertebrados, foram utilizados dois *primers* que se sobrepõem, um de uma região curta e um de uma região longa do gene (48). Para o COI de mosquitos, foram utilizados dois *primers* do gene sem lacunas entre eles (49). Tais iniciadores, que possuem posições degeneradas, foram usados para aumentar as chances de ligação com um número amplo de diferentes espécies. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos no Quadro 4.

**Quadro 4** - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do DNA de vertebrados e de mosquitos.

	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Fonte
Vertebrados	COI longo (F)	AACCACAAAGACATTGGCAC	682	Townzen et al. 2008
	COI longo (R)	AAGAATCAGAATARGTGTTG		
	COI curto (F)	GCAGGAACAGGWTGAACCG	346	
	COI curto (R)	AATCAGAAAYAGGTGTTGGTATAG		
	CytB (F)	GAGGMCAAATATCATTCTGAGG	478	
	CytB (R)	TAGGGCVAGGACTCCTCCTAGT		
Mosquitos	COI Anoph (F)	GCAGGAATTTCTTCTATTTTAGG	275	Ajamma et al. 2021
	COI Anoph (R)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
	COI Mos (F)	ATAGTWATACCTATYATAATTGG	299	
	COI Mos (R)	ACWGTAGTAATAAAATTTACTGC		
	CytB (F)	GGACAAATATCATTGAGGAGCAACAG	470	
	CytB (R)	ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG		

Cada conjunto de iniciadores foi amplificado separadamente e cada um com o respectivo controle negativo. Para a amplificação, foram utilizados 2,5 µL de DNA extraído de cada amostra de mosquito, 2 µL de cada iniciador a 10 µM, 12,5 µL de Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB) e 6 µL de água livre de nucleases, totalizando 25 µL para a reação de PCR. Os parâmetros utilizados para a PCR estão descritos nos Quadro 5.

Para cada amostra, foram gerados seis produtos amplificados (amplicons) diferentes, com os *primers* mencionados anteriormente.

**Quadro 5** - Parâmetros utilizados no termociclador para programação da PCR de espécies de vertebrados e espécies de mosquitos.

Etapa	Vertebrados						Mosquitos					
	COI (Longo e curto)			CytB			COI (Anoph e Mos)			CytB		
	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)	Ciclos
Ativação	95	01:00	1	95	01:00	1	95	01:00	1	95	01:00	1
Desnaturação	95	00:30		95	00:30		95	00:30		95	00:30	
Anelamento	60-62*	00:50	35	61	00:50	35	56	00:20	35	61	00:20	35
Extensão	72	01:00		72	01:00		72	00:30		72	00:30	
Extensão final	72	05:00	1	72	05:00	1	72	07:00	1	72	07:00	1
Manter	4	Indefinido	1	4	Indefinido	1	4	Indefinido	1	4	Indefinido	1

Legenda: \* = PCR Touch-up: 10 ciclos de 60°C e 25 ciclos de 62°C, totalizando 35 ciclos.

#### 4.3.5 Amplificação de RNA viral

Uma alíquota de 44 µL do ácido nucléico extraído das amostras de mosquitos foi previamente separada para essa etapa. Aqui foi utilizado o protocolo SMART-9N (Switch Mechanism at the 5' End of RNA Templates), descrito por Claro e colaboradores (50), que amplifica qualquer nucleotídeo de forma aleatória para detecção de qualquer vírus de RNA (metagenômica viral).

O protocolo inicia com tratamento com DNase nas amostras, seguido de purificação e concentração. Isso permite diminuir a concentração do genoma do hospedeiro amostral (nesse caso, mosquito) e aumentar a concentração do genoma do possível vírus a ser detectado na amostra. O tratamento foi feito adicionando Turbo-DNase (Thermo Fisher Scientific) e incubando a 37°C por 30 minutos, para remover DNA. Já a purificação e concentração foram realizadas com o kit Zymo RNA Clean-up & Concentrator-5 (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante.



Para a síntese de cDNA, utilizou-se 10 ul de cada amostra extraída e tratada, mais 1ul de dNTP mix (10mM) (New England BioLabs) e 1 ul do primer randômico 9N (2uM) (New England BioLabs), que foram incubados a 65°C por 5 min e, após, resfriados em gelo. Em seguida, foi preparado mix com 4ul do buffer de SuperScript IV, 1 ul de DTT (0,1M), 1 ul de RNase OUT, 1 ul do primer SSP (2µM) (NEB) e 1 uL de SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram incubadas a 42°C por 90 min e a 70°C por 10 min. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no Quadro 6.

**Quadro 6** - Sequências dos *primers* utilizados para amplificação por metagenômica.

Primer	Sequência (5'-3')
9N	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACNNNNNNNNN
SSP	GCTAATCATTGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrGrG
NEB PCR Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

A amplificação a partir do cDNA sintetizado foi realizada com 5 ul de Q5 reaction buffer (NEB), 0,5 ul dNTP (10mM), 1 ul de primer PCR da NEB (20 µM), 15,75 ul de água livre de nuclease, 0,25 ul de Q5 DNA polimerase e 2,5 ul da amostra. Para cada etapa (tratamento, cDNA e PCR) também foram adicionados controles negativos. Os parâmetros encontram-se no Quadro 7.

**Quadro 7** - Parâmetros utilizados para amplificação por metagenômica.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)	Ciclos
Ativação	98	00:45	1
Desnaturação	98	00:15	30
Anelamento	62	00:15	
Extensão	65	05:00	
Extensão final	65	10:00	1
Manter	4	Indefinido	1

#### 4.3.6 Sequenciamento genético por tecnologia de nanoporos

O preparo a seguir da biblioteca de sequenciamento foi adaptado unindo o protocolo SMART-9N, citado anteriormente, e o protocolo de sequenciamento LoCost da Nanopore.

Cada amostra teve os seis diferentes produtos de PCR (tópico 4.3.4 da metodologia) reunidos e homogeneizados em um mesmo microtubo. Desta mistura, foram utilizados 5ul para diluição em 20ul de água livre de nuclease. Já os amplicons da metagenômica foram purificados com AMPure XP beads magnéticas (Beckman Coulter) e quantificados com o kit Qubit dsDNA High Sensitivity (Life Technologies) no equipamento Qubit 3.0 (Life Technologies), seguindo as instruções dos fabricantes.

Com o resultado da quantificação, cada amostra foi normalizada para ter o mesmo *input* na biblioteca de sequenciamento, 50ng cada. Dessa forma, as amostras foram utilizadas nas seguintes quantidades: 3,3ul da diluição da PCR mitocondrial, mais 50ng da PCR de metagenômica (quantidade variou de acordo com o resultado da quantificação de cada amostra), e água livre de nuclease para completar o volume final de 20ul.

Para o preparo da biblioteca de sequenciamento, foi seguido o protocolo dos kits de Native barcoding EXPNBD104 e EXP-NBD114 (Oxford Nanopore Technologies). As amostras tiveram as extremidades de suas fitas de DNA reparadas com 2,8ul de Ultra II End Prep Reaction Buffer e 1,2ul de Ultra II End Prep Enzyme Mix (NEB), incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e por 5 minutos a 64°C. Essa etapa adiciona uma cauda de adenina nas extremidades, preparando as fitas para a etapa a seguir, de ligação dos barcodes. Foi atribuído um barcode diferente para cada amostra, que serve para identificá-las posteriormente nas análises. Os kits utilizados aqui permitem o sequenciamento de 24 amostras por biblioteca, sendo os barcodes de número NB01 ao NB24. Em cada biblioteca, um dos barcodes foi atribuído a um controle. A ligação foi feita com 2,5ul de Native barcode, 27,5ul de Ultra II ligation Master Mix e 1ul de Ultra II Enhancer, incubados a temperatura ambiente por 30 minutos e a 70°C por 10 minutos. Depois de identificadas com barcodes, as amostras foram reunidas em um único *pool* de biblioteca de sequenciamento e passaram por mais uma etapa de purificação com *beads* magnéticas.

O próximo passo foi a ligação de adaptadores com 5ul de Adapter Mix (AMII) (ONT), 50ul de Ultra II ligation Master Mix e 1ul de Ultra II Enhancer. A biblioteca foi, então, incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, purificada e quantificada uma última vez. O input da biblioteca final foi de 50ng e utilizou-se o kit SQKLSK109 (ONT) para aplicação na flow cell (FLOMIN106) do dispositivo de sequenciamento MinION (ONT). O software para acompanhamento em tempo real do sequenciamento foi o MinKNOW 1.15.1 e a duração foi de aproximadamente 24 horas.

#### **4.3.7 Criação de banco de dados e análises de bioinformática**

Após o sequenciamento, os arquivos de leitura bruta RAW FAST5 gerados foram convertidos no formato FASTQ, com auxílio do Guppy Basecaller (51), transformando o sinal elétrico em sequência de bases nitrogenadas. Depois, foram separados de acordo com cada barcode com o Guppy Barcoder (52). Os adaptadores e barcodes foram removidos usando o Porechop (53).

Foram criados dois bancos de dados em formato FASTA com sequências de COI e Cyt *b*: um para vertebrados e um para culicídeos. As sequências foram retiradas do GenBank (54) e do BOLD (Barcode of Life Database) (55). Os filtros de pesquisa no GenBank foram: genomic DNA/RNA, Nucleotide, Mitochondrion, Animals/chordates/vertebrates e Animals/arthropods/insects/flies/mosquitos. Já no BOLD foi utilizado o resultado das pesquisas “Chordata” e “Culicidae”. Seqkit (56) foi utilizada para remover sequências duplicadas.

Usando o software Minimap2 (57), as sequências das amostras foram mapeadas com os bancos de dados. O software gerou relatórios com as espécies que mais foram compatíveis com as leituras. Para confirmar os resultados, o arquivo FASTQ de cada amostra foi convertido em FASTA e a similaridade foi verificada usando o BLAST (58).

As amostras também foram comparadas com o MiniKraken2 database (59) para detecção de bactérias e vírus conhecidos. Em caso positivo para algum agente, a sequência era mapeada contra o genoma de referência da espécie identificada e o arquivo FASTQ convertido em BAM com o software SAMtools (60). O mapeamento do genoma era, então, visualizado com o Tablet (61), a consenso gerada a partir do

SAMtoolsmpileup e o arquivo FASTQ convertido em FASTA com o SeqtkSeq. A similaridade também era verificada com o BLAST.

#### **4.4 Identificação de fontes sanguíneas e vírus em mosquitos nas áreas de estudo**

O protocolo adaptado descrito acima foi aplicado primeiramente nas amostras de mosquitos alimentados em laboratório e, após confirmação dos resultados, foi aplicado da mesma forma nas amostras de mosquitos de campo (Serra da Cantareira). A técnica foi utilizada para a investigação das fontes alimentares dos mosquitos coletados no PEAL no período 1 e no período 2. Da mesma forma, o protocolo foi aplicado para determinar as fontes sanguíneas de mosquitos dos outros locais de coleta (PEC e Terra Preta), assim como para detectar YFV nas fêmeas ingurgitadas dos três locais de coleta.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação taxonômica dos mosquitos

Do período de dezembro/2017 a março/2020, de um total de 130 dias de coleta, foram obtidos 5329 culicídeos (Tabela 1), sendo 5001 fêmeas (93,8%) e 328 (6,2%) machos. As amostras ficaram distribuídas entre 14 gêneros e 65 espécies diferentes. As espécies com maior número de indivíduos coletados foram *Limatus durhamii* (36,7%), *Hg. leucocelaenus* (15,3%), *Ae. scapularis* (7,8%), *Wyeomyia (Prosopolepis) confusa* (6,5%) e *Ae. albopictus* (6,4%). Essas espécies tiveram exemplares de fêmeas com vestígios de sangue entre os mosquitos coletados (Tabela 1).

Das 5001 fêmeas coletadas, 163 (3,3%) estavam com algum vestígio de sangue ou ovos em seu abdômen. Essas ficaram distribuídas em 19 diferentes espécies de culicídeos. As outras espécies com amostragem de fêmeas ingurgitadas foram *Ae. fluviatilis*, *Ae. fulvus*, *Ae. terreus*, *Ae. aegypti*, *Coquillettidia (Rhynchotaenia) shannoni*, *Culex (Culex) bidens*, *Culex (Culex) grupo coronator*, *Culex (Culex) nigripalpus*, *Hg. janthinomys/capricornii*, *Ps. ferox*, *Sabethes (Peytonulus) undosus/fabricii/ignotus*, *Sabethes (Sabethes) purpureus*, *Trichoprosopon compressum* e *Wyeomyia (Phoniomyia) fuscipes* (Tabela 1). Além disso, foram coletados indivíduos de espécies não identificadas dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Sabethes* e *Wyeomyia*.

**Tabela 1** - Quantidade de mosquitos coletados na Serra da Cantareira de acordo com a espécie, de dezembro de 2017 a março de 2020.

Espécie	N	%	Espécie	N	%
<b>Aedes (Grg.) fluviatilis</b>	97	1,82	<i>Runchomyia</i> spp.	10	0,19
<b>Aedes (Och.) fulvus</b>	1	0,02	<i>Sabethes (Dav.) petrocchiaie</i>	1	0,02
<b>Aedes (Och.) scapularis</b>	416	7,81	<i>Sabethes (Pey.) identicus</i>	25	0,47
<i>Aedes (Pro.) argyrothorax</i>	4	0,08	<i>Sabethes (Pey.) soperi</i>	4	0,08
<b>Aedes (Pro.) terreus</b>	30	0,56	<b><i>Sabethes (Pey.) undosus/fabricii/ignotus</i></b>	59	1,11
<b>Aedes (Stg.) aegypti</b>	67	1,26	<i>Sabethes (Pey.) whitmani</i>	7	0,13
<b>Aedes (Stg.) albopictus</b>	343	6,44	<i>Sabethes (Pey.) whitmani</i> aff.	1	0,02
<i>Aedes (Stg.) sp.</i>	1	0,02	<i>Sabethes (Sab.) albiprivus</i>	38	0,71
<b>Aedes spp.</b>	29	0,54	<i>Sabethes (Sab.) gymnothorax</i>	3	0,06
<i>Coquillettidia (Rhy.) chrysonotum/albifera</i>	2	0,04	<b><i>Sabethes (Sab.) purpureus</i></b>	152	2,85
<i>Coquillettidia (Rhy.) hermanoi</i>	2	0,04	<i>Sabethes (Sab.) purpureus</i> aff.	1	0,02
<b><i>Coquillettidia (Rhy.) shannoni</i></b>	1	0,02	<i>Sabethes (Sab.) quasicyaneus</i>	4	0,08
<i>Coquillettidia (Rhy.) venezuelensis</i>	11	0,21	<b><i>Sabethes (Sab.) spp.</i></b>	6	0,11
<i>Coquillettidia spp.</i>	2	0,04	<i>Sabethes (Sbn.) intermedius</i>	43	0,81
<b><i>Culex (Cux.) bidens</i></b>	7	0,13	<i>Sabethes (Sbn.) intermedius</i> aff.	2	0,04
<i>Culex (Cux.) bilineatus</i>	2	0,04	<i>Sabethes (Sbn.) spp.</i>	4	0,08
<i>Culex (Cux.) chidesteri</i>	2	0,04	<i>Sabethes (Sbo.) tridentatus</i>	1	0,02
<i>Culex (Cux.) declarator</i>	31	0,58	<i>Sabethes</i> spp.	45	0,84
<b><i>Culex (Cux.) grupo coronator</i></b>	1	0,02	<i>Shannoniana fluviatilis</i>	9	0,17
<i>Culex (Cux.) lygrus</i>	1	0,02	<i>Shannoniana fluviatilis</i> aff.	1	0,02
<b><i>Culex (Cux.) nigripalpus</i></b>	105	1,97	<b><i>Trichoprosopon compressum</i></b>	8	0,15
<i>Culex (Cux.) quinquefasciatus</i>	3	0,06	<i>Trichoprosopon digitatum</i>	12	0,23
<b><i>Culex (Cux.) spp.</i></b>	230	4,32	<i>Trichoprosopon palidiventer/castroi/simile</i>	8	0,15
<i>Culex (Mcx.) spp. grupo imitator</i>	2	0,04	<i>Trichoprosopon</i> spp.	20	0,38
<i>Culex (Mel.) distinguendus</i> aff.	2	0,04	<i>Wyeomyia (Ant.) alani</i> aff.	1	0,02
<i>Culex (Mel.) intricatus</i>	1	0,02	<i>Wyeomyia (Den.) complosa</i>	3	0,06
<i>Culex (Mel.) pereyrai</i>	3	0,06	<i>Wyeomyia (Den.) jocosa</i>	7	0,13
<i>Culex (Mel.) sacchettae</i>	4	0,08	<i>Wyeomyia (Den.) jocosa</i> aff.	3	0,06
<b><i>Culex (Mel.) spp.</i></b>	21	0,39	<i>Wyeomyia (Den.) spp.</i>	2	0,04
<b><i>Culex spp.</i></b>	10	0,19	<i>Wyeomyia (Hys.) autocratica</i> aff.	4	0,08
<b><i>Haemagogus (Con.) leucocelaenus</i></b>	815	15,29	<i>Wyeomyia (Hys.) circumcincta</i> aff.	1	0,02
<i>Haemagogus (Hag.) albomaculatus</i> aff.	2	0,04	<i>Wyeomyia (Men.) leucostigma</i> aff.	1	0,02
<b><i>Haemagogus (Hag.) janthinomys/capricornii</i></b>	38	0,71	<i>Wyeomyia (Mia.) limai</i>	1	0,02
<i>Haemagogus (Hag.) janthinomys/capricornii</i> aff.	6	0,11	<i>Wyeomyia (Mia.) lutzi</i>	3	0,06
<i>Haemagogus (Hag.) sp.</i>	1	0,02	<i>Wyeomyia (Mia.) lutzi</i> aff.	1	0,02
<i>Haemagogus spp.</i>	4	0,08	<i>Wyeomyia (Mia.) sabethea</i>	1	0,02
<i>Johnbelkinia spp.</i>	5	0,09	<b><i>Wyeomyia (Pho.) fuscipes</i></b>	2	0,04
<b><i>Limatus durhamii</i></b>	1954	36,67	<i>Wyeomyia (Pho.) muehlensi</i>	1	0,02
<i>Limatus flavisetosus</i>	1	0,02	<i>Wyeomyia (Pho.) pallidiventer</i>	1	0,02
<i>Limatus spp.</i>	4	0,08	<i>Wyeomyia (Pho.) palmata</i>	1	0,02
<b><i>Mansonia sp.</i></b>	1	0,02	<i>Wyeomyia (Pho.) pilicauda</i>	3	0,06
<i>Onirion brucei</i> aff.	1	0,02	<b><i>Wyeomyia (Pho.) spp.</i></b>	24	0,45
<i>Onirion personatum</i> aff.	1	0,02	<i>Wyeomyia (Pho.) splendida</i>	2	0,04
<i>Onirion spp.</i>	2	0,04	<i>Wyeomyia (Pho.) theobaldi</i>	2	0,04
<i>Psorophora (Jan.) albigenu</i>	2	0,04	<b><i>Wyeomyia (Prl.) confusa</i></b>	345	6,47
<b><i>Psorophora (Jan.) ferox</i></b>	10	0,19	<i>Wyeomyia (Prl.) confusa</i> aff.	6	0,11
<i>Psorophora spp.</i>	4	0,08	<i>Wyeomyia (Spi.) airosai/howardi/luteoventralis</i>	4	0,08
<i>Runchomyia (Run.) frontosa</i>	1	0,02	<i>Wyeomyia (Wyo.) melanopus</i>	1	0,02
<i>Runchomyia (Run.) reversa</i>	2	0,04	<b><i>Wyeomyia spp.</i></b>	160	3,00
<b>Total</b>				<b>5329</b>	<b>100,00</b>

Legenda: Destacadas em vermelho estão as espécies com amostras de fêmeas ingurgitadas.

Das 163 fêmeas ingurgitadas, 94 (57,7%) foram coletadas no PEAL, 45 (27,6%) no PEC e 24 (14,7%) no distrito de Terra Preta (Tabela 2). No PEAL, as espécies mais presentes foram *Ae. scapularis* (28,8%), *Ae. albopictus* (10,7%), *Cx. nigripalpus* (9,6%), *Hg. leucocelaenus* (23,4%) e *Li. durhamii* (11,7%). No PE da Cantareira, *Hg. leucocelaenus* (24,4%) e *Cx. nigripalpus* (17,8%) tiveram os maiores números de amostras, enquanto no distrito de Terra Preta, apenas *Hg. leucocelaenus* (33,3%) se destacou (Tabela 2). O estrato em que cada fêmea foi coletada (solo ou copa) pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 2** - Espécies de fêmeas ingurgitadas coletadas no PEAL, PEC e distrito de Terra Preta, no período de dezembro de 2017 a março de 2020.

Espécie culicídeo	PEAL/Horto Florestal		PEC		Terra Preta	
	N	%	N	%	N	%
<i>Aedes (Grg.) fluviatilis</i>	3	3,19	-	-	1	4,17
<i>Aedes (Och.) fulvus</i>	-	-	1	2,22	-	-
<i>Aedes (Och.) scapularis</i>	27	28,72	-	-	-	-
<i>Aedes (Pro.) terrens</i>	1	1,06	1	2,22	-	-
<i>Aedes (Stg.) aegypti</i>	1	1,06	-	-	-	-
<i>Aedes (Stg.) albopictus</i>	10	10,64	-	-	-	-
<i>Aedes</i> spp.	-	-	2	4,44	-	-
<i>Coquillettidia (Rhy.) shannoni</i>	-	-	1	2,22	-	-
<i>Culex (Cux.) bidens</i>	5	5,32	2	4,44	-	-
<i>Culex (Cux.) grupo coronator</i>	1	1,06	-	-	-	-
<i>Culex (Cux.) nigripalpus</i>	9	9,57	8	17,78	-	-
<i>Culex (Cux.)</i> spp.	-	-	2	4,44	1	4,17
<i>Culex (Mel.)</i> sp.	-	-	1	2,22	-	-
<i>Culex</i> sp.	-	-	1	2,22	-	-
<i>Haemagogus (Con.) leucocelaenus</i>	22	23,40	11	24,44	8	33,33
<i>Haemagogus (Hag.) janthinomys/capricornii</i>	-	-	-	-	3	12,50
<i>Li. durhamii</i>	11	11,70	1	2,22	3	12,50
<i>Mansonia</i> sp.	-	-	1	2,22	-	-
<i>Psorophora (Jan.) ferox</i>	-	-	1	2,22	-	-
<i>Sabethes (Pey.) undosus/fabricii/ignotus</i>	-	-	1	2,22	1	4,17
<i>Sabethes (Sab.) purpureus</i>	1	1,06	4	8,89	2	8,33
<i>Sabethes (Sab.)</i> spp.	-	-	1	2,22	1	4,17
<i>Trichoprosopon compressum</i>	-	-	1	2,22	-	-
<i>Wyeomyia (Pho.) fuscipes</i>	-	-	1	2,22	-	-
<i>Wyeomyia (Pho.)</i> sp.	-	-	-	-	1	4,17
<i>Wyeomyia (Prl.) confusa</i>	-	-	3	6,67	3	12,50
<i>Wyeomyia</i> spp.	3	3,19	1	2,22	-	-
<b>Total</b>	<b>94</b>	<b>100,00</b>	<b>45</b>	<b>100,00</b>	<b>24</b>	<b>100,00</b>

**Tabela 3** - Número de fêmeas ingurgitadas coletadas nos diferentes estratos, de acordo com a espécie.

<b>Espécie culicídeo</b>	<b>N Solo</b>	<b>N Copa</b>
<i>Aedes (Grg) fluviatilis</i>	4	-
<i>Aedes (Och) fulvus</i>	1	-
<i>Aedes (Och) scapularis</i>	27	-
<i>Aedes (Pro) terrens</i>	2	-
<i>Aedes (Stg) aegypti</i>	1	-
<i>Aedes (Stg) albopictus</i>	10	-
<i>Aedes sp.</i>	1	1
<i>Coquillettidia (Rhy) shannoni</i>	1	-
<i>Culex (Cux) bidens</i>	7	-
<i>Culex (Cux) grupo coronator</i>	1	-
<i>Culex (Cux) nigripalpus</i>	17	-
<i>Culex (Cux) sp.</i>	4	-
<i>Culex sp.</i>	1	-
<i>Haemagogus (Con) leucocelaenus</i>	28	13
<i>Haemagogus (Hag) janthinomys/capricornii</i>	1	2
<i>Limatus durhamii</i>	15	-
<i>Mansonia sp.</i>	1	-
<i>Psorophora (Jan) ferox</i>	1	-
<i>Sabethes (Pey) undosus/fabricii/ignotus</i>	2	-
<i>Sabethes (Sab) purpureus</i>	4	3
<i>Sabethes (Sab) sp.</i>	1	1
<i>Trichoprosopon compressum</i>	1	-
<i>Wyeomyia (Pho) fuscipes</i>	1	-
<i>Wyeomyia (Pho) sp.</i>		1
<i>Wyeomyia (Prl) confusa</i>	6	-
<i>Wyeomyia sp.</i>	4	-
<b>Total</b>	<b>142</b>	<b>21</b>

## 5.2 Eficácia do protocolo de sequenciamento por nanoporos quanto aos diferentes estágios de digestão sanguínea

Foram testadas 20 fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue humano e 20 com sangue bovino. Em relação às fêmeas que se alimentaram de sangue humano, 10 testadas estavam em estágio 2 (Figura 13A) de digestão sanguínea e 10 em estágio 4 (Figura 13B). Já as que se alimentaram de sangue bovino, 10 estavam em estágio 6 e 10 em estágio 7 (Figura 13C). O sequenciamento do repasto sanguíneo pela tecnologia de nanoporos foi possível nas fêmeas em



estágios 2, 4 e 6 de digestão sanguínea. Fêmeas em estágio 7 de digestão não tiveram a fonte sanguínea identificada (Tabela 4).

**Figura 13** - Estágios de digestão sanguínea de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue humano ou bovino.



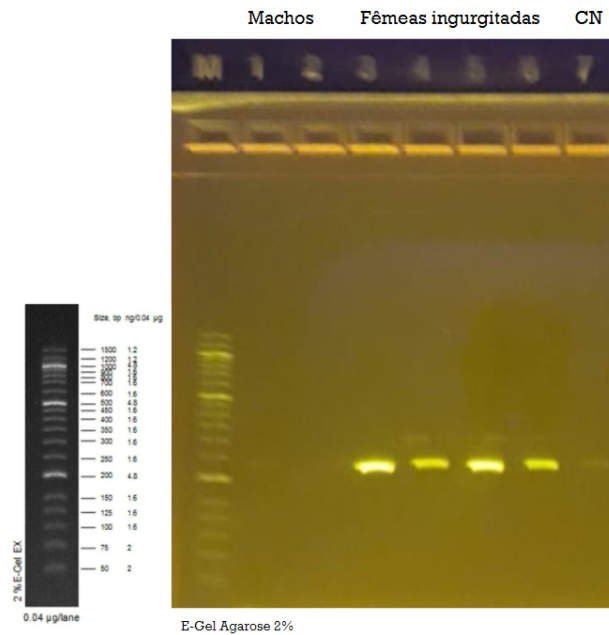
Legenda: Em A = fêmea em estágio 2, com até 6 horas de digestão; B = estágio 6, com até 48h de digestão; C = Estágio 7, com digestão completa do sangue e presença de ovos. Fotos: Esmenia Coelho Rocha, 2021

**Tabela 4** - Amostras de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue humano e bovino, em diferentes níveis de digestão sanguínea, testadas com o sequenciamento por nanoporos.

Amostra	Estágio de digestão (Sella)	Banda no gel de agarose	N amostras	Fonte alimentar testada	N Identificadas	Média N reads sequenciadas	Média Identidade BLAST
Fêmea	2 (6h)	Com banda forte	10	Humano	10 (100%)	128528	99,18%
Fêmea	4 (24h)	Com banda forte	10	Humano	10 (100%)	43357	99,64%
Fêmea	6 (48h)	Com banda	10	Boi	10 (100%)	1681	98,78%
Fêmea	7 (54h)	Sem banda	10	Boi	0	8	0
Macho	n/a	Sem banda	2	n/a	0	6	0

A Figura 14 mostra o resultado das reações de PCR convencional com os fragmentos de 228pb dos produtos com primer de humano nas amostras de mosquitos fêmeas (poços 3, 4, 5 e 6). As fêmeas com digestão de até 6 horas tiveram bandas ligeiramente mais fortes do que as fêmeas com digestão de 24 horas. As amostras em 1 e 2 representam os machos utilizados como controle, sem a observação de bandas.

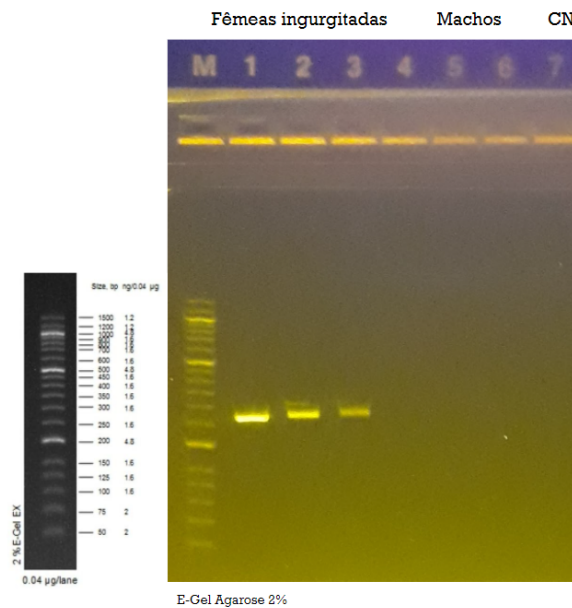
**Figura 14** - Foto de gel de agarose 2% do produto da PCR que amplifica fragmento de gene humano, com 228 pb.



Legenda: Coluna M = marcador de peso molecular; colunas 1-2 = mosquitos machos; 3 e 5 = fêmeas ingurgitadas com até 6 horas de digestão; 4 e 6 = fêmeas ingurgitadas com 24 horas de digestão; 7 = branco. Foto: Esmenia Coelho Rocha, 2021

Fragmentos de 271pb dos produtos da PCR utilizando primer de bovino também foram visualizados nas amostras de mosquitos fêmeas, nos poços 1, 2 e 3 (Figura 15). As fêmeas com digestão de até 6 horas tiveram bandas visivelmente mais fortes do que a fêmea com digestão de 48 horas (Figura 15). No poço 4, está uma fêmea ingurgitada que teve a digestão completa, não obtendo banda. Nos poços 5 e 6 estão os machos como controles negativos, não apresentando bandas (Figura 15). Todas as amostras foram sequenciadas, inclusive as que não apresentaram bandas no gel.

**Figura 15** - Foto de gel de agarose 2% do produto da PCR que amplifica fragmento de gene bovino, com 271pb.



Legenda: Coluna M = marcador de peso molecular; 1 e 2 = fêmeas ingurgitadas com até 6 horas de digestão; 3 = fêmea ingurgitada com 48 horas de digestão; 4 = fêmea com digestão sanguínea completa; 5 e 6 = mosquitos machos; 7 = branco. Foto: Esmenia Coelho Rocha, 2021

### 5.3 Adaptação do protocolo de sequenciamento por nanoporos

Ao avaliarmos as amostras de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* alimentadas em laboratório com sangue humano infectado com Zika vírus, observamos que o sequenciamento único foi capaz de identificar tanto a espécie de mosquito, quanto o hospedeiro vertebrado e o patógeno.

Após mapeamento com o banco de dados de culicídeos, foram gerados relatórios do Minimap com as espécies que tiveram o maior número de *reads* alinhadas com as amostras, no caso *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Os arquivos FASTA também foram analisados no BLAST e todas obtiveram uma identidade maior que 97% com as espécies mencionadas.

Para hospedeiro vertebrado, os relatórios foram gerados a partir do banco de dados de vertebrados e, da mesma forma, as sequências foram analisadas no BLAST, com identidade maior que 96% com *Homo sapiens*.

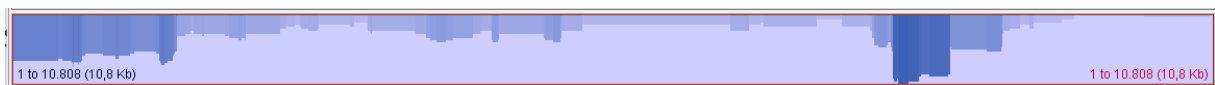
Em relação à identificação de patógenos, o MiniKraken gerou relatórios mostrando o Zika vírus nas amostras testadas. A identidade do BLAST foi maior que

96% (Figura 16) e o mapeamento contra o genoma referência mostrou cobertura de 62% no Tablet (Figura 17).

**Figura 16** - Sequências similares ao Zika vírus identificadas pelo BLAST.

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17sem_2016-04-19_complete_genome	Zika virus	2095	3202	18%	0.0	95.73%	10753	MH882541.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Hsem_2016-06-16_complete_genome	Zika virus	2095	3202	18%	0.0	95.73%	10777	MH882535.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Auri_2016-04-26_complete_genome	Zika virus	2095	3202	18%	0.0	95.73%	10752	MH882528.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Asem_2016-04-26_complete_genome	Zika virus	2095	3202	18%	0.0	95.73%	10753	MH882527.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate ZIKV_P17_A polyprotein (POLY) gene_complete_cds	Zika virus	2095	3202	18%	0.0	95.73%	10639	MW123921.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17uri_2016-04-19_complete_genome	Zika virus	2089	3196	18%	0.0	95.65%	10752	MH882542.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Nsem_2016-07-27_complete_genome	Zika virus	2089	3196	18%	0.0	95.65%	10731	MH882540.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Msem_2016-07-19_complete_genome	Zika virus	2089	3196	18%	0.0	95.65%	10694	MH882539.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Lsem_2016-07-12_complete_genome	Zika virus	2089	3196	18%	0.0	95.65%	10784	MH882538.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Jsem_2016-06-28_complete_genome	Zika virus	2089	3196	18%	0.0	95.65%	10782	MH882536.1
<input checked="" type="checkbox"/> Zika virus isolate Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/ZKV17Gsem_2016-06-08_complete_genome	Zika virus	2089	3196	18%	0.0	95.65%	10753	MH882534.1

**Figura 17** - Cobertura do sequenciamento da amostra de *Ae. aegypti* infectada com Zika vírus contra o genoma de referência visualizado no Tablet.



NCBI Reference Sequence: NC\_035889.1. Tamanho: 10.808 pb (10,8Kb).

#### 5.4 Identificação das fontes sanguíneas durante e após surto no PEAL

No PEAL, foram comparados os repastos sanguíneos do vetor *Hg. leucocelaenus* durante e após a epidemia de YFV. Também foram utilizados os resultados das fontes sanguíneas de *Ae. albopictus* e *Ae. scapularis*, potenciais vetores de YFV. *Hg. janthinomys/capricornii* não teve exemplares ingurgitados no PEAL, assim como espécies de *Sabethes* que atuam como vetores secundários de YFV.

As fêmeas de *Hg. leucocelaenus* se alimentaram de sangue humano durante e após a epidemia, 5 e 14 indivíduos, respectivamente (Tabela 5). Fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas no PEAL foram identificadas com sangue humano apenas no período pós-epidemia. Já *Ae. scapularis* teve sangue humano identificado em 12 fêmeas coletadas durante o surto e 4 fêmeas após. Além disso, 2 espécimes de *Ae. scapularis* apresentaram repastos sanguíneos múltiplos: sabiá e humano, detectado

em um espécime durante a epidemia; e cão e humano, identificado no outro espécime após a epidemia.

**Tabela 5** - Número de culicídeos vetores e potenciais vetores coletados no PEAL durante e após surto de febre amarela, com suas respectivas fontes sanguíneas.

<b>Espécie mosquito</b>	<b>N</b>	<b>Repasto sanguíneo</b>	<b>Período coleta</b>
<i>Haemagogus (Con.) leucocelaenus</i>	5	Humano	Epidemia
<i>Haemagogus (Con.) leucocelaenus</i>	14	Humano	Pós epidemia
<i>Aedes (Stg.) albopictus</i>	7	Humano	Pós epidemia
<i>Aedes (Och.) scapularis</i>	1	Misto: Sabiá-barranco e humano	Epidemia
<i>Aedes (Och.) scapularis</i>	12	Humano	Epidemia
<i>Aedes (Och.) scapularis</i>	4	Humano	Pós epidemia
<i>Aedes (Och.) scapularis</i>	1	Misto: Cão e humano	Pós epidemia

### **5.5 Identificação das fontes sanguíneas nas áreas de estudo na Serra da Cantareira**

Todas as 163 fêmeas com vestígios de sangue foram processadas individualmente, sendo possível a identificação da fonte alimentar de 107 fêmeas (65,6%) (Tabela 6). Entre essas últimas, 54,6% continham sangue de mamífero, 6,7% continham sangue de ave e 4,3% apresentaram repastos sanguíneos mistos.

Entre os mamíferos, o sangue humano teve o maior número de detecção nas fêmeas ingurgitadas, sendo detectado em 82 amostras (50,3%). Também foi identificado material genético de primata-não-humano da espécie *Callicebus nigrifrons*, de cão e de rato-do-mato em duas amostras de mosquito cada, além de uma amostra de mosquito com gambá-de-orelha-preta. Em 9 fêmeas ingurgitadas (5,5%), foram detectadas as seguintes espécies de aves passeriformes: *Conopophaga lineata*, *Pyroderus scutatus*, *Turdus leucomelas*, *Turdus rufiventris*, *Herpsilochmus rufimarginatus*, *Platyrinchus mystaceus*, *Anabacerthia amaurotis*. Entre as aves, sangue de urubu-preto e garça também foram identificados em uma amostra de mosquito cada. Os repastos mistos foram humano e cão em uma amostra, e humano e ave em 6 amostras de mosquitos (3,7%). Não foi encontrado sangue de bugio nas amostras.

*Hg. leucocelaenus* teve uma amostragem de 37 fêmeas com repasto sanguíneo, sendo 35 com sangue humano e 2 com sangue de PNH. Dois espécimes

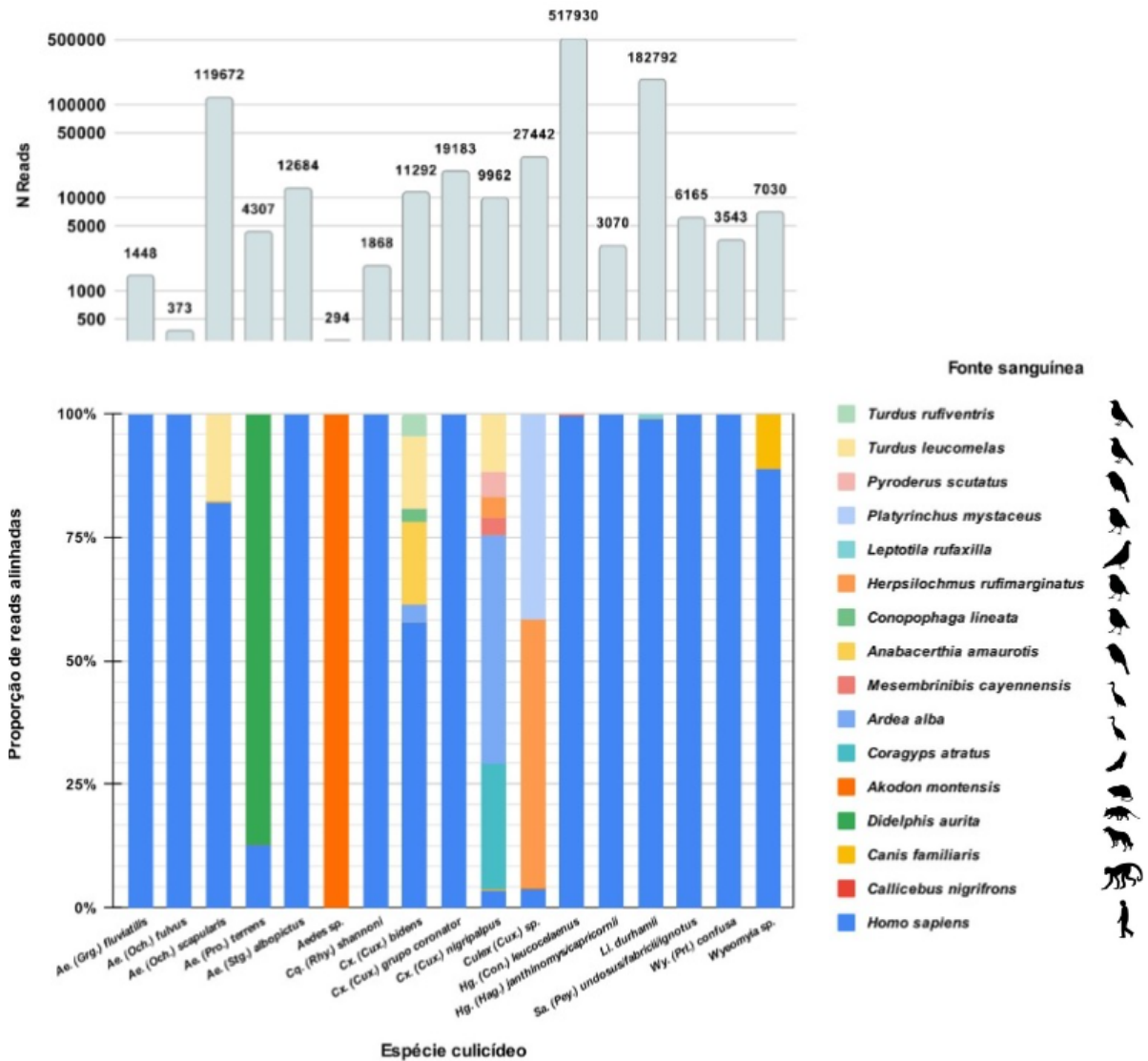
de *Hg. janthinomys/capricornii* se alimentaram apenas de sangue humano. Das 18 amostras de *Ae. scapularis* com conteúdo estomacal identificado, 16 estavam com sangue humano e 2 amostras tinham a combinação humano/cão e humano/ave. As espécies de culicídeos que mais se alimentaram de pássaros pertenciam ao gênero *Culex*.

**Tabela 6** - Quantidade de mosquitos fêmeas e suas respectivas fontes sanguíneas de acordo com a espécie, coletadas na Serra da Cantareira entre dezembro de 2017 e março de 2020.

Espécie culicídeo	Fonte sanguínea																				Positivas	Negativas	Total	Total %			
	Mamíferos (54,6%)								Aves (6,7%)				Mista (4,3%)														
	Humano		Sauá (PNH)		Cão		Gambá-de-orelh-a-preta		Rato-do-mato		Urubu-preto		Pelecaniforme		Passariforme		Humano e cão		Humano e ave								
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%								
<i>Aedes (Grg.) fluviatilis</i>	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25,0	3	75,0	4	100	
<i>Aedes (Och.) fulvus</i>	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100	
<i>Aedes (Och.) scapularis</i>	16	88,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,6	1	5,6	18	66,7	9	33,3	27	100
<i>Aedes (Pro.) terrens</i>	1	50,0	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100,0	-	-	2	100	
<i>Aedes (Stg.) aegypti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Aedes (Stg.) albopictus</i>	7	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	70,0	3	30,0	10	100	
<i>Aedes spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	50,0	1	50,0	2	100	
<i>Coquillettidia (Rhy.) shannoni</i>	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100	
<i>Culex (Cux.) bidens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	80,0	-	-	1	20,0	5	71,4	2	28,6	7	100		
<i>Culex (Cux.) grupo coronator</i>	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1	100	
<i>Culex (Cux.) nigripalpus</i>	-	-	-	-	1	11,1	-	-	-	-	1	11,1	1	11,1	4	44,4	-	-	2	22,2	9	52,9	8	47,1	17	100	
<i>Culex (Cux.) spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	33,3	-	-	-	-	1	33,3	-	-	1	33,3	3	100,0	-	-	3	100		
<i>Culex (Mel.) sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Culex sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Haemagogus (Con.) leucocelaenus</i>	35	94,6	2	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37	90,2	4	9,8	41	100	
<i>Haemagogus (Hag.) janthinomys/capricornii</i>	2	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	66,7	1	33,3	3	100	
<i>Li. durhamii</i>	12	92,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7,7	13	86,7	2	13,3	15	100		
<i>Mansonia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Psorophora (Jan.) ferox</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Sabethes (Pey.) undosus/fabricii/ignotus</i>	2	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100,0	-	-	2	100	
<i>Sabethes (Sab.) purpureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	100,0	7	100	
<i>Sabethes (Sab.) spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100,0	2	100	
<i>Trichoprosopon compressum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Wyeomyia (Pho.) fuscipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Wyeomyia (Pho.) sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1	100	
<i>Wyeomyia (Pri.) confusa</i>	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16,7	5	83,3	6	100	
<i>Wyeomyia spp.</i>	2	66,7	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	75,0	1	25,0	4	100	
Total	82	50,3	2	1,2	2	1,2	1	0,6	2	1,2	1	0,6	1	0,6	9	5,5	1	0,6	6	3,7	107	65,6	56	34,4	163	100	

Na Figura 18, é apresentada a proporção das *reads* geradas no sequenciamento e alinhadas com cada fonte sanguínea, além do número total de *reads* para cada espécie de mosquito. As espécies *Hg. leucocelaenus*, *Li. durhamii* e *Ae. scapularis* que estavam entre as espécies com maior número de amostras coletadas, também tiveram os maiores números de DNA mitocondrial sequenciado.

**Figura 18** - Número de *reads* de COI e *Cyt b* por espécie de mosquito e proporção por fonte sanguínea.



N reads em escala logarítmica para melhor visualização.

Tanto a quantidade quanto a variedade de espécies de hospedeiros vertebrados foi maior em fêmeas ingurgitadas coletadas a nível do solo, quando comparado à copa (Tabela 7). Entretanto, o esforço de coleta não foi o mesmo para os dois diferentes estratos. No solo foram coletadas fêmeas alimentadas de humano, macaco, gambá, roedor e aves. Todas as fêmeas com múltiplos repastos foram coletadas a nível de solo. Já na copa, foi encontrado repasto sanguíneo de humano, de PNH da espécie *Callicebus nigrifrons*, conhecida como sauá e também espécie de rato-do-mato (*Akodon montensis*).

**Tabela 7** - Quantidade de repastos sanguíneos de acordo com espécie e estrato.

	Repasto sanguíneo	N solo*	%	N copa*	%
<b>Mamíferos</b>	<i>Homo sapiens</i> (humano)	70	75,27	12	85,71
	<i>Callicebus nigrifrons</i> (sauá - PNH)	1	1,08	1	7,14
	<i>Canis lupus familiaris</i> (cão)	2	2,15	-	-
	<i>Didelphis aurita</i> (gambá)	1	1,08	-	-
	<i>Akodon montensis</i> (rato-do-mato)	1	1,08	1	7,14
<b>Aves</b>	<i>Coragyps atratus</i> (Urubu-preto)	1	1,08	-	-
	<i>Mesembrinibis cayennensis</i> (Ave pelecaniforme)	1	1,08	-	-
	<i>Herpsilochmus rufimarginatus</i> (Ave passeriforme)	1	1,08	-	-
	<i>Conopophaga lineata</i> (Ave passeriforme)	1	1,08	-	-
	<i>Anabacerthia amaurotis</i> (Ave passeriforme)	1	1,08	-	-
	<i>Platyrinchus mystaceus</i> (Ave passeriforme)	1	1,08	-	-
	<i>Pyroderus scutatus</i> (Ave passeriforme)	2	2,15	-	-
	<i>Turdus rufiventris</i> (sabiá)	1	1,08	-	-
	<i>Turdus leucomelas</i> (sabiá-barranco)	2	2,15	-	-
<b>Misto</b>	<i>Canis lupus familiaris</i> e <i>Homo sapiens</i>	1	1,08	-	-
	<i>Herpsilochmus rufimarginatus</i> e <i>Homo sapiens</i>	1	1,08	-	-
	<i>Leptotila rufaxilla</i> (Ave columbiforme) e <i>Homo sapiens</i>	1	1,08	-	-
	<i>Ardea alba</i> (garça) e <i>Homo sapiens</i>	2	2,15	-	-
	<i>Turdus leucomelas</i> e <i>Homo sapiens</i>	1	1,08	-	-
	<i>Coragyps atratus</i> e <i>Homo sapiens</i>	1	1,08	-	-
	<b>Total</b>	93	100,00	14	100,00

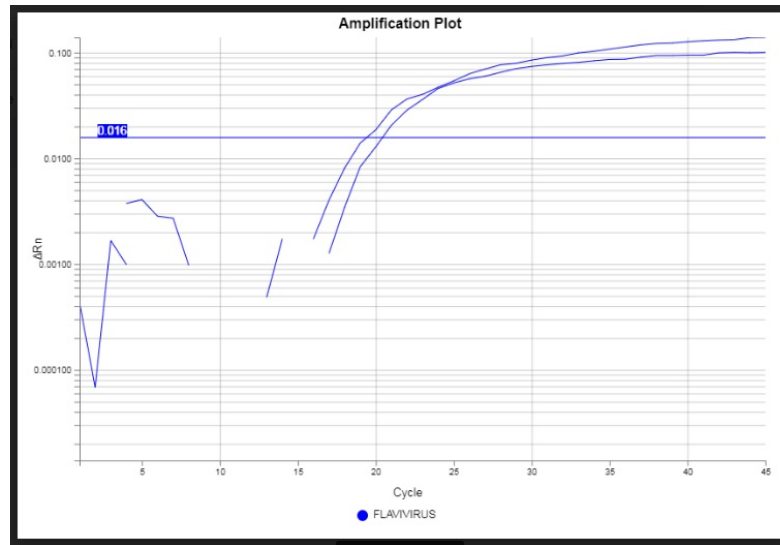
Legenda: \* = Excluído do N as ingurgitadas sem identificação de fonte sanguínea no sequenciamento (negativas).

## 5.6 Detecção de vírus amarelo nas áreas de estudo

Das 163 amostras processadas, uma fêmea de *Hg. leucocelaenus* estava infectada com o vírus da febre amarela, confirmada por RT-qPCR com *primer* de *Flavivirus* (Ct = 20) (Figura 19). Essa fêmea estava ingurgitada com sangue humano. Foi possível sequenciar o genoma completo do vírus a partir da amostra do abdômen da fêmea. A cabeça e o tórax do mosquito também foram testados e confirmados com a infecção por YFV, porém não tiveram carga viral suficiente para o sequenciamento genético. Essa fêmea foi coletada no PEAL, em 11 de janeiro de 2018, com a técnica do puçá, no nível de solo. No segundo período, após desaparecimento dos bugios, não foram encontradas amostras infectadas.



**Figura 19** - Curva de amplificação de flavivírus em amostra de fêmea de *Hg. leucocelaenus* ingurgitada, confirmando a presença do vírus da febre amarela.



Na figura 20, os valores destacados referem-se ao YFV identificado, em que 0,46 = proporção das reads de YFV em relação ao total das reads da amostra, 1443 = número total de reads atribuídas à YFV, S = (species) identificada à nível de espécie e 11089 = número de identificação da sequência de referência.

**Figura 20** - Identificação pelo MiniKraken (à esquerda) e pelo BLAST (à direita) do vírus da febre amarela a partir da amostra do abdômen da fêmea de *Hg. leucocelaenus* ingurgitada.

Count	Reads	Species	Identified	Species	Count	Reads	Species
1.78	5517	0	G1	342187	unclassified Betabacteriovirus		
1.78	5517	5517	S	364745	Christoneura occidentalis granulovirus		
0.02	68	0	0	28883	Caudovirales		
0.02	68	0	F	186899	Siphoviridae		
0.02	68	0	F1	186894	unclassified Siphoviridae		
0.02	68	68	S	12348	Lactobacillus phage LL-H		
0.00	1	0	F	10248	Poxviridae		
0.00	1	0	F1	10241	Chordopoxvirinae		
0.00	1	0	G	10242	Orthopoxvirus		
0.60	1	1	S	168796	Skunkpox virus		
0.67	2084	0	D1	439480	ssRNA viruses		
0.49	1515	0	D2	35278	ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage		
0.49	1515	0	F	11858	Flaviviridae		
0.49	1515	25	G	11051	Flavivirus		
0.46	1443	1443	S	11033	Yellow fever virus		
0.01	46	46	S	64290	Baiguia virus		
0.00	1	1	S	95563	Iliheus virus		
0.18	548	0	D2	35301	ssRNA negative-strand viruses		
0.18	548	0	0	1980410	Bunyavirales		
0.18	548	0	F	1980410	Phenuiviridae		
0.18	548	0	G	1980421	Phasivirus		
0.18	548	548	S	1980610	Phasi Charoen-like phasivirus		
0.01	21	0	0	11157	Mononegavirales		
0.01	21	0	F	11270	Rhabdoviridae		
0.01	21	0	G	11271	Vesiculovirus		
0.01	21	0	S	1972575	Pfiry vesiculovirus		
0.01	21	21	S1	11274	Pfiry virus		

Sequences producing significant alignments									
	Description	Scientific Name	Max. Score	Total Score	Query Cover	E Value	Pr. Ident	Acc. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus strain AFR1005, complete genome	Yellow fever virus	18423	18423	99%	0.0	99.70%	11007	MK322799.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus isolate YFV0303FG, complete genome	Yellow fever virus	18419	18419	99%	0.0	99.71%	10546	MK581147.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus isolate YFV0303FG, complete genome	Yellow fever virus	18417	18417	99%	0.0	99.69%	10788	MK702685.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus strain YFV_1446412_14418_41, complete genome	Yellow fever virus	18417	18417	99%	0.0	99.69%	10849	MK702680.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus strain AFR1005, complete genome	Yellow fever virus	18417	18417	99%	0.0	99.69%	11007	MK322799.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus isolate YFV0303FG, complete genome	Yellow fever virus	18415	18415	99%	0.0	99.71%	10592	MK581151.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus isolate YFV0303FG, complete genome	Yellow fever virus	18414	18414	99%	0.0	99.71%	10592	MK581150.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus isolate YFV0303FG, complete genome	Yellow fever virus	18412	18412	99%	0.0	99.71%	10547	MK581147.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus isolate YFV0303FG, complete genome	Yellow fever virus	18412	18412	99%	0.0	99.72%	10546	MK581149.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus isolate YFV0303FG, complete genome	Yellow fever virus	18412	18412	99%	0.0	99.72%	10544	MK581143.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus strain YFV_1446412_14418_41, complete genome	Yellow fever virus	18412	18412	99%	0.0	99.70%	10995	MK702681.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Yellow fever virus strain YFV_1446412_14418_41, complete genome	Yellow fever virus	18412	18412	99%	0.0	99.68%	10884	MK702682.1

## 6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, realizamos a identificação de mosquitos coletados em três áreas da Serra da Cantareira, selecionando as fêmeas ingurgitadas para determinar as fontes sanguíneas e a presença do vírus da febre amarela. Para isso, adaptamos um protocolo para detecção da espécie de mosquito, da espécie de vertebrado e de arbovírus em uma única biblioteca de sequenciamento por nanoporos.

Apesar do extenso período de coletas entomológicas e mais de 5 mil fêmeas coletadas, houve um número reduzido de espécimes com vestígios no abdômen. Isso pode ser explicado pelo conjunto de técnicas utilizadas. A aspiração humana móvel por puçá foi responsável pelo maior número de exemplares e costuma atrair fêmeas à procura de alimentação sanguínea. Por essa razão, foi importante adicionar aspirações por Nasci, técnica eficaz para coleta de fêmeas ingurgitadas (62). As fêmeas alimentadas tendem a ficar em repouso e por isso não são muito coletadas pelo puçá (63). Trabalho realizado por Mucci e colaboradores (63), utilizando a técnica de aspiração humana móvel com puçá, encontrou 1,4% de fêmeas ingurgitadas em relação ao total de coletadas. Aqui, associando três técnicas de coleta entomológica, tivemos 3,3% de fêmeas ingurgitadas em relação ao total de fêmeas, sendo possível a amostragem de fonte alimentar de 29% do total de espécies coletadas.

As espécies com o maior número de amostras coletadas foram espécies que habitam ambientes silvestres, como as dos gêneros *Limatus*, *Haemagogus*, *Sabethes*, *Wyeomyia* e *Trichoprosopon*. Ainda que em número reduzido, também coletamos a espécie *Ae. aegypti*, frequentemente associada a ambientes urbanos (64, 65). Isso pode estar relacionado ao fato de a área estudada ser inserida na RMSP e ter contato com os limites das áreas urbanas (34). As espécies de mosquitos vetores da FA, *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys/capricornii*, além dos potenciais vetores, *Ae. albopictus* e *Ae. scapularis*, e espécies do gênero *Sabethes*, que podem atuar como vetores secundários, também foram coletados em nosso estudo. *Ae. albopictus* e *Ae. scapularis* merecem atenção por serem encontradas em áreas de transição, entre áreas preservadas e mais urbanizadas (66). *Ae. albopictus* já teve a competência vetorial comprovada para o YFV em condições de laboratório (13, 67) e *Ae. scapularis* já foi encontrado naturalmente infectado com o mesmo vírus (9, 68).

Estudo recente de Telles de Deus e colaboradores (69) encontrou diversidade semelhante à nossa, com coletas também em áreas da Serra da Cantareira, onde as espécies mais frequentes foram *Wy. confusa*, *Li. durhamii*, *Sa. albiprivus*, *Sa. purpureus* e *Hg. leucocelaenus*. Em atualização sobre a fauna de mosquitos do PEC, publicada em 2020, as espécies mais frequentes foram *Wy. confusa*, *Li. durhamii*, *Culex (Carrollia) iridescens*, *Culex (Melanoconion) vaxus* e *Culex (Culex) dolosus* (70). O estudo fez coletas mensais de 2015 a 2017 e utilizou técnicas para coletas de mosquitos adultos e formas imaturas. Tubaki e colaboradores (71) realizaram coletas de formas imaturas em ocos de árvores do PEC e encontraram alta frequência de *Hg. leucocelaenus*, *Culex (Culex) dolosus*, *Aedes argyrothorax* e *Aedes terrens*.

As coletas entomológicas foram realizadas em período compatível com hábitos diurnos dos vetores de febre amarela. Apesar disso, houve uma boa representatividade de *Culex*, mas não de *Mansonia* ou *Anopheles*, de hábitos noturnos (2). As técnicas de coleta entomológica e os estratos florestais foram complementares, visando aumentar a chance de captura de culicídeos de hábitos acrodendrófilos. Telles de Deus e colaboradores (69) concluíram que as coletas na copa das árvores do bioma Mata Atlântica apresentam maior riqueza de mosquitos diurnos de importância médica, como os dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, quando comparadas com as realizadas em solo.

A maior quantidade de fêmeas ingurgitadas foi obtida no PEAL, onde foi possível realizar coletas entomológicas consecutivas durante o período de maior mortalidade dos primatas não humanos, devido ao surto de febre amarela.

Em nosso estudo, o MinION foi utilizado pela primeira vez na detecção de fontes alimentares em diferentes estágios de digestão sanguínea. Entender em quais fases de digestão sanguínea é possível identificar a fonte alimentar pelo sequenciamento por nanoporos foi essencial para direcionar as investigações realizadas com os mosquitos coletados em campo.

Pelo sequenciamento, foi possível identificar as fontes sanguíneas de fêmeas com digestão de até 48 horas (estágio 6 de Sella), apesar de as fêmeas com sangue fresco terem gerado significativamente maior número de *reads*. No entanto, o menor número de *reads* em fêmeas com sangue digerido não interferiu na identificação do repasto sanguíneo e na percentagem da identidade com os hospedeiros. O baixo número de *reads* nas fêmeas grávidas (estágio 7), assim como nos controles

negativos, não foi suficiente para que os programas realizassem a identificação das fontes sanguíneas. Apesar disso, em nosso estudo, o sequenciamento mostrou sensibilidade para um estágio a mais de digestão sanguínea da escala Sella, se comparada com trabalho semelhante de Mukabana e colaboradores (72). Os autores avaliaram a diferença na amplificação da PCR de DNA humano em *Anopheles gambiae* alimentado artificialmente com diferentes estágios de digestão, e conseguiram identificar com sucesso fêmeas com até 32h de digestão após o repasto.

Na pesquisa que conduzimos, utilizamos mais de um alvo mitocondrial. O objetivo foi disponibilizar o maior número de sequências de diferentes espécies em nosso banco de dados para comparação com as sequências encontradas em nossas amostras, conferindo maior especificidade aos resultados. Foi fundamental empregar *primers* mitocondriais de vertebrados para a identificação dos hospedeiros, uma vez que o protocolo SMART-9N foi desenvolvido originalmente apenas para identificação de vírus de RNA. Adicionado a isso, um sequenciamento ou PCR de fontes sanguíneas não trariam resultados sobre infecção viral, necessitando uma abordagem à parte, como RT-qPCR.

O MinION se mostrou eficaz na detecção de vírus como Ebola (73, 74), dengue (75), Zika (76), febre amarela (77), influenza (78, 79), vírus flock House (80) e varíola bovina (81). No entanto, ainda há poucos estudos sobre fontes sanguíneas de insetos hematófagos com essa geração de sequenciadores. Martínez e colaboradores (82) utilizaram o MinION para a detecção de fontes alimentares de culicídeos coletados na Colômbia (*Aedes serratus*, *Wy. abebela*, *Psorophora albipes*, *Culex eknomios*, *Psorophora ferox* e *Culex browni*). Embora o alvo de sequenciamento de Martínez e colaboradores (82) (12S rRNA) tenha sido diferente do nosso, o MinION se mostrou eficaz em identificar mamíferos, aves e uma espécie de réptil como fontes sanguíneas dos mosquitos estudados.

Recentemente, Kipp e colaboradores (83) usaram o Nanopore Adaptive Sampling (NAS) para identificação de fontes sanguíneas. Apesar do número reduzido de amostras, os autores obtiveram sucesso na identificação de três das cinco amostras testadas (*Aedes vexans*, *Culex restuans*, *Aedes trivittatus*, *Culex territans* e *Chrysops niger*). Foram detectados sangue de coelho (*Sylvilagus floridanus*) e pássaro (*Passer domesticus*).

O NAS consiste numa pipeline seletiva de bioinformática, que possibilita o enriquecimento do sequenciamento de genomas referências, como o genoma mitocondrial dos hospedeiros vertebrados utilizado no trabalho supracitado. O NAS, de acordo com o protocolo desenvolvido pela ONT (84), visa o enriquecimento ou depleção de uma única referência genômica. Em nosso estudo, buscamos o sequenciamento único de três alvos, e, desta forma, o NAS não seria apropriado pois potencialmente inibiria a identificação de um dos três alvos.

Técnicas baseadas em hospedeiros específicos para a identificação de fontes alimentares foram utilizadas por Carvalho e colaboradores (24), que fizeram uso de PCR com primers específicos, e Lorosa e colaboradores (85), com anti-soros específicos pela técnica de precipitina. Essas técnicas podem limitar as chances de identificação de uma maior variedade de espécies, necessitando de uma reação diferente para cada hospedeiro. Para a identificação molecular de uma maior variedade de espécies de hospedeiros vertebrados, utilizamos o sequenciamento de DNA barcode, com regiões conservadas mas com diferenças suficientes para identificação taxonômica (86). Somado a isso, com o protocolo aqui adaptado, foi possível realizar a identificação da espécie vetora e de arbovírus no mesmo sequenciamento.

As identificações moleculares e morfológicas de culicídeos se complementam, uma vez que ambas apresentam limitações. Na técnica molecular, frequentemente observamos uma lacuna em bancos de dados de sequências de espécies. Por outro lado, na identificação taxonômica baseada em caracteres morfológicos, a preservação do material é fundamental. É importante ressaltar que nas amostras de campo, dependendo da técnica de coleta e forma de conservação do material, pode haver espécimes com estruturas danificadas, o que, conseqüentemente, pode dificultar ou mesmo impossibilitar a identificação até o nível de espécie. Podemos citar estudo feito por Kirchgatter e colaboradores (87), que associaram a identificação morfológica com DNA Barcoding para espécies morfológicamente similares do gênero *Mansonia*. Os autores também sequenciaram região de barcode do gene COI e concluíram que os mesmos grupos de culicídeos identificados molecularmente foram formados pela taxonomia morfológica, mostrando que a técnica é útil para superar os desafios da taxonomia clássica e para tornar os resultados mais consistentes. Quanto aos hospedeiros vertebrados, a maior parte das sequências nos bancos de dados são referentes a genes mitocondriais,

dificultando uma análise apenas por metagenômica, que necessitaria de sequências completas dos genomas de diversas espécies.

O protocolo adaptado aqui pode ser empregado para identificação rápida e para obter respostas sobre circulação viral. Com ele, foi possível a detecção viral nos mosquitos, no entanto, não foram gerados genomas completos do Zika vírus nas amostras que foram infectadas artificialmente. As sequências geradas do vírus são relativamente baixas se comparadas com o sequenciamento do genoma dos hospedeiros (tanto vetor quanto vertebrado). Para uma análise completa do genoma viral podem ser utilizadas técnicas já validadas para tal, como PCR Multiplex e metagenômica (50).

Com o objetivo de compararmos o comportamento alimentar de espécies vetores e potencialmente vetores do vírus da febre amarela durante e após o pico epidêmico da doença no PEAL, analisamos individualmente as fêmeas ingurgitadas coletadas na área durante o período de alta mortalidade de bugios e o período após o desaparecimento desses grupos. Durante o surto de febre amarela, a única fonte alimentar identificada no abdômen das fêmeas coletadas foi de hospedeiro humano. A ausência da detecção de sangue de bugio nas fêmeas durante o período em que ainda havia grupos destes PNHs no PEAL pode ser explicada pelo fato de termos realizado as coletas exclusivamente em solo naquele período. A coleta na copa das árvores, onde os vetores *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys/capricornii* costumam estar presentes (88, 89, 90), só foi realizada no período seguinte do pico da epidemia por questões operacionais.

No período pós-epidemia, notou-se que a maior parte do conteúdo sanguíneo presente no abdômen das fêmeas coletadas também era de humanos. Contudo, é importante destacar que o conteúdo do abdômen das fêmeas ingurgitadas não se mostravam com coloração vermelha intensa, o que sugere que é pouco provável que elas tenham se alimentado dos próprios coletores. Vale ressaltar que a equipe de coleta estava completamente protegida, com vestimentas adequadas e vacinados contra YFV. De toda forma, a técnica empregada nas plataformas nas copas de árvores (puçá) ainda envolvia a atração de fêmeas à procura de repastos sanguíneos, o que restringiu o número de ingurgitadas coletadas nas copas das árvores. Embora o comportamento alimentar dos vetores na área não tenha demonstrado diferenças após o surto, destaca-se a alta antropofilia observada.

Em outros locais de coleta da Serra da Cantareira, a antropofilia também foi observada. *Hg. janthinomys/capricornii* se alimentou exclusivamente de humano, enquanto *Hg. leucocelaenus* se alimentou de seres humanos e PNH da espécie *Callicebus nigrifrons* (sauá). Essa espécie de PNH já foi encontrada infectada por YFV com proporção e CTs semelhantes aos das carcaças infectadas de PNHs do gênero *Alouatta* (91). Alencar e colaboradores (92) analisaram fontes hematofágicas de fêmeas de *Hg. janthinomys* em diferentes estados do Brasil e os dados demonstraram um comportamento oportunista e eclético desses mosquitos em relação à alimentação, alternando entre hospedeiros silvestres e domésticos de acordo com a disponibilidade. *Hg. capricornii*, similarmente, parece se alimentar de diversos animais, com alta detecção para aves (93), apesar de já ter sido descrita uma afinidade pelo sangue humano (94), assim como *Hg. leucocelaenus* (94). A proximidade de alguns dos nossos pontos de coleta com moradias e também o fato de o parque ser frequentado pela população humana podem ter influenciado o comportamento oportunista dessas espécies.

Em relação aos potenciais vetores de YFV, como *Ae. albopictus*, a antropofilia já foi observada em alta proporção em mosquitos silvestres de diferentes regiões do mundo (95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102). Isso foi corroborado em nosso estudo, no qual as fêmeas dessa espécie, coletadas na Serra da Cantareira, se alimentaram exclusivamente de sangue humano. Quanto às fêmeas de *Ae. scapularis*, já foram encontradas com repastos múltiplos por Mucci e colaboradores (63), assim como foi observado no presente trabalho. Alimentação sanguínea mista realizada por fêmeas de mosquitos pode indicar discordância gonotrófica, como já demonstrado em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (103). Um estudo em parques da cidade de São Paulo observou o comportamento com padrão aleatório em *Aedes crinifer*, *Ae. albopictus*, *Ae. fluviatilis*, *Ae. scapularis*, *Ae. serratus*, *Coquillettidia venezuelensis* e *Ps. ferox*, sem tendências de seleção de hospedeiros. O sangue humano, no entanto, esteve presente em todas as alimentações mistas e foi a principal fonte sanguínea (24).

*Culex nigripalpus* e *Culex quinquefasciatus* demonstraram afinidades alimentares pelos sangues de aves e cães, respectivamente (24). Em nosso estudo, espécies do gênero *Culex* apresentaram comportamento alimentar de múltiplas fontes, com uma tendência à fonte sanguínea de diversos pássaros. A discordância gonotrófica já foi reportada para a espécie do mesmo gênero, *Cx. quinquefasciatus* (104).

Outras espécies que identificamos com presença de sangue humano em seus abdomens foram *Limatus durhamii*, *Wyeomyia confusa* e *Coquillettidia shannoni*. Um exemplar de *Li. durhamii* estava com sangue misto de humano e ave. Apesar de não ser atualmente considerada uma espécie importante para saúde pública, já foi apontada por ser a espécie da tribo Sabethini mais provável a domiciliação (1). Mais estudos são necessários sobre essas espécies, uma vez que podem também apresentar um comportamento oportunista.

Não observamos especificidades nos comportamento sanguíneo das espécies coletadas. A discordância gonotrófica em mosquitos aumenta as chances de contato do vetor com o hospedeiro, favorecendo a transmissão de patógenos que o inseto pode albergar (104, 105). Além disso, o perfil alimentar oportunista dos mosquitos hematófagos pode significar mudanças na dinâmica de transmissão de arbovírus (24), favorecendo a transmissão ao homem, já que outros animais podem servir como ponte de patógenos que circulam em ambientes rurais e silvestres.

Em nossa pesquisa, também detectamos uma fêmea de *Hg. leucocelaenus* infectada com o vírus da febre amarela. Além de ter sido detectado no abdômen, o vírus também foi encontrado na cabeça, indicando uma infecção prévia à alimentação sanguínea mais recente.

Estudo anterior coletou mosquitos entre maio de 2015 e maio de 2018 em 44 municípios de 5 estados brasileiros (Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Bahia) e indicou *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* como os principais mosquitos vetores na região (9). Além de terem detectado vírus da febre amarela em pools de *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* também detectaram esse patógeno nas espécies *Sa. chloropterus*, *Ae. scapularis* e *Ae. taeniorhynchus*, mas sugerem um papel secundário desses mosquitos no ciclo de transmissão do vírus (9). Sete espécies de mosquitos coletados em 2017, em diferentes áreas do estado do Espírito Santo, foram encontradas naturalmente infectadas com YFV, dentre elas *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys/capricornii* e *Sa. chloropterus* (90). O vírus amarelo também foi encontrado em fêmeas de *Sa. chloropterus* e *Sa. albiprivus* no estado de Minas Gerais, em coletas realizadas em 2021 (106).

Em nossa pesquisa, a constatação de que *Hg. leucocelaenus* foi a segunda espécie mais abundante e o achado de uma fêmea infectada com YFV, reforça a hipótese sobre o papel de *Hg. leucocelaenus* no ciclo silvestre da doença. Apesar de *Hg. janthinomys/capricornii* não ter sido encontrado infectado em nosso estudo, não



significa que a espécie não tenha desempenhado papel importante no surto na região. Dado seu comportamento acrodendrófilo, é fundamental a coleta voltada para a copa das árvores para uma avaliação mais precisa.

Após o período de desaparecimento de bugios, não foram encontradas em nosso estudo fêmeas infectadas, o que sugere que o ciclo da febre amarela foi interrompido com a morte dos primatas não humanos.

No presente estudo, buscamos respostas para lacunas do conhecimento sobre o cenário impactante do surto de febre amarela na Serra da Cantareira. Foi um momento oportuno para conduzir esta pesquisa abrangente sobre os mosquitos da região, incluindo identificação de espécies importantes, hábitos alimentares e a investigação da circulação viral. Isso levou à adaptação do protocolo descrito aqui, com o uso eficaz do sequenciamento por nanoporos, de uma maneira prática e viável para poder ser reproduzido em laboratórios que não possuem grandes estruturas de sequenciamento, assim como para auxiliar novos estudos sobre arboviroses.

## 7 CONCLUSÃO

- Identificamos a presença de vetores do vírus da febre amarela na Serra da Cantareira como *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys/capricornii*;
- O sequenciamento por nanoporos se mostrou eficaz em identificar repastos sanguíneos com até dois dias de digestão em fêmeas de culicídeos;
- O sequenciamento por nanoporos pode ser utilizado para avaliação do comportamento hematofágico de culicídeos, confirmação da espécie vetora e identificação de vírus em uma única biblioteca, o que tem potencial de contribuir com pesquisas sobre a dinâmica de transmissão de arboviroses;
- O comportamento alimentar de vetores da febre amarela no PEAL não demonstrou diferenças após o surto, no entanto foi possível observar tendência à antropofilia;
- As espécies de culicídeos coletadas na Serra da Cantareira apresentaram comportamento alimentar oportunista, o que pode acarretar em mudanças nas dinâmicas de transmissão de arboviroses;
- Os resultados confirmam a circulação do vírus na região estudada e o papel de *Hg. leucocelaenus* como importante vetor na região.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Forattini, O.P. Culicidologia Médica. São Paulo: Edusp, vol. 2, 2002.
2. Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
3. Litvoc M.N., Novaes C.T.G., Lopes M.I.B.F. Yellow Fever. Rev Assoc Med Bras 2018; 64(2):106-113.
4. Vasconcelos, P.F.; Costa, Z.G.; Travassos Da Rosa, E.S.; Luna, E.; Rodrigues, S.G.; Barros, V.L.; Dias, J.P.; Monteiro, H.A.; Oliva, O.F.; Vasconcelos, H.B.; Oliveira, R.C.; Sousa, M.R.; Barbosa Da Silva, J.; Cruz, A.C.; Martins, E.C.; Travassos Da Rosa, J.F. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. J Med Virol. v. 65, n. 3, p. 598-604. 2001.
5. Mondet, B.; Vasconcelos, P.F.C.; Travassos Da Rosa, A.P.A.; Travassos Da Rosa, E.S.; Rodrigues, S.G.; Travassos Da Rosa, J.F.S.; Bicout, D.J. Isolation of yellow fever virus from nulliparous *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* in Eastern Amazonia. Vector Borne and Zoonotic Diseases. v. 2, p. 47-50. 2002.
6. Vasconcelos, P.F.C.; Sperb, A.F.; Monteiro, H.A.O.; Torres, M.A.N.; Souza, M.R.S.; Vasconcelos, H.B. et al. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. v. 97, p. 60-2. 2003.
7. Cardoso, J.C.; Almeida, M.A.B.; Santos, E.; Fonseca, D.F.; Sallum, M.A.M.; Noll, C.A.; Monteiro, H.A.O.; Cruz, A.C.R.; Carvalho, V.L.; Pinto, E.V.; Castro, F.C.; Nunes Neto, J.P.N.; Segura, M.N.O.; Vasconcelos, P.F.C. Yellow Fever Virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* Mosquitoes, Southern Brazil, 2008. Emerging Infectious Diseases. v. 16, n. 12, p. 1918-24. 2010.
8. Souza, RP; Petrella, S; Coimbra, TLM; Maeda, AY; Rocco, IM; Bisordi, I; Silveira, VR; Pereira, LE; Suzuki, A; Silva, SJS; Silva, FG; Salvador, FS; Tubaki, RM; Menezes, RT; Pereira, M; Bergo, ES; Hoffmann, RC; Spinola, RMF; Tengan, CH; Siciliano, MM. Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Diptera, Culicidae) in São Paulo State, Brazil, 2009. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. v. 53, n. 3, p. 133-9. 2011.
9. Abreu, FVS; Ribeiro, IP; Ferreira-de-Brito, A; Santos, AAC; Miranda, RM; Bonelly, IS; Neves, MSAS; Bersot, MI; Santos, TP; Gomes, MQ; Silva, JL; Romano, APM; Carvalho, RG; Said, RFC; Ribeiro, MS; Laperrière, RC; Fonseca, EOL; Falqueto, A; Paupy, C; Failloux, AB; Moutailler, S; Castro, MG; Gómez, MM; Motta, MA; Bonaldo, MC and Lourenço-de-Oliveira R. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. Emerg. Microbes Infect. v.8, p.218-231. 2019.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

10. Vasconcelos, P.F.C.; Rodrigues, S.G.; Dégallier, N.; Moraes, M.A.P.; Rosa, J.F.S.T.; Mondet, B. et al. Ann epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: epidemiologic and entomological findings. *Am J Trop Med Hyg.* v. 57, n. 2, p. 132-7. 1997.
11. Goenaga, S.; Fabbri, C.; Dueñas, J.C.; Gardenal, C.N.; Rossi, G.C.; Calderon, G.; Morales, M.A.; Garcia, J.B.; Enria, D.A.; Levis, S. Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones province, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis.* v. 12, n. 11, p. 986-93. 2012.
12. Moreno, E.S.; Rocco, I.M.; Bergo, E.S.; Brasil, R.A.; Siciliano, M. M.; Suzuki, A.; Silveira, V. R.; Bisordi, I.; Souza, R.P. Reemergência de febre amarela: detecção de transmissão no Estado de São Paulo, Brasil, 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 44, n. 3, p. 290-6. 2011.
13. Couto-lima, D.; Madec, Y.; Bersot, M.I.; Campos, S.S.; Motta, M.A.; Santos, F.B.D.; Vazeille, M.; Vasconcelos, P.F.D.C.; Lourenço-de-oliveira, R.; Failloux, A.B. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep.* v. 7, n. 1, p. 4848. 2017.
14. Davis, N.C.; Shannon, R.C. Studies on Yellow Fever in South America: Attempts to transmit the vírus with certain Aedini and Sabethine Mosquitoes and with Triatomas (Hemiptera). *The Am J Trop Med and Hyg.* v. s1-11, Issue 1, p. 21-9. 1931.
15. Davis, N.C.; Shannon, R.C. Studies on Yellow Fever in South America: V. Transmission experiments with certain species of *Culex* and *Aedes*. *J Exp Med.* v. 50, n. 6, p. 803-8. 1929.
16. Thoisy, B.; Dussart, P.; Kazanji, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 98, p. 409-12. 2004.
17. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. p. 309-10
18. Mascheretti, M.; Tengan, C.H.; Sato, H.K.; Suzuki, A.; Souza, R.P.; Naeda, M.; Brasil, R.; Pereira, M.; Tubaki, R.M.; Wanderley, T.M.V.; Fortaleza, C.M.C.B.; Ribeiro, A.F. Febre amarela silvestre: reemergência de transmissão no estado de São Paulo, Brasil, 2009. *Revista de Saúde Pública.* v. 47, n. 5, p. 881-9. 2013.
19. Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (CVE-SES/SP) 2018a. Boletim Epidemiológico: Febre amarela – 02/01/2018. Disponível em:[http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/arquivos-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18\\_0201boletim\\_epidemiologico.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/arquivos-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_0201boletim_epidemiologico.pdf) . Acesso em: 01/09/2023.
20. Cavalcante K.R.L.J. e Tauil P.L. Risk of re-emergence of urban yellow fever in Brazil. *Epidemiol. Serv. Saude, Brasília,* 26(3):617-620, jul-set 2017

21. Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (CVE-SES/SP) 2018b. Boletim Epidemiológico: Febre amarela – 28/12/2018. Disponível em:[http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18\\_boletim\\_epid\\_2812.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_boletim_epid_2812.pdf). Acesso em : 01/09/2023.
22. Logue, K.; Keven, J.B.; Cannon, M.V.; Reimer, L.; Siba, P.; Walker, E.D.; Zimmerman, P.A.; Serre, D. Unbiased Characterization of *Anopheles* Mosquito Blood Meals by Targeted High-Throughput Sequencing. *PLOS Negl Trop Dis*. v. 10, n. 3, e0004512. 2016.
23. Kent, R.J.; Norris, D.E. Identification of mammalian blood meal in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *Am J Trop Med Hyg*. v. 73, n. 2, p. 336-42. 2005.
24. Carvalho, G.C.; Malafronte, R.S.; Izumisawa, C.M.; Teixeira, R.S.; Natal, L.; Marrelli, M.T. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Vector Ecology*. v. 39, n. 1, p. 146-52. 2014.
25. Palermo, P.M.; Aguilar, P.V.; Sanchez, J.F.; Zorrilla, V.; Flores-mendoza, C.; Huayanay, A.; Guevara, C.; Lescano, A.G.; Halsey, E.S. Identification of Blood Meals from Potential Arbovirus Mosquito Vectors in the Peruvian Amazon Basin. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. v. 95, p. 1026–30. 2016.
26. Figueiredo, M.A.P.; Di Santi, S.M.; Manrique, W.G.; Gonçalves, L.R.; André, M.R.; Machado, R.Z. Molecular identification of *Plasmodium* spp. and blood meal sources of anophelines in environmental reserves on São Luis Island, state of Maranhão, Brazil. *Parasit Vectors*. v. 10, p. 203. 2017.
27. Guimarães, L.d.O.; Simões, R.F.; Chagas, C.R.F.; Menezes, R.M.T.d.; Silva, F.S.; Monteiro, E.F.; Holcman, M.M.; Bajay, M.M.; Pinter, A.; Camargo-Neves, V.L.F.d.; et al. Assessing Diversity, Plasmodium Infection and Blood Meal Sources in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian Zoological Park with Avian Malaria Transmission. *Insects* 2021, 12, 215. <https://doi.org/10.3390/insects12030215>
28. Mikheyev, A.S. and Tin, M.M. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Mol Ecol Resour*, 2014. 14(6): p. 1097-102.
29. de Jesus J, Giovanetti M, Rodrigues Faria N, Alcantara L. 2019. Acute vector-borne viral infection: zika and minion surveillance\*. *microbiolspec* 7(4): doi:10.1128/microbiolspec.AME-0008-2019
30. JESUS, JG; SACCHI, C ; CANDIDO, DS ; CLARO, IM ; SALES, FCS ; MANULI, ER ; SILVA, DBB; PAIVA, TM; PINHO, MAB ; SANTOS, KCO ; HILL, SC ; AGUIAR, RS ; ROMERO, F ; SANTOS, FCP; GONÇALVES, CR ; TIMENETSKY, MC ; QUICK, J ; CRODA, JHR ; OLIVEIRA, W ; RAMBAUT, A; PYBUS, OG. ; LOMAN, NJ. ; SABINO, EC ; FARIA, NR . Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil, 2020. *REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO*, v. 62, p. 62:e30, 2020.

31. Nakamura S, Yang C, Sakon N, Ueda M, Tougan T, et al, Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. PLoS One 4 , e4219 (2009).
32. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, Salamat SM, Somasekar S, Federman S, Miller S, Sokolic R, Garabedian E, Candotti F, Buckley RH, Reed KD, Meyer TL, Seroogy CM, Galloway R, Henderson SL, Gern JE, DeRisi JL, Chiu CY. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. N Engl J Med. 2014 Jun 19;370(25):2408-17. doi: 10.1056/NEJMoa1401268. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24896819; PMCID: PMC4134948.
33. Mucci, L.F.; Medeiros-sousa, A.R.; Ceretti-júnior, W.; Fernandes, A.; Camargo, A.A.; Evangelista, E.; De Oliveira Christie, R.; Montes, J.; Teixeira, R.S.; Marrelli, M.T. *Haemagogus leucocelaenus* and other mosquitoes potentially associated with sylvatic yellow fever in Cantareira State Park In the São Paulo metropolitan area, Brazil. J Am Mosq Control Ass. v. 32, n. 4, p. 329-32. 2016.
34. São Paulo. Instituto Florestal. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Plano de Manejo do Parque Estadual da Cantareira. 2009. [Acessado em 10 agosto de 2023]. Disponível em: <https://smastr16.blob.core.windows.net/fundacaoflorestal/2012/01/PECantareira/Plano%20de%20Manejo/Plano%20de%20Manejo%20Completo.pdf>
35. São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente; Instituto Florestal. Parque Estadual Alberto Löfgren: Plano de Manejo (Coordenador Ana Lucia Arromba, Cristiane Leonel et al) 1.ed.; São Paulo, Instituto Florestal, 2012. [Acessado em 10 agosto de 2023]. Disponível em: [http://s.ambiente.sp.gov.br/institutoflorestal/Plano\\_de\\_Manejo\\_PE\\_Alberto\\_Lofgren\\_.pdf](http://s.ambiente.sp.gov.br/institutoflorestal/Plano_de_Manejo_PE_Alberto_Lofgren_.pdf)
36. São Paulo. Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Instituto Florestal. Inventário Florestal do Estado de São Paulo (2020) [Acessado em 10 agosto de 2023]. Disponível em: <https://smastr16.blob.core.windows.net/home/2020/07/apresentacao-lancamento-inventario-florestal-2020.pdf>
37. Prefeitura de Mairiporã. Conheça Mairiporã. [Acessado em 08 de agosto de 2023]. Disponível em: <https://www.mairipora.sp.gov.br/conheca-mairipora/>
38. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

39. GOMES AC, Forattini OP, Natal D. Composição e atividade de mosquitos Culicidae. Emprego de armadilha CDC no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 21:363-370, 1987.
40. NASCI, RS. A light weight battery powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. Mosquito News.1981;41:808-11.
41. Lane, J. Neotropical Culicidae. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2v, 1953.
42. Lima-Camara, TN; Codeço, CT; Honório, NA; Bruno, RV; Peixoto, AA; Lounibos, LP. Male accessory gland substances from *Aedes albopictus* affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(Suppl. I): 18-25, 2013
43. Sella, M. Relazione della campagna anti-anofelica di Flumitino (1919) com spetiale riguardo ala biologia degli Anofeli ed agli Anofeli infetti. Ann Igiene. 1920.
44. Santos CS, Pie MR, da Rocha TC, Navarro-Silva MA (2019) Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. PLoS ONE 14(2): e0212517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212517>
45. Parodi, B; Aresu, O; Bini, D; Lorenzini, R; Schena, F; Visconti, P; Cesaro, M; Ferrera, D; Andreotti, V; Ruzzon, T. Species Identification and Confirmation of Human and Animal Cell Lines: A PCR-Based Method. BioTechniques 32:432-440 (2002)
46. Tartaglia M, Saulle E, Pestalozza S, Morelli L, Antonucci G, Battaglia AP. Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Ruminant Feeds: A Molecular Approach to Test for the Presence of Bovine-Derived Materials Journal of Food Protection, Vol. 61, No.5, 1998, Pages 513-518
47. Chang MC, Teng HJ, Chen CF, Chen YC, Jeng CR. The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. Malar J. 2008 Jun 9;7:105. doi: 10.1186/1475-2875-7-105. PMID: 18538036; PMCID: PMC2435115.
48. Townzen JS, Brower AVZ, Judd DD. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. Medical and Veterinary Entomology (2008) 22, 386–393
49. Ajamma YU, Mararo E, Omondi D, Onchuru T, Muigai AWT, et al. Rapid and high throughput molecular identification of diverse mosquito species by high resolution melting analysis [version 1; referees: 2 approved] F1000Research 2016, 5:1949 (doi: 10.12688/f1000research.9224.1)
50. Claro IM, Ramundo MS, Coletti TM *et al.* Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing [version 2; peer review: 2 approved]. *Wellcome Open Res* 2023, 6:241 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17170.2>)

51. Oxford Nanopore Technologies. Guppy Basecaller (Versão 2.2.7) [Software].
52. Oxford Nanopore Technologies. Guppy Barcoder (Versão 6.0.7) [Software].
53. Porechop v.0.3.2pre [Software]. (GitHub - rwick/Porechop: adapter trimmer for Oxford Nanopore reads 2)
54. National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
55. International Barcode of Life Project. Barcode of Life Data Systems (BOLD).  
<https://www.boldsystems.org/>
56. Seqkit (Versão 0.15.0) [Software]. <https://github.com/shenwei356/seqkit>
57. Minimap2 (Versão 2.28.0) [Software]. <https://github.com/lh3/minimap2>
58. Basic local alignment search tool. BLASTN [Software].  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> .
59. MiniKraken2\_v1\_8GB Kraken 2 Database
60. SAMtools Versão 1.16 [Software]. <https://github.com/samtools/samtools>
61. Tablet versão 1.19.05.28 [Software]. <https://ics.hutton.ac.uk/tablet/>
62. Stenn T, Peck KJ, Pereira GRP, Burkett-Cadena ND. Vertebrate Hosts of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as Potential Vectors of Zika Virus in Florida. *Journal of Medical Entomology*, 56(1), 2019, 10–17 doi: 10.1093/jme/tjy148
63. Mucci LF, Cardoso Júnior RP, de Paula MB, et al. Feeding habits of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an area of sylvatic transmission of yellow fever in the state of São Paulo, Brazil *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* (2015) 21:6 DOI 10.1186/s40409-015-0005-z
64. Tauil PL. Urbanização e ecologia da dengue. *Cadernos de Saúde Pública* 2001;17 (Supl): 99-102
65. Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016 Jun 27;50:36. doi: 10.1590/S1518-8787.2016050006791. PMID: 27355468; PMCID: PMC4936892.
66. Câmara DCP, Pinel CS, Rocha GP, et al. Diversity of mosquito (Diptera: Culicidae) vectors in a heterogeneous landscape endemic for arboviruses. *Acta Tropica* 212 (2020) 105715
67. Damasceno-Caldeira, R.; Nunes-Neto, J.P.; Aragão, C.F.; Freitas, M.N.O.; Ferreira, M.S.; Castro, P.H.G.; Dias, D.D.; Araújo, P.A.S.; Brandão, R.C.F.; Nunes, B.T.D.; Silva, E.V.P.; Martins, L.C.; Vasconcelos, P.F.C.; Cruz, A.C.R. Vector



Competence of *Aedes albopictus* for Yellow Fever Virus: Risk of Reemergence of Urban Yellow Fever in Brazil. *Viruses* 2023, 15, 1019.

68. Cunha MS, Tubaki RM, de Menezes RMT, Pereira M, Caleiro GS, Coelho E, Saad LDC, Fernandes NCCA, Guerra JM, Nogueira JS, Summa JL, Coimbra AAC, Zwarg T, Witkin SS, Mucci LF, Timenetsky MDCST, Sabino EC, de Deus JT. Possible non-sylvatic transmission of yellow fever between non-human primates in São Paulo city, Brazil, 2017-2018. *Sci Rep.* 2020 Sep 25;10(1):15751. doi: 10.1038/s41598-020-72794-x. PMID: 32978448; PMCID: PMC7519641.

69. Deus, J.T.d.; Mucci, L.F.; Lucheta Reginatto, S.; Pereira, M.; Bergo, E.S.; de Camargo-Neves, V.L.F. Evaluation of Methods to Collect Diurnal Culicidae (Diptera) at Canopy and Ground Strata, in the Atlantic Forest Biome. *Insects* 2022, 13, 202. <https://doi.org/10.3390/insects13020202>

70. Ceretti-Junior W, Oliveira-Christe R, Wilk-da-Silva R, Mucci LF, Duarte AMRC, et al. Diversity analysis and an updated list of mosquitoes (Diptera: Culicidae) found in Cantareira State Park, São Paulo, Brazil. *Acta Tropica* 212 (2020) 105669

71. Tubaki, R.M.; de Menezes, R.M.T.; David, M.R.; Palasio, R.G.S.; de Aguiar, O.T.; Baitello, J.B.; Santos, V.O.; Balbino, N.; Chiaravalloti-Neto, F. Physical Attributes of Tree Holes in the Atlantic Forest Edges: Evaluating Their Association with the Presence and Abundance of Immature *Haemagogus leucocelaenus*. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2023, 8, 337. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070337>

72. Mukabana WR, Takken W, Seda P, Killeen GF, Hawley WA, Knols BGJ. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from blood meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* (2002) 92, 233–239. DOI: 10.1079/BER2002164

73. Hoenen T, Groseth A, Rosenke K, Fischer RJ, Hoenen A, Judson SD, Martellaro C, Falzarano D, Marzi A, Squires RB, Wollenberg KR, de Wit E, Prescott J, Safronetz D, van Doremalen N, Bushmaker T, Feldmann F, McNally K, Bolay FK, Fields B, Sealy T, Rayfield M, Nichol ST, Zoon KC, Massaquoi M, Munster VJ, Feldmann H. Nanopore Sequencing as a Rapidly Deployable Ebola Outbreak Tool. *Emerg Infect Dis.* 2016 Feb;22(2):331-4. doi: 10.3201/eid2202.151796. PMID: 26812583; PMCID: PMC4734547.

74. Quick, J., Loman, N., Duraffour, S. *et al.* Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530, 228–232 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature16996>

75. Sugano S, Yamagishi J, Mongan AE, Tuda J, Suzuki Y. AB043. Nanopore sequencing for genotyping Dengue virus. *Ann Transl Med.* 2015 Sep;3(Suppl 2):AB043. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.AB043. PMCID: PMC4563416.

76. Faria, N., Quick, J., Claro, I. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* 546, 406–410 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature22401>

77. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, Xavier J, Quick J, du Plessis L, Dellicour S, Thézé J, Carvalho RDO, Baele G, Wu CH, Silveira PP, Arruda MB, Pereira MA, Pereira GC, Lourenço J, Obolski U, Abade L, Vasylyeva TI, Giovanetti M, Yi D, Weiss DJ, Wint GRW, Shearer FM, Funk S, Nikolay B, Fonseca V, Adelino TER, Oliveira MAA, Silva MVF, Sacchetto L, Figueiredo PO, Rezende IM, Mello EM, Said RFC, Santos DA, Ferraz ML, Brito MG, Santana LF, Menezes MT, Brindeiro RM, Tanuri A, Dos Santos FCP, Cunha MS, Nogueira JS, Rocco IM, da Costa AC, Komninakis SCV, Azevedo V, Chieppe AO, Araujo ESM, Mendonça MCL, Dos Santos CC, Dos Santos CD, Mares-Guia AM, Nogueira RMR, Sequeira PC, Abreu RG, Garcia MHO, Abreu AL, Okumoto O, Kroon EG, de Albuquerque CFC, Lewandowski K, Pullan ST, Carroll M, de Oliveira T, Sabino EC, Souza RP, Suchard MA, Lemey P, Trindade GS, Drumond BP, Filippis AMB, Loman NJ, Cauchemez S, Alcantara LCJ, Pybus OG. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*. 2018 Aug 31;361(6405):894-899. doi: 10.1126/science.aat7115. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30139911; PMCID: PMC6874500.
78. Eckert SE, Chan JZ, Houniet D, The Pathseek Consortium, Breuer J, Speight G. Enrichment by hybridisation of long DNA fragments for Nanopore sequencing. *Microb Genom*. 2016 Sep 20;2(9):e000087. doi: 10.1099/mgen.0.000087. PMID: 28785419; PMCID: PMC5537632.
79. Wang, J., Moore, N. E., Deng, Y. M., Eccles, D. A., & Hall, R. J. (2015). MinION nanopore sequencing of an influenza genome. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), Article 766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00766>
80. Jaworski E, Routh A (2017) Parallel ClickSeq and Nanopore sequencing elucidates the rapid evolution of defective-interfering RNAs in Flock House virus. *PLoS Pathog* 13(5): e1006365. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006365>
81. Kilianski A, Haas JL, Corriveau EJ, Liem AT, Willis KL, Kadavy DR, Rosenzweig CN, Minot SS. Bacterial and viral identification and differentiation by amplicon sequencing on the MinION nanopore sequencer. *Gigascience*. 2015 Mar 26;4:12. doi: 10.1186/s13742-015-0051-z. PMID: 25815165; PMCID: PMC4374364.
82. Martínez D, Gomez M, las salas JL, Hernandez C, Florez AZ, Munoz M, Ramírez JD. Employing oxford nanopore technologies (ONT) for understanding the ecology and transmission dynamics of flaviviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Eastern Colombia. *Acta Tropica* 245 (2023) 106972
83. Kipp, E.J., Lindsey, L.L., Milstein, M.S. *et al.* Nanopore adaptive sampling for targeted mitochondrial genome sequencing and bloodmeal identification in hematophagous insects. *Parasites Vectors* 16, 68 (2023). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05679-3>
84. Payne, A., Holmes, N., Clarke, T. *et al.* Readfish enables targeted nanopore sequencing of gigabase-sized genomes. *Nat Biotechnol* 39, 442–450 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00746-x332>

85. Lorosa ES, Faria MS, Oliveira LCM, Alencar J, Marcondes CB. Blood Meal Identification of Selected Mosquitoes in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26(1), 18-23, (1 March 2010)
86. Moritz C, Cicero C (2004) DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biol* 2(10): e354.
87. Kirchgatter, K.; Guimarães, L.d.O.; Monteiro, E.F.; Helfstein, V.C.; Telles-de-Deus, J.; Menezes, R.M.T.d.; Reginato, S.L.; Chagas, C.R.F.; de Camargo-Neves, V.L.F. DNA Barcoding of Morphologically Characterized Mosquitoes Belonging to the Genus *Mansonia* from the Atlantic Forest and Brazilian Savanna. *Insects* 2023, 14, 109. <https://doi.org/10.3390/insects14020109>
88. Alencar J, de Mello CF, Gil-Santana HR, Guimarães AÉ, de Almeida SA, Gleiser RM. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol*. 2016 Jun;41(1):18-26. doi: 10.1111/jvec.12189. PMID: 27232120.
89. Hendy, A., Hernandez-Acosta, E., Valério, D. *et al.* The vertical stratification of potential bridge vectors of mosquito-borne viruses in a central Amazonian forest bordering Manaus, Brazil. *Sci Rep* 10, 18254 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75178-3>
90. Stanzani, L.M.d.A.; Motta, M.d.A.; Erbisti, R.S.; Abreu, F.V.S.d.; Nascimento-Pereira, A.C.; Ferreira-de-Brito, A.; Neves, M.S.A.S.; Pereira, G.R.; Pereira, G.R.; Santos, C.B.d.; et al. Back to Where It Was First Described: Vectors of Sylvatic Yellow Fever Transmission in the 2017 Outbreak in Espírito Santo, Brazil. *Viruses* **2022**, 14, 2805. <https://doi.org/10.3390/v14122805>
91. Sacchetto L, Silva NIO, Rezende IMd, Arruda MS, Costa TA, de Mello E'M, et al. (2020) Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 14(10): e0008658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008658>
92. Alencar, J., E. S. Lorosa, N. De'gallier, N. M. Serra-Freire, J. B. Pacheco, and A. E. Guimaraes. 2005. Feeding patterns of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *J. Med. Entomol.* 42: 981Ð985.
93. Alencar, J., C. B. Marcondes, N. M. Serra-Freire, E. S. Lorosa, J. B. Pacheco, and A. E. Guimarães. 2008. Feeding Patterns of *Haemagogus capricornii* and *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in Two Brazilian States (Rio de Janeiro and Goiás). *J. Med. Entomol.* v. 45, no. 5, p.873-876
94. Guimarães, A. E., M. Arlé, and R.N.M. Machado. 1987. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil. IV. Preferência alimentar. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82: 277Ð285.

95. Tandon, Neelam & Ray, Sudipta. (2000). Host Feeding Pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Kolkata India.. WHO Regional Office for South-East Asia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/148772>
96. Gomes AC, Souza JMP, Bergamaschi DP, Santos JLF, Andrade VR, Leite OF, Rangel O, Souza SSL, Guimarães NSN, Lima VLC. Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. *Rev Saúde Pública* 2005; 39(2): 206-10
97. Ponlawat A, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *J Med Entomol*. 2005 Sep;42(5):844-9. doi: 10.1093/jmedent/42.5.844. PMID: 16363170.
98. A. Paulo G. Almeida, Susana S. S. G. Baptista, Carla A. G. C. C. Sousa, M. Teresa L. M. Novo, Helena C. Ramos, Nicholas A. Panella, Marvin Godsey, M. João Simões, M. Luisa Anselmo, Nicholas Komar, Carl J. Mitchell, Henrique Ribeiro, Bioecology and Vectorial Capacity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Macao, China, in Relation to Dengue Virus Transmission , *Journal of Medical Entomology*, Volume 42, Issue 3, 1 May 2005, Pages 419–428, <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.3.419>
99. Sawabe K, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Roychoudhury S, Higa Y, Kasai S, Tsuda Y, Nishiumi I, Hisai N, Hamao S, Kobayashi M. Host-feeding habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the urban and suburban residential areas of Japan. *J Med Entomol*. 2010 May;47(3):442-50. doi: 10.1603/ME09256. PMID: 20496592.
100. Valerio L, Marini F, Bongiorno G, Facchinelli L, Pombi M, Caputo B, Maroli M, Della Torre A. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome province, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010 Apr;10(3):291-4. doi: 10.1089/vbz.2009.0007. PMID: 19485771.
101. Kamgang, B., Nchoutpouen, E., Simard, F. *et al.* Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites Vectors* 5, 57 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-57>
102. Faraji A, Egizi A, Fonseca DM, Unlu I, Crepeau T, et al. (2014) Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(8): e3037. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003037>
103. Dos Santos Andrade P, Urbinatti PR, da Rocha Coelho R, de Sá Almeida RMM, Ribeiro SS, de Lima-Camara TN. Parity and gonotrophic discordance of females of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the city of São Paulo, SP, Brazil. *J Vector Ecol*. 2019 Dec;44(2):233-240. doi: 10.1111/jvec.12354. PMID: 31729798.
104. Santana SR, Andrade P dos S, Urbinatti PR, Almeida RMM de S, Lima-Camara TN. Gonotrophic discordance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in the

city of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2020;53:e20190277. Available from: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0277-2019>

105. de Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Parity and ovarian development of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in metropolitan Rio de Janeiro. *J Vector Ecol*. 2007 Jun;32(1):34-40. doi: 10.3376/1081-1710(2007)32[34:paodoa]2.0.co;2. PMID: 17633424.

106. de Oliveira, C.H.; Andrade, M.S.; Campos, F.S.; da C. Cardoso, J.; Gonçalves-dos-Santos, M.E.; Oliveira, R.S.; Aquino-Teixeira, S.M.; Campos, A.A.; Almeida, M.A.; Simonini-Teixeira, D.; et al. Yellow Fever Virus Maintained by *Sabethes* Mosquitoes during the Dry Season in Cerrado, a Semiarid Region of Brazil, in 2021. *Viruses* 2023, 15, 757 <https://doi.org/10.3390/v15030757>

## ANEXOS

- Anexo A - Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina  
FICHA DO ALUNO

5179 - 11567448/1 - Esmenia Coelho Rocha

**Email:** esmenia.coelho@usp.br  
**Data de Nascimento:** 16/05/1994  
**Cédula de Identidade:** RG - 42.788.609-0 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharel em Ciências Biológicas - Faculdade Anhanguera - São Paulo - Brasil - 2018

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Medicina Tropical  
**Área:** Doenças Tropicais e Saúde Internacional  
**Data de Matrícula:** 15/09/2020  
**Início da Contagem de Prazo:** 15/09/2020  
**Data Limite para o Depósito:** 11/09/2023  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Tamara Nunes de Lima Camara - 15/09/2020 até o presente. Email: limacamara@usp.br  
**Co-orientador:** Prof(a). Dr(a). Lícia Natal Fernandes - 09/12/2021 até o presente. Email: licianatal@gmail.com  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, 15/09/2020  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 08/12/2021  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 15/09/2020

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2023

**Impresso em:** 05/09/2023 13:54:05



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina**  
**FICHA DO ALUNO**

5179 - 11567448/1 - Esmenia Coelho Rocha

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ESP5109-2/2	Identificação e Bioecologia de Culicídeos, e Epidemiologia e Controle de Malária, Arboviroses, Filarioses e Fatores de Incômodos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) (1)	14/10/2019	17/11/2019	75	5	100	A	N	Concluída
PSP5119-2/1	Princípios da Epidemiologia (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	23/03/2021	31/05/2021	90	6	89	B	N	Concluída
PSP5116-2/1	Entomologia em Saúde Pública (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	24/03/2021	01/06/2021	60	4	100	A	N	Concluída
IMT5111-3/1	Tópicos Avançados Em Medicina Tropical	26/03/2021	08/07/2021	30	2	100	A	N	Concluída
ESP5113-3/1	Vigilância Entomológica e Controle Integrado de Artrópodes Vetores (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	24/05/2021	22/06/2021	60	4	100	A	N	Concluída
IMT5106-3/1	Marcadores Moleculares em Plasmodium e Culicídeos Vetores: Especiação e Infecção	04/11/2021	24/11/2021	45	3	100	A	N	Concluída
ESP5114-1/3	Estatística Aplicada à Entomologia (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	28/03/2022	10/07/2022	60	4	100	A	N	Concluída
PSP5121-2/3	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	05/04/2022	13/06/2022	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	10	20	28
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	10	20	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 80

**Observações:**

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a)

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.  
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2023

Impresso em: 05/09/2023 13:54:05