

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina

Ramon Wilk da Silva

Análise da influência da paisagem sobre a estrutura populacional de mosquitos *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), em áreas com histórico de epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo

São Paulo

2022

Ramon Wilk da Silva

Análise da influência da paisagem sobre a estrutura populacional de mosquitos *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), em áreas com histórico de epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wilk-da-Silva, Ramon

Análise da influência da paisagem sobre a estrutura populacional de mosquitos *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), em áreas com histórico de epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo / Ramon Wilk da Silva. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Medicina Tropical. Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Mauro Toledo Marrelli.

Descritores: 1.Febre amarela 2.*Haemagogus leucocelaenus* 3.Estado de São Paulo 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.Genética de populações 6.Ecologia da paisagem.

USP/FM/DBD-351/2022

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha esposa e companheira de vida, Vanessa Gomes Cordeiro, por sua parceria, compreensão e apoio, ao longo do período de desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli pela oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa, inicialmente no Programa de Aprimoramento Profissional (FUNDAP) e sequencialmente em todo o caminho da pós-graduação.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo: 2017/23127–7) e pela prorrogação concedida dos dois meses adicionais ao prazo original, em razão dos prejuízos decorrentes da pandemia de COVID-19.

Gostaria de agradecer também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão dos dois primeiros meses de bolsa, enquanto o projeto da FAPESP estava em consideração.

Quero agradecer a equipe de campo da extinta Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN): Luis Milton Bonafé, Antônio Waldomiro de Oliveira, João Carlos do Nascimento e Paulo Frugoli dos Santos, pelo apoio logístico na realização de parte das coletas, e em especial ao João e ao Paulo, pela possibilidade da realização das coletas de Caraguatatuba, com estas ocorrendo em suas respectivas propriedades.

Agradeço à Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, que logo nos primeiros meses do doutorado me auxiliou na realização do sequenciamento do gene mitocondrial COI, o qual foi utilizado para a confirmação da identificação morfológica dos espécimes, inclusive de algumas formas imaturas que não chegaram a completar seu ciclo de desenvolvimento.

Agradeço à Professora Dra. Maria Anice Mureb Sallum, pela disponibilização de seu laboratório para realização da quantificação das amostras de DNA, e em especial à Dra. Tatiane Marques Porangaba de Oliveira, por ter realizado o procedimento, em razão das medidas de restrições impostas pela COVID-19.

Agradeço ao Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, por disponibilizar seu laboratório, juntamente com toda a infraestrutura que tornou possível a realização do protocolo de genotipagem dos SNP's.

Agradeço ao Dr. Diego Peres Alonso, a quem fico devendo a realização do protocolo de genotipagem, e que prontamente se dispôs a fazê-lo em razão da impossibilidade de ingresso de visitantes ao laboratório, em razão de medidas restritivas, novamente impostas pela COVID-19.

Agradeço ao analista de bioinformática Marcus Vinicius Niz Alvarez, que além de desenvolver o protocolo de genotipagem empregado ainda conferiu o suporte no processamento do banco de dados gerados e demais análises subsequentes.

Agradeço à Dra. Paula Ribeiro Prist, por todas as orientações durante o exame qualificação a respeito do tema ecologia de paisagem, e posteriormente, por todas as dicas e ensinamentos, ao logo do desenvolvimento da nossa recente publicação na ACTA Tropica, bem como em um segundo trabalho que se encontra submetido ao periódico Landscape Ecology.

Agradeço ao Dr. Luis Mucci, que além de toda a parceria, suporte e apoio logístico na realização de parte das coletas, ainda me conferiu abrigo em sua casa. Fico aguardando a realização da nossa incursão ao bairro da Mooca, para que possamos assistir a um jogo do nosso “moleque travesso” (Clube Atlético Juventus).

Agradeço ao Dr. Daniel Pagoto Vendrami, amigo de longa data, por seu apoio logístico e braçal na realização das coletas na região de São José do Rio Preto. Obrigado pelo “pouso” em sua casa, bem como o churrasco de Urupês.

Agradeço ao Me. Eduardo Evangelista, amigo e parceiro de coletas, por seu suporte na realização de algumas incursões ao Parque Estadual da Cantareira.

Agradeço à Dra. Natasha Aparecida Grande de França, grande amiga e parceira de corridas. Obrigado por me receber em sua casa, durante minha estadia em São José do Rio Preto, e por todo apoio e carinho ao longo do desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço ao Dr. Antônio Ralph de Medeiros-Sousa (“meu amigo toninho”), obrigado pela amizade, parceria e mentoria, ao longo da minha jornada na pós-graduação, ou seja, desde lá dos tempos do aprimoramento.

Agradeço ao amigo e hoje Dr. Rafael Oliveira Christe, que até recentemente compartilhava comigo as angústias no desenvolvimento de nossas respectivas pesquisas em tempos de pandemia, bem como no cumprimento dos prazos dos nossos projetos.

Agradeço a todos os amigos e colegas de laboratório: Dr. Walter Ceretti-Junior, Me. Karolina, Me. Ana Leticia, e ao Dr. Jader, inclusive a Dra. Gabriela Cristina de Carvalho que já não está mais no laboratório, mas continua fazendo parte da minha vida.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Maria do Carmo (Dona Carminha) e José Francisco, pela educação e valores transmitidos, não só a mim como também aos meus irmãos Wagner e Bryan.

Agradeço à minha segunda família: Alzira e Valdir (sogros), Gisele e Tiago (cunhados/compadres), e Miguel (sobrinho/afilhado), por todo apoio, confraternizações, risadas e churrascos.

Agradeço à Júlia Pires, pelos incontáveis eventos de despedida e momentos de descontração, ao longo deste ano, os quais contribuíram para manutenção da minha sanidade mental.

E por último, mas não menos importantes, agradeço aos meus gatos/filhos: Amy Winehouse, Luke Skywalker, Frida Kahlo, e Jorge “o guerreiro”, cujas existências e momentos de descontração ajudaram, enormemente, no alívio de todo estresse enfrentado ao longo desse período.

“E tudo, tudo, tudo, tudo que nós tem é nós!”

Emicida

RESUMO

Wilk-da-Silva R. Análise da influência da paisagem sobre a estrutura populacional de mosquitos *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), em áreas com histórico de epizootias de febre amarela em primatas não humanos no estado de São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa causada pelo vírus da febre amarela (VFA) e veiculada por mosquitos da família Culicidae. No Brasil e outros países Sul-americanos, a doença restringiu-se basicamente ao ciclo silvestre, tendo sido registrado em 1928 a última epidemia urbana em território brasileiro associada ao vetor *Aedes aegypti*. Na região Sul e Sudeste do Brasil a espécie *Haemagogus leucocelaenus* tem sido incriminada como o principal vetor do vírus causador da febre amarela silvestre (FAS), uma vez que indivíduos desta espécie têm sido frequentemente encontrados naturalmente infectados pelo VFA em áreas epizoóticas. Recentemente o país vivenciou seu pior surto de febre amarela silvestre das últimas décadas, com diversos registros de epizootias e casos humanos no estado de São Paulo. A fragmentação da paisagem em função da atividade humana constitui uma das principais causas de perda de biodiversidade, e entre outras, ainda podemos destacar a sua contribuição na alteração nos padrões epidemiológicos de doenças, principalmente, em função de alterações nos níveis de interações entre hospedeiros silvestres, vetores e pessoas. Desse modo, compreender seu efeito em populações de vetores implicados na transmissão de febre amarela, a exemplo do *Hg. leucocelaenus*, pode significar uma melhor compreensão do padrão de circulação do VFA em áreas com histórico de epizootias, auxiliando em medidas de controle mais efetivas. Portanto, o presente estudo objetivou investigar a influência da paisagem sobre a estrutura populacional de mosquitos *Hg. leucocelaenus* em áreas com histórico de epizootias de febre amarela em primatas não-humanos (PNHs), localizadas no estado de São Paulo. Para essa finalidade foram utilizados marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP's) mitocondriais para caracterização populacional do vetor. Métricas da paisagem foram mensuradas

baseadas nas classes de uso de solo presentes nos locais de coleta, de modo a verificar uma possível influência destas nos padrões de diversidade genéticas dos espécimes, bem como nos eventos demográficos de suas populações. Adicionalmente, sinais de estruturação genética das populações de *Hg. leucocelaenus* e padrões de assinatura genética de seus indivíduos foram verificados por meio dos valores do índice F_{st} e análise discriminante de componentes principais (DPCA) baseados nas frequências gênicas dos SNP's genotipados. As populações de Balsamo, São José do Rio Preto e Pindamonhangaba apresentaram os maiores índices de diversidade genética, enquanto as populações de São Paulo e Mairiporã, ambas amostradas dentro Parque Estadual da Cantareira, evidenciaram sinais de expansão populacional. Com relação a estruturação, nitidamente foi possível verificar um agrupamento das populações amostradas na região noroeste do estado de São Paulo (Balsamo e São José do Rio Preto), com as demais constituindo um clado a parte, padrão corroborado pelo padrão de assinatura genética dos espécimes. O padrão de estruturação observado no presente estudo indica um efeito de isolamento por distância geográfica, sugerindo uma dispersão dos espécimes de *Hg. leucocelaenus* auxiliada pelo grau de conexão da paisagem. Enquanto os índices de diversidade genética e eventos de expansão populacional podem estar refletindo a plasticidade ecológica da espécie.

Descritores: Febre amarela. *Haemagogus leucocelaenus*. Estado de São Paulo. Polimorfismo de nucleotídeo único. Genética de populações. Ecologia da paisagem.

ABSTRACT

Wilk-da-Silva R. Landscape influence analysis in the population structure of *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) from areas with yellow fever epizootics in non-human primates in the state of São Paulo [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Yellow fever is an infectious disease caused by the yellow fever virus (YFV) transmitted by mosquitoes of the family Culicidae. The disease has been restricted to a sylvatic cycle in Brazil and other's South American countries. The oldest register of the urban epidemic associated with *Aedes aegypti* mosquitoes in Brazilian territory was in 1928. In southern and southeast Brazil the species *Haemagogus leucocelaenus* has been incriminated as the main vector of causative virus of sylvatic yellow fever (SYF) by the usual encounter of its naturally infected specimens from areas with yellow fever epizootics reports. Recently, Brazil experienced the worst yellow fever outbreak in recent decades with several yellow fever epizootics reports in non-human primates (NHPs) and human cases in the state of São Paulo. The landscape fragmentation by anthropic influence represents one of the main causes of biodiversity loss and among other causes, we can highlight the changes in epidemiological patterns of zoonotic diseases by the changes in interaction levels between sylvatic hosts, vectors, and humans. Thus, understand the effect of fragmentation landscape in yellow fever vectors as *Hg. leucocelaenus* can constitute a better insight of the yellow fever circulation pattern in areas with epizootics reports supporting more effective control measures. Thus, the present study aimed to investigate the landscape influence on the population structure of *Hg. leucocelaenus* mosquitoes from areas with yellow fever epizootics in non-human primates in the state of São Paulo. Mitochondrial single nucleotides polymorphisms (SNP's) were used to characterize the population structure of specimens and landscape metrics were obtained from sampled areas as a way of verifying its possible influence on the genetic diversity of individuals and events demographics in the populations. Additionally, signals of population structuration and patterns of the genetic signature of individuals were verified by the F_{st} index and Principal Component Discriminant Analysis (DPCA) based on the gene frequencies of the

genotyped SNP's. The Balsamo, São José do Rio Preto, and Pindamonhangaba populations exhibited the highest indices of genetic diversity, while the populations of São Paulo and Mairiporã both sampled within Cantareira State Park showed signs of population expansion. Regarding structuring, it was possible to verify a grouping of the populations sampled in the northwest region of the state of São Paulo (Balsamo and São José do Rio Preto) with the others populations constituting a separate clade, pattern corroborated by the genetic signature pattern of the specimens. The structuring pattern observed in the present study indicates an isolation effect by geographic distance and suggests a dispersion of *Hg. leucocelaenus* specimens aided by the degree of connection of the landscape. While the indices of genetic diversity and population expansion events may be reflecting the ecological plasticity of the species.

Descriptors: Yellow fever. *Haemagogus leucocelaenus*. State of São Paulo. Single nucleotide polymorphism. Population genetics. Landscape ecology.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Distribuição dos casos de febre amarela silvestre no Brasil	20
1.2. Fragmentação de habitats	22
1.3. Possíveis impactos da modificação da paisagem na dinâmica populacional do <i>Hg. leucocelaenus</i>	24
1.4. O estudo da paisagem	25
1.5. Análise populacional com marcadores SNP's	26
1.6. Hipótese do estudo	28
2. OBJETIVO	30
2.1. Geral	30
2.2. Específicos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Caracterização da área de estudo	31
3.2. Coleta e identificação dos mosquitos <i>Hg. leucocelaenus</i>	34
3.3. Preparação das amostras e Genotipagem por Sequenciamento (GBS)	34
3.4. Diversidade populacional e análise de estratificação	35
3.5. Descritores da paisagem	37
4. RESULTADOS	39

4.1. Coletas de espécimes de <i>Haemagogus leucocelaenus</i>	39
4.2. Diversidade genética	41
4.3. Teste de neutralidade	44
4.4. Estrutura genética	45
4.5. Métricas da paisagem e Modelos Lineares Generalizados	54
4.6. Análise da estrutura e configuração da paisagem	59
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS	72
8. ANEXOS	83

ANEXO 1. *The influence of landscape structure on the dispersal pattern of yellow fever virus in the state of São Paulo.*

ANEXO 2. *Influence of landscape composition and configuration on the richness and abundance of potential sylvatic yellow fever vectors in a remnant of Atlantic Forest in the city of São Paulo, Brazil.*

ANEXO 3. *Configuração da paisagem obtida por meio de buffers de 5.700 metros, ao redor dos pontos de coleta, baseados na distância máxima de dispersão da espécie *Haemagogus leucocelenus* (Causey et al., 1950).*

Lista de Figuras

- Figura 1.** Distribuição dos casos de febre amarela e epizootias em primatas não humanos (PNHs) no estado de São Paulo, de acordo com dados do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (CVE), no período entre 2016 e 2019. Polígonos rosas representam os municípios com ocorrências de casos de febre amarela e/ou epizootias em PNHs, com os círculos roxos correspondendo, proporcionalmente, ao número de casos, enquanto os círculos laranjas correspondem as epizootias. O mapa foi construído utilizando o software ArcGis versão 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).....22
- Figura 2.** Mapa do estado de São Paulo com destaque para área de estudo. Mesorregiões aparecem destacadas em contorno roxo: Litoral Sul (1); Macro Metropolitana (2); Metropolitana (3); Vale do Paraíba (4) e São José do Rio Preto (5). Municípios amostrados são exibidos em contorno vermelho, enquanto as estrelas pretas correspondem aos locais de coleta. O mapa foi construído utilizando o software ArcGis versão 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).....31
- Figura 3.** Mapa destacando os locais de coleta de acordo com suas mesorregiões de abrangência. A - mesorregião de São José do Rio Preto, municípios de Balsamo e São José do Rio Preto; B – mesorregião do Vale do Paraíba, municípios de Caraguatatuba, Igaratá e Pindamonhangaba; C – mesorregião litoral sul, localizada no Vale do Ribeira, município de Miracatu; e D – mesorregião Metropolitana, municípios de São Paulo e Mairiporã. Estrela identificam os pontos de coleta, enquanto os círculos correspondem a *buffers* com 2.850 metros de diâmetro ao redor dos mesmos. O mapa foi construído utilizando o software ArcGis versão 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).....33
- Figura 4.** Vista lateral de uma fêmea da espécie *Haemagogus leucocelaenus* (fonte: próprio autor).....41
- Figura 5.** Mapa do genoma mitocondrial de referência do *Haemagogus leucocelaenus* (NC_057212.1). Após a chamada de variantes foram obtidos um total de 115 SNP's (representados pelas barras pretas), distribuídos ao longo do mitogenoma, e cuja a cobertura relativa é representada pelo centro do gráfico.....43
- Figura 6.** Valores para a par de F_{ST} , com base nas mesorregiões de abrangência das áreas de coletas no estudo (A), e por município amostrado (B): SP, São Paulo; MA – Mairiporã; IG, Igaratá; RP, São José do Rio Preto; CA, Caraguatatuba; BA, Balsamo; PI, Pindamonhangaba; e MI, Miracatu.....46

Figura 7. Correlação linear entre a distância genética ($F_{ST}/(1 - F_{ST})$) das populações de <i>Haemagogus leucocelaenus</i> e distância geográfica (Km), em escala logarítmica natural, a partir dos locais amostrados. Pontos cinzas representam a distribuição dos dados, a linha preta representa o ajuste do modelo, enquanto as linhas tracejas representam um intervalo de confiança de 95%.....	48
Figura 8. Análise de Escalonamento Multidimensional (MDS) obtida por meio das distâncias euclidianas entre as frequências alélicas das populações, observadas para os SNP's mitocondriais.....	49
Figura 9. Dendrograma exibindo as populações agrupadas por mesorregiões, com base nas distâncias euclidianas entre as suas frequências alélicas, observadas para os SNP's mitocondriais (1.000 aleatorizações).....	50
Figura 10. Dendrograma exibindo o agrupamento das populações amostradas, com base nas distâncias euclidianas entre as suas frequências alélicas, observadas para os SNP's mitocondriais (1.000 aleatorizações).....	50
Figura 11. Análise Discriminante dos Componentes Principais (DAPC) com base nos indivíduos amostrados a partir dos oito municípios de coleta.....	51
Figura 12. Multipainel identificando a estrutura populacional dos espécimes de <i>Haemagogus leucocelaenus</i> amostrados. A e B, número de agrupamentos genéticos (K); e C, subdivisão dos espécimes para K=2 e K=3. Cada um dos 92 exemplares para as 8 populações amostradas é representado por uma linha vertical.....	52
Figura 13. Probabilidade de assinatura genéticas dos indivíduos a um determinado agrupamento em contraste a população original. Os indivíduos aparecem identificados pelas linhas verticais, enquanto o comprimento dos segmentos representa a probabilidade dos indivíduos pertencerem a um determinado agrupamento genéticos contra a população original.....	53
Figura 14. Configuração da paisagem obtida por meio de <i>buffers</i> de 2.850m - metade da distância máxima de dispersão da espécie <i>Haemagogus leucocelaenus</i> (Causey et al., 1950) - ao redor dos pontos de coleta, conforme raio de dispersão esperado por Jackson and Fahrig (2012) para uma determinada espécie.....	56

Figura 15. Proporção de dominância das espécies baseada nas três áreas amostradas no Parque Estadual da Cantareira. Coleções noturnas: a, c, e e g, Parque Estadual da Cantareira, Trilha do Pinheirinho, Trilha da Bica e Setor Administrativo, respectivamente. Coleções diurnas: b, d e f, Parque Estadual da Cantareira, Trilha do Pinheirinho e Trilha da Bica, respectivamente. sp1 - *Aedes fluviatilis*; sp2 - *Aedes scapularis*; sp3 - *Aedes serratus*; sp4 - *Aedes terreus*; sp5 - *Aedes aegypti*; sp6 - *Aedes albopictus*; sp7 - *Haemagogus leucocelaenus*; sp8 - *Psorophora ferox*; sp9 - *Sabethes undosus/fabrici/ignotus*; sp10 - *Sabethes purpureus*; sp11 - *Sabethes melanonymphe*, sp12 - *Sabethes sp.* A área do Setor Administrativo do parque foi removida das análises das coleções diurnas devido a sua baixa amostragem (somente três ao longo de todo o período de estudo).....60

Figure 16. Relação entre a resistência associada as classes de uso de solo e distância geográfica (Distância + Matriz 2) e a diferença em dias para o primeiro registro de febre amarela nos municípios estudados. A predição aqui é baseada somente nas inclinações dos termos de efeitos fixos no modelo.....62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de espécimes adultos e formas imaturas (entre parênteses) obtidas a partir dos municípios amostrados.....	40
Tabela 2. Índices de diversidade molecular mitocondrial entre as populações (nível permitido de dados ausentes < 25%).....	44
Tabela 3. Teste de neutralidade.....	45
Tabela 4. Índice de fixação populacional F_{ST} , par a par, das populações do <i>Haemagogus leucocelaeus</i> amostradas, com base nos SNP's mitocondriais.....	47
Tabela 5. Modelo linear utilizando com variável preditora as distâncias geográficas entre os locais de coleta e variável resposta os valores de F_{ST} obtidos por meio das comparações par a par entre as populações.....	48
Tabela 6. Métricas de paisagem com base em <i>buffers</i> com raios de 2.850 e 5.700 metros ao redor dos locais de coleta.....	55
Tabela 7. Modelos lineares generalizados utilizando como variável preditoras as classes de uso de solo e variável resposta o índice de diversidade theta S.....	57
Tabela 8. Modelos lineares generalizados utilizando como variável preditoras as classes de uso de solo e variável resposta o índice de diversidade theta $\hat{\pi}$	58
Tabela 9. Modelos testados e seus parâmetros (efeitos fixos) listados de acordo para o grau de ajuste. Uma matriz de diferenças em dias para o primeiro registro de VFA nos municípios estudados foi utilizada como variável resposta.....	61

Lista de abreviaturas

bf2850m – *Buffer* de 2.850 metros em torno dos pontos de coleta;

bf5700m – *Buffer* de 5.700 metros em torno dos pontos de coleta;

CA – Área total;

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac";

DAPC – Análise Discriminante dos Componentes Principais (do inglês, *Discriminant Analysis of Principal Components*);

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*);

DP – Profundidade de sequenciamento (do inglês, *Depth*);

ED – Densidade de borda florestal (do inglês, *Edge Density*);

EP – Erro padrão;

FA – febre amarela;

FAS – febre amarela silvestre;

FAU – febre amarela urbana;

FBDS – Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável;

F_{ST} – Índice de fixação da população;

GL – Graus de Liberdade;

GLM – modelos lineares generalizados (do inglês, *Generalized Linear Models*);

GQ – Qualidade do genótipo (do inglês, *Genotype Quality*).

GBS – Genotipagem por sequenciamento (do inglês, *Genotyping by Sequencing*);

ha – Hectare;

NGS – Sequenciamento de nova geração (do inglês, *Next Generation Sequencing*);

NHPs – Primatas não humanos (do inglês, non-human primates)

MAF – Frequência do alelo menor (do inglês, *Minor Allele Frequency*);

MDS – Análise de Escalonamento Multidimensional (do inglês, *Multidimensional Scaling*);

m/ha – Metros por hectare;

M2S_5700m – Modelo linear generalizado utilizando como variável resposta o índice theta S e variável preditora a classe antrópica baseada em um *buffer* de 5.700 metros em torno dos pontos de coleta;

M2pi_5700m – Modelo linear generalizado utilizando como variável resposta o índice theta $\hat{\pi}$ e variável preditora a classe antrópica baseada em um *buffer* de 5.700 metros em torno dos pontos de coleta;

PEC – Parque Estadual da Cantareira;

PLAND – Porcentagem da paisagem ocupada pela classe de uso de solo;

PNHs – Primatas não humanos;

sd – Desvio padrão (do inglês, *Standard Deviation*);

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*);

TE – Total de borda florestal (do inglês, *Total Edge*);

VCF – Formato de chamada de variantes (do inglês, *Variant Call Format*);

VFA – vírus da febre amarela.

1. Introdução

Anualmente mais de um bilhão de pessoas são infectadas por vírus e parasitas transmitidos por vetores, acarretando em milhões de óbitos por ano, em função de doenças tais como a malária, dengue, leishmaniose, chagas, febre amarela, entre outras (WHO, 2014). Nas últimas décadas as arboviroses (vírus transmitidos por artrópodes) tornaram-se uma importante questão de saúde pública, principalmente, em função da expansão humana e de suas atividades, que aumentaram sua exposição para riscos de infecção (Weaver, 2013).

De modo geral, arbovírus circulam naturalmente entre animais silvestres, podendo causar doenças ao homem e outros animais domésticos e de importância econômica, depois de ultrapassar seus limites naturais e entrar em contato com estes (Weaver; Reisen, 2010). Um ótimo exemplo consiste no vírus da febre amarela (VFA), gênero *Flavivirus* (Família *Flaviviridae*), que circula na natureza entre primatas não humanos (PNHs), por meio de vetores culicídeos, principalmente dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* nas Américas do Sul e Central, e *Aedes* (subgênero *Diceromyia* e *Stegomyia*) no continente africano (Monath; Vasconcelos, 2015; Chippaux; Chippaux, 2018).

O VFA possui dois ciclos distintos de transmissão, um silvestre, no qual o homem é infectado, esporadicamente, ao ser picado por fêmeas de mosquitos (gênero *Haemagogus* e *Sabethes*), e outro urbano, no qual ocorrem transmissões inter-humanas decorrentes de picadas de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas (Massad et al., 2003; Monath; Vasconcelos, 2015). No Brasil, podemos destacar como principais vetores as espécies *Haemagogus janthinomys* (Dyar 1921) e *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar and Shannon, 1924) (Arnell, 1973; Abreu et al., 2019b), ambos apresentando ampla distribuição ao longo de todo o território nacional, com exceção do estado do Rio Grande do Sul, onde a primeira não possui registro (Forattini, 2002).

O ciclo urbano, denominado febre amarela urbana (FAU), foi uma das principais ameaças à saúde humana entre o século XVIII e começo do século XX, e o seu declínio só foi possível graças aos esforços para o controle de seu vetor e desenvolvimento de uma vacina com o vírus atenuado (Frierson, 2010; Monath; Vasconcelos, 2015). Contudo, mesmo diante da disponibilidade de uma vacina altamente eficaz - com 99% de proteção,

a partir de 30 dias de sua aplicação (WHO, 2019) -, globalmente, ainda estima-se ocorrência anual de 200.000 casos, com 30.000 mortes, a maioria ocorrendo no continente africano (PAHO, 2008, 2014; Gaythorpe et al., 2021).

Com relação ao continente Sul-americano, o registro mais recente da forma urbana ocorreu no ano de 2008, após a identificação de um surto de transmissão no distrito de San Lorenzo, Paraguai (OPAS, 2008). Até então, a mesma não era confirmada no continente há mais de 60 anos, precisamente, desde 1942, quando foi registrado um último caso no estado do Acre, Brasil (Brasil, 2016). Enquanto a forma silvestre foi responsável, entre os anos de 1985 a 2007, por um total de 3.837 casos, com 2.229 mortes (PAHO, 2008), e ao estender esse período até 2012, somente quatro países responderam por cerca de 95% de todos os casos ocorridos no continente Sul-americano: Peru (54%), Bolívia (18%), Brasil (16%) e Colômbia (7%) (PAHO, 2014).

Ainda relacionado à forma silvestre, recentemente o Brasil vivenciou um surto de magnitude sem precedentes ao longo das últimas décadas - cujo início se deu no ano de 2014 e ainda encontra-se em andamento -, sendo registrados, até o final do ano de 2021, 2.276 casos humanos e 2.978 epizootias confirmadas laboratorialmente (MS, 2021, 2020, 2019).

1.1. Distribuição dos casos de febre amarela silvestre no Brasil

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa não contagiosa, que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América do Sul e África, causando esporadicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto para a Saúde Pública (Vasconcelos, 2003). De um modo geral, todas as pessoas não vacinadas que se expõem às picadas de seus vetores dentro das áreas de mata, onde ocorra à circulação do vírus, podem vir a se infectar (Vasconcelos, 2003).

No total são identificadas sete linhagens do VFA, cinco na África e duas nas Américas (genótipos Sul-americanos I e II) (Bryant; Holmes; Barrett, 2007), com esta penúltima circulando no Brasil, ao longo das duas últimas décadas, e sendo responsável pelas epizootias em PNHs e infecções humanas (Bonaldo et al., 2017).

No caso particular da região norte do país, onde a febre amarela silvestre (FAS) é endêmica, geralmente observam-se surtos da doença com intervalos de 5 a 7 anos, alternados por períodos com um menor número de casos, com tais intervalos sendo possivelmente associados com o tempo necessário para renovação das populações de PNHs suscetíveis (Vasconcelos, 2010). Adicionalmente, o espalhamento do vírus nestes locais se daria por surtos de epizootias, em função do movimento destes primatas nas áreas contínuas e contíguas. Por outro lado, o espalhamento do vírus para áreas não afetadas é esperado na ocorrência de deslocamentos de humanos infectados para uma determinada área com elevada densidade de vetores e presença de hospedeiros vertebrados, cenário no qual espera-se a ocorrência de uma explosão na mortalidade de primatas suscetíveis, em muitos casos resultando na extinção local destas populações (Vasconcelos, 2010).

No Brasil, admite-se três áreas epidemiológicas de risco para a circulação do VFA: área endêmica (regiões Norte, Centro-Oeste e o estado do Maranhão), área de transição ou de epizootias (incluía a parte ocidental dos estados do Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e área indene (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro). Entretanto, frente a recente elevação da circulação do VFA, ao longo das últimas décadas, houve uma ampliação na faixa de transição, passando a quase que a totalidade das áreas em seus estados, e agora sendo inclusos o Rio de Janeiro e Espírito Santo (MS, 2004). Outra consequência do aumento da circulação do VFA - mais notavelmente, ao longo da recente reemergência de FA -, foi a alteração da recomendação na cobertura vacinal, passando agora para, praticamente, todo o território nacional, com exceção de alguns poucos estados da região nordeste (PAHO/WHO, 2022).

Com relação aos registros de FAS, no caso particular do estado de São Paulo, de acordo com os últimos dados divulgados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (CVE), entre 2016 e 2019 foram confirmados um total de 596 casos em humanos, com 201 óbitos (33,7%), e 875 epizootias em PNHs (CVE, 2022) (Figura 1). Adicionalmente, estudos filogenéticos baseados na identificação do VFA em casos

humanos que evoluíram a óbito (Cunha et al., 2019a), PNHs e mosquitos da espécie *Hg. leucocelaenus* (Cunha et al., 2019b), com dados do estado de São Paulo, além de confirmarem o envolvimento do genótipo Sul-americano I, também evidenciaram sua provável entrada a partir de Minas Gerais.

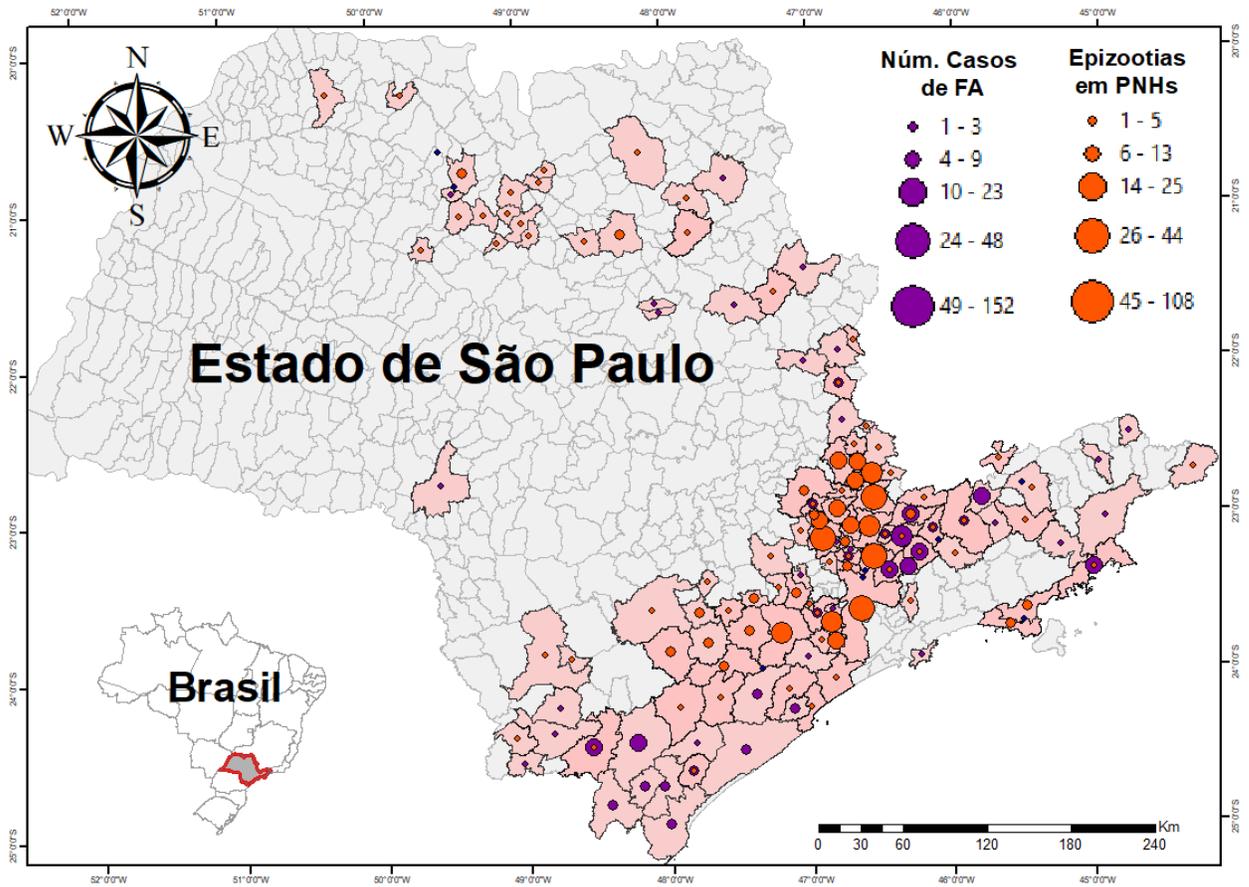


Figura 1. Distribuição dos casos de febre amarela e epizootias em primatas não humanos (PNHs) no estado de São Paulo, de acordo com dados do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (CVE), no período entre 2016 e 2019. Polígonos rosas representam os municípios com ocorrências de casos de febre amarela e/ou epizootias em PNHs, com os círculos roxos correspondendo, proporcionalmente, ao número de casos, enquanto os círculos laranjas correspondem as epizootias. O mapa foi construído utilizando o software ArcGis versão 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).

1.2. Fragmentação de habitats

Atualmente o estado de São Paulo apresenta apenas 13% de remanescentes da cobertura original de seus biomas (Cerrado e Mata Atlântica) (SOS Mata Atlântica &

INPE, 2020), gerando perda significativa de sua biodiversidade. Nesse sentido, a urbanização e a ocupação do solo para práticas de agricultura e pecuária desempenham um papel relevante na supressão e fragmentação de habitats naturais (Prist et al., 2016; MMA, 2017). A utilização do solo por estes setores implica na substituição de áreas com vegetação original por pastagens e campos agrícolas, de modo a criar fragmentos de vegetação natural, isolados uns dos outros (Franklin, 1993).

Consequentemente, esta subdivisão impõe aos fragmentos efeitos do tipo: a) área, no qual ocorrem mudanças ecológicas em consequência do isolamento dos fragmentos, neste a magnitude dos eventos tende a ser inversamente proporcional ao tamanho do fragmento, isto é, quanto menor o fragmento maior a intensidade; b) distância (ou isolamento), este implica no deslocamento das espécies, que podem vir a ficar restritas dependendo da distância entre os fragmentos; c) borda, efeito que inclui alterações abióticas, na abundância de espécies e em processos ecológicos no entorno dos fragmentos, os quais sofrem uma transição abrupta em direção à paisagem adjacente alterada e d) matriz, que refere-se aos mosaicos de habitats modificados pelo homem em função da ocupação do solo, tais como pastagem, culturas, plantações ou florestas de regeneração que circundam os fragmentos de floresta, sendo responsável por determinar se os efeitos listados anteriormente, serão mais ou menos pronunciados nos fragmentos (Primack; Rodrigues, 2001; Laurance; Vasconcelos, 2009).

Com relação ao “efeito de borda”, o mesmo pode ser dividido em dois tipos: abiótico e biótico. Neste primeiro, a borda do fragmento é exposta a uma maior incidência de ventos, altas temperaturas, baixa umidade e elevada radiação solar. Enquanto o segundo implica em mudanças na composição e abundância de espécies, decorrentes das alterações dos fatores abióticos nas proximidades da borda, por exemplo, o aumento da densidade de plantas pioneiras em função do aumento da radiação solar (Lima-Ribeiro, 2008).

Estudos recentes em áreas de mata Atlântica têm destacado um papel da borda florestal nos fragmentos de vegetação associado tanto na facilitação da mobilidade do VFA (Prist et al., 2021; Wilk-da-Silva et al., 2022 - ANEXO 1) quanto para o seu risco de transmissão (Ilacqua et al., 2021). Ambientes fragmentados tendem a possuir uma maior

densidade de bordas florestais (superfície de contato entre os fragmentos de floresta e suas áreas adjacentes alteradas) (Fahrig, 2003), nas quais, observa-se a presença tanto da espécie *Hg. leucocelaenus* (Wilk-da-Silva et al., 2020 - ANEXO 2) quanto de bugios (*alouatta* spp.) (Bolt; Russell; Schreier, 2021), um dos principais hospedeiros para o VFA na América do Sul (Bicca-Marques; Chaves; Hass, 2020), além de distintos padrões de ocorrência e abundância de outras espécies de mosquitos potencialmente vetoras do VFA (Wilk-da-Silva et al., 2020 - ANEXO 2). Simultaneamente, uma elevação na superfície de borda florestal pode constituir uma maior área de contato das populações humanas com o próprio vírus (Plowright et al., 2017).

Além da contribuição no aumento da superfície de borda, a fragmentação de habitats reflete diretamente no padrão de incidência e abundância de espécies de mosquitos vetores (Zittra et al., 2017), promovendo ainda alterações nos padrões de interações entre hospedeiros, vetores e patógenos (Zohdy; Schwartz; Oaks, 2019). No caso específico da FA, a fragmentação de habitats pode implicar ainda em uma maior prevalência do VFA decorrente do adensamento das populações de PNHs (Mbora; Mcpeek, 2009). Portanto, a fragmentação pode constituir elemento chave tanto na manutenção quanto na circulação do VFA, com as bordas florestais desempenhando um relevante papel nesta última.

1.3. Possíveis impactos da modificação da paisagem na dinâmica populacional do *Hg. leucocelaenus*

Nem sempre a fragmentação de habitats pode implicar num efeito negativo sobre as populações destes locais, por exemplo, espécies que são capazes de forragear nos habitats da matriz podem tornar-se mais abundantes nos fragmentos que nas áreas não fragmentadas, caso a matriz tenha uma grande oferta de alimento (Laurance; Vasconcelos, 2009).

De modo geral, espécies de mosquitos implicadas na transmissão de FA apresentam maior afinidade por repastos em PNHs (Vasconcelos, 2003). Entretanto, Mucci et al. (2015) em estudo de hábito alimentar em culicídeos com potencial envolvimento na transmissão do VFA observaram ecletismos com relação à preferência de fonte

sanguínea, sendo que para um de seus principais vetores (*Hg. janthinomys/capricornii*) foi observada a presença de repastos em pássaros e bovinos, além de primatas. O que por sua vez, levanta a hipótese de um cenário, no qual a utilização de terra, tal como nas áreas de pastagens nestes locais, pode estar atuando como fonte em potencial para a elevação da abundância das populações de culicídeos associados à FA.

Neste sentido, áreas de borda florestal, com interfaces entre fragmentos de florestas e áreas adjacentes modificadas pelo homem, podem favorecer diretamente populações da espécie *Hg. leucocelaenus*, principalmente em função de sua plasticidade ecológica a ambientes com maior grau de perturbação, decorrentes de alterações ambientais provocadas pelo homem (Gomes et al., 2010), bem como do seu, aparente, comportamento generalista (Alencar et al., 2016). Ao passo que, as temperaturas mais elevadas observadas nestes espaços (Hofmeister et al., 2019) podem contribuir para uma maior abundância da espécie, em função do aumento de oviposição de suas fêmeas (Couto-Lima et al., 2020; Alencar et al., 2021).

1.4. O estudo da paisagem

A ecologia de paisagem pode ser definida como uma subárea dentro da ecologia. Seus dois principais enfoques são: uma abordagem geográfica, baseada na influência do homem sobre a paisagem e a gestão do território; e outra ecológica, relacionando o contexto da heterogeneidade espacial sobre os processos ecológicos, e sua importância em termos de conservação biológica (Metzger, 2001).

Embora a definição de paisagem possua diferentes conotações, principalmente, em função de seu enfoque, é de consenso que a terminologia se refere a uma área heterogênea, que frequentemente pode ser estruturada hierarquicamente. Sendo a mancha sua unidade básica, uma área relativamente homogênea. O tamanho da paisagem (extensão e dimensão) é dependente da pesquisa aplicada e pode variar de acordo com a percepção do organismo em questão, podendo limitar de poucos metros a milhares de quilômetros quadrados. Nesta abordagem, manchas e paisagens não são entendidas como unidades isoladas, mas sim envolvidas por um contexto que pode ser local, regional ou mesmo global (Liu; Taylor, 2002).

Paisagem pode ser considerada como um sistema aberto que compartilha fluxos e interage com outras paisagens através de suas fronteiras. Suas funções ou processos incluem fluxos de matéria, energia e organismos, a exemplo da migração e dispersão entre as manchas, e através desse fluxo as paisagens conectadas exercem influência umas nas outras. Suas estruturas e funções mudam em função do tempo e espaço, devido a distúrbios naturais ou antropogênicos. Entre a metodologia adotada para seu estudo, incluem-se técnicas de monitoramento remoto para coleta de dados espaciais para grandes escalas, através de imagens de satélite e fotografias aéreas, além de sistemas de georreferenciamento (Liu; Taylor, 2002).

Ecologia de paisagem é uma área altamente interdisciplinar e transdisciplinar e vem sendo extensivamente utilizada nos últimos 30 anos, por permitir o entendimento e melhoria das relações entre o padrão espacial e processos ecológicos numa determinada faixa de escala, e embora, a maioria de seus estudos tenham focado em escalas maiores, de centenas a milhares de quilômetros, em sua essência o campo pode ser aplicado a qualquer escala (Wu, 2013).

Dentro da área de ecologia da paisagem há um campo promissor, a genômica da paisagem, que visa buscar o entendimento da interação de fatores bióticos e abióticos no genoma. Esse campo coloca a possibilidade de se fazer algumas análises mais elaboradas, por exemplo, incluir os dados genéticos nos estudos de modelagem ecológica de nicho, levando a um melhor entendimento da dispersão de cada espécie (Stapley et al., 2010). Modificações antrópicas na paisagem podem impor a suas populações restrições ao fluxo gênico (Howell et al., 2016) e, conseqüentemente, no caso de mosquitos, promover mudanças comportamentais e fisiológicas que reflitam na sua competência e capacidade vetorial, de modo que o estudo de tais processos pode contribuir significativamente para uma melhor compreensão da dinâmica patógeno-hospedeiro.

1.5. Análise populacional com marcadores SNP's

Uma ampla investigação da variação ao longo do genoma pode fornecer informações relevantes, no que diz respeito a medidas generalizadas do potencial evolucionário das

espécies, em resposta às mudanças ambientais (Harrisson et al., 2014). Neste sentido, polimorfismo de nucleotídeo único ou *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*, destaca-se como uma promissora ferramenta, já possuindo ampla aplicação em diversas áreas, tais como diagnósticos humano e forense, melhoramento animal e de plantas, além de conservação e gerenciamento de recursos ambientais (Kumar; Banks; Cloutier, 2012).

Marcadores SNP's são caracterizados por apresentarem variações nas sequências do DNA com ocorrência da substituição de um único nucleotídeo, e suas formas alternativas representam os alelos presentes nos indivíduos de uma população, geralmente sendo observados apenas dois por *locus* (Brookes, 1999). Tais substituições podem ocorrer por meio de mecanismo de transições, purina por purina ($A \leftrightarrow G$) e pirimidina por pirimidina ($C \leftrightarrow T$), ou por transversões, purina por pirimidina ou pirimidina por purina ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$, $C \leftrightarrow T$), sendo as transições observadas com maior frequência (Vignal et al., 2002).

Estes marcadores são abundantes e encontrados ao longo do genoma em ambas regiões, codificantes e não codificantes, e em comparação com outros tipos de marcadores, a exemplo de microssatélites e DNA mitocondrial, possuem vantagens como o fato de sua mutação envolver modelos de mutação simples, a possibilidade de analisar as regiões neutras e sob seleção, além de exibir uma amostragem mais representativa do genoma da espécie em estudo (Morin; Luikart; Wayne, 2004; Helyar et al., 2011).

Em função das características listadas acima e em razão da maior robustez estatística em seus dados gerados, SNP's surgem como uma alternativa em estudos de caracterização e estruturação populacional, gerando conhecimento na genética de populações de vetores de importância médica, a exemplo do trabalho de Emerson et al. (2015) com *Anopheles darlingi*, no qual os autores observaram a presença de três grupos genéticos distintos com relação às populações do Brasil, com indícios de uma barreira física limitando o fluxo gênico dos indivíduos amostrados entre as regiões sul e sudeste. Fouet et al. (2017) com *Anopheles moucheti* amostrados em Camarões, no qual observaram uma fraca diferenciação genética entre suas populações, atribuindo tal resultado a conectividade das populações agregadas e a seu elevado fluxo gênico.

Schmidt et al. (2017) com populações de *Aedes albopictus* da China, no qual os autores identificaram a presença de sua estruturação genética associada à rede de transportes do país. Steffler et al. (2016) com populações de *Aedes aegypti* do Brasil, no qual observou-se uma baixa variabilidade genética entre as populações amostradas, atribuindo tal característica a capacidade de dispersão da espécie e a conectividade entre os locais amostrados.

Contudo, mesmo diante da crescente aplicação de sequenciamentos de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) em espécies de mosquitos de importância médica e epidemiológica, a exemplo dos estudos anteriormente citados, menos de 1% das espécies de mosquitos atualmente reconhecidas – aproximadamente, 3.600 (Harbach, 2022) - dispõem do sequenciamento completo de seus genomas (Ruzzante; Reijnders; Waterhouse, 2019). Situação refletida na espécie objeto de estudo, *Hg. leucocelaenus*, para a qual encontra-se disponível somente o genoma mitocondrial como referência. Conseqüentemente, o genoma mitocondrial – amplamente empregado como ferramenta em estudos evolucionários, principalmente, em função de sua elevada taxa de mutação, herança uniparental (origem materna) e elevado número de cópias (Wilson et al., 1985) – surge como uma importante alternativa para a identificação de SNP's em espécies de culicídeos que ainda não dispõem de seu genoma completamente sequenciado, a exemplo do trabalho de Aragão et al. (2019) com espécies do gênero *Sabethes*.

1.6. Hipótese do estudo

Embora sejam raros os registros de FAU no continente Sul-americano, a recente epidemia da forma silvestre no Brasil – a maior já registrada nos últimos anos (MS, 2021) –, somada a observação de manutenção do VFA em fragmentos de mata Atlântica por no mínimo três períodos consecutivos de transmissão (2016 – 2017, 2017 – 2018 e 2018 – 2019), sem a necessidade de reintrodução (Abreu et al., 2019a), e a ampla distribuição do *Ae. aegypti* no ambiente urbano, bem como sua capacidade vetorial para o VFA, sinalizam para sua possível reemergência no país.

A FAS é uma doença de característica multicausal e entre as principais contribuições para sua circulação, podemos destacar a presença do vetor, hospedeiros (PNHs) e o movimento de pessoas ou primatas infectados em fase virêmica (Vasconcelos, 2010). De modo que, um melhor entendimento da circulação do vírus em áreas de epizootias pode contribuir enormemente para ações mais efetivas durante programas de controle, a exemplo da melhor adequação na cobertura vacinal.

No Brasil, as duas principais espécies incriminadas na transmissão do VFA, *Hg. janthinomys* e *Hg. leucocelaenus*, possuem ampla distribuição, com exceção do estado do Rio Grande do Sul que não registra a ocorrência desta primeira. Paralelamente, o encontro de indivíduos da espécie *Hg. leucocelaenus* naturalmente infectados em municípios do Rio Grande do Sul e São Paulo, por sua vez, sustentam indícios de seu papel como principal vetor nos estados do sul e sudeste do país (Vasconcelos, 2010).

Além da faixa de ocorrência, as espécies também apresentam diferenças em sua ecologia, enquanto o *Hg. janthinomys* ocorre no interior de florestas de galerias com maior grau de preservação, o *Hg. leucocelaenus* apresenta uma faixa mais ampla, sendo muitas vezes encontrados nas bordas de fragmentos de vegetação, ao nível do solo, indicando uma maior tolerância a ambientes antropizados (Gomes et al., 2010). Desta forma, verificar a influência da paisagem na dinâmica populacional do *Hg. leucocelaenus*, bem como o fluxo gênico de suas populações nestas áreas, pode fornecer informações de ampla relevância para um melhor entendimento e predição dos padrões epidemiológicos da FA.

Processos de fragmentação da paisagem, além de implicarem diretamente na redução de habitats, contribuem para um aumento de superfícies de borda florestal, ambiente no qual, aparentemente, o *Hg. leucocelaenus* encontra recursos favoráveis para sua sobrevivência. Portanto, a hipótese do presente estudo consiste na possibilidade da configuração e grau de fragmentação da paisagem desempenhar um papel na dinâmica populacional (a exemplo de estruturação e eventos demográficos) do *Hg. leucocelaenus* e, conseqüentemente, influenciar no padrão de circulação e transmissão do VFA, conforme observado nos distintos padrões de epizootias observados nos municípios de São Paulo.

2. Objetivo

2.1. Geral

Investigar a influência da paisagem sobre a estrutura populacional de mosquitos *Hg. leucocelaenus*, bem como em aspectos relacionados a circulação do vírus da febre amarela, em áreas com histórico de epizootias em primatas não-humanos, localizadas no estado de São Paulo.

2.2. Específicos

- Investigar a influência da matriz do entorno dos fragmentos de vegetação analisados nas populações de *Hg. leucocelaenus*, bem como seus possíveis efeitos nos eventos demográficos da espécie.
- Verificar a variabilidade genética entre populações de *Hg. leucocelaenus* coletadas nas diferentes áreas de estudo.
- Verificar a influência da paisagem sobre o fluxo gênico das populações de *Hg. leucocelaenus*.
- Verificar a influência da paisagem nos padrões de diversidade, riqueza e abundância de espécies de culicídeos com potencial envolvimento na transmissão do vírus da febre amarela.
- Verificar a influência da paisagem no padrão de deslocamento temporal do vírus da febre amarela em áreas com registro de epizootias em primatas não humanos no estado de São Paulo.

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização da área de estudo

O estado de São Paulo, Brasil, possui uma extensão territorial de 248.219,48 km² (24,8 milhões de hectares) e uma estimativa populacional de 46.289.333, com densidade demográfica de 166,25 hab/km² (IBGE, 2021). Atualmente, o arranjo espacial paulista encontra-se configurado da seguinte forma: setor agrícola – 17.778.910 de hectares (ha) (71,6%); Área de vegetação – 5.577.114 de ha (22,5%) - destes 3,9 milhões sendo compostos por Mata Atlântica e 163.674 por Cerrado -, Área não vegetada – 880.768 ha (3,54%) e corpos d'água – 582.619 ha (2,34%) (MapBiomias, 2020; SOSMA, 2020) (Figura 2).

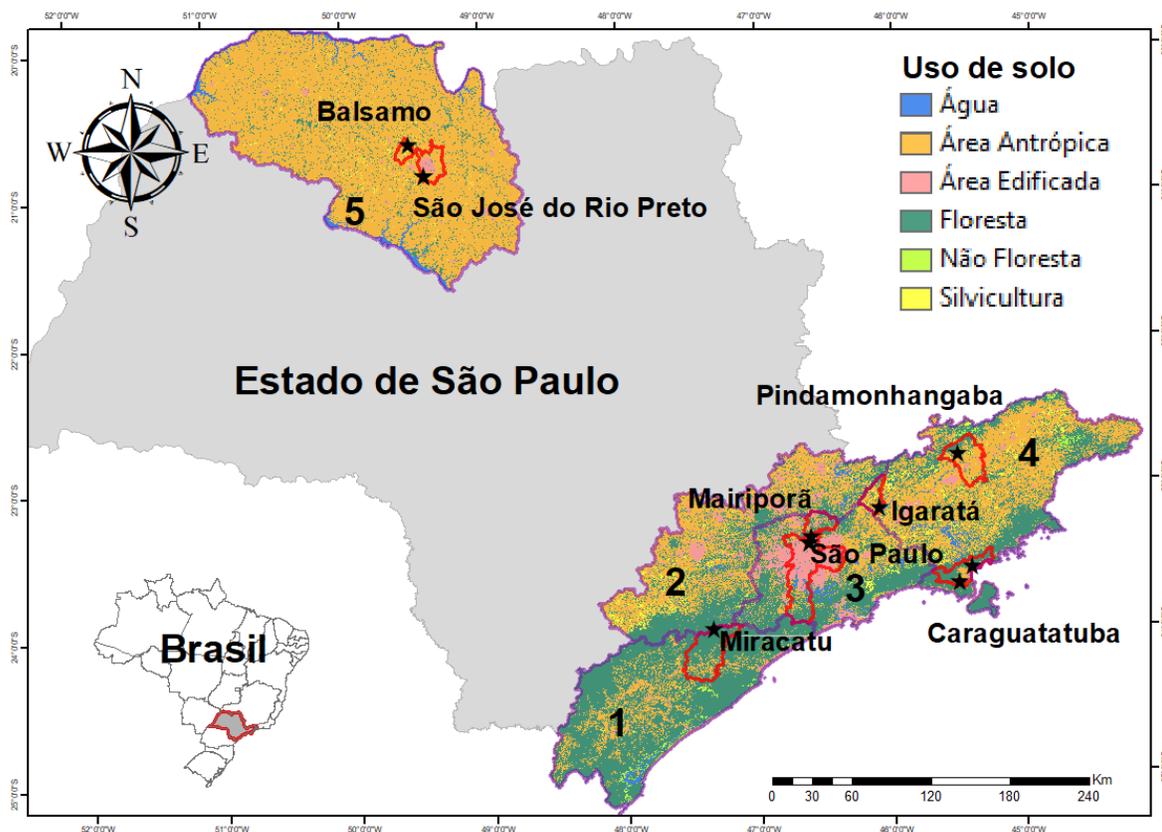


Figura 2. Mapa do estado de São Paulo com destaque para área de estudo. Mesorregiões aparecem destacadas em contorno roxo: Litoral Sul (1); Macro Metropolitana (2); Metropolitana (3); Vale do Paraíba (4) e São José do Rio Preto (5). Municípios amostrados são exibidos em contorno vermelho, enquanto as estrelas pretas correspondem aos locais de coleta. O mapa foi construído utilizando o software ArcGis versão 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).

Com base nas mesorregiões que compõem a área do presente estudo foi possível amostrar um total de oito municípios, com estes possuindo ao menos um local de coleta, e sendo representados por dois pontos distintos: um na borda – localizado na periferia dos fragmentos, com uma distância não superior a 200 metros em direção ao centro destes; e outro localizado em direção ao interior de cada fragmento de vegetação, com distância superior a 200 metros a partir da periferia, quando possível, principalmente, em funções de limitações técnicas, tais como tamanho dos fragmentos, ou mesmo, de acesso ao interior dos mesmos. A distância foi definida com base no trabalho de Laurance et al. (2002) demonstrando que a maioria dos efeitos de borda penetra até 200 metros em direção ao interior de fragmentos florestais amazônicos.

Deste modo, foi possível a amostragem de 13 pontos de coletas de mosquitos, a saber: um ponto localizado na borda de um fragmento de vegetação (20° 39' 46.199" S 49° 31' 20.302" O), a partir de uma propriedade particular – sítio Madalena -, município de Balsamo; três pontos oriundos de duas propriedades particulares no município de Caraguatatuba: dois deles localizados no sítio João, sendo um na borda do fragmento (23° 43' 15.398" S 45° 30' 40.799" O) e outro na área core (23° 43' 23.099" S 45° 30' 41.198" O), e um terceiro a partir da área core (23° 36' 51.998" S 45° 25' 0.998" O) no sítio Paulo; um ponto localizado na borda do fragmento de vegetação (23° 12' 41.000" S 46° 6' 21.899" O) presente no Condomínio Pontal da Garças, município de Igaratá; um ponto localizado na área core da trilha do Pinheirinho (23° 24' 27.691" S 46° 37' 11.010" O), Parque Estadual da Cantareira, município de Mairiporã; um ponto localizados na borda da vegetação presente na área da trilha suspensa (24° 1' 54.199" S 47° 21' 10.699" O), Reserva Ecológica Legado das Águas, região do Vale do Ribeira, município de Miracatu; dois pontos localizados na periferia (20° 53' 4.301" S 49° 24' 58.201" O e 20° 53' 4.898" S 49° 24' 51.599" O) de um fragmento de vegetação natural, Mata dos Macacos, no município de São José do Rio Preto; três pontos a partir do Parque Estadual da Cantareira, na parte pertencente ao município de São Paulo: um localizado na borda (23° 27' 15.300" S 46° 38' 9.802" O), outro na área core (23° 27' 8.600" S 46° 38' 8.700" O) da trilha da Bica, e um terceiro na borda de vegetação presente na área do setor administrativo (23° 26' 49.992" S 46° 37' 57.767" O); e um ponto localizado na área core

(22° 50' 23.201" S 45° 31' 24.100" O) da trilha da Caixa D'água, Parque Municipal Trabiju, município de Pindamonhangaba (Figura 3). A maior parte dos municípios amostrados (sete de um total de oito) exibiram ocorrência de epizootias em PNHs, ao longo da recente reemergência (2016-2020), sendo a única exceção o município de Miracatu (CVE, 2022). Entretanto, ainda de acordo com CVE, epizootias puderam ser confirmadas, a partir do serviço de vigilância epidemiológica da região de Registro, em municípios adjacentes tais como Pedro de Toledo e Juquiá, de modo que não podemos descartar totalmente a possibilidade de ocorrências no município de Miracatu, principalmente, se levarmos em conta a ocorrência de casos de febre amarela em humanos e sua localização junto aqueles dois outros municípios da região de Registro, todos abarcando uma mesma área contínua de mata Atlântica.

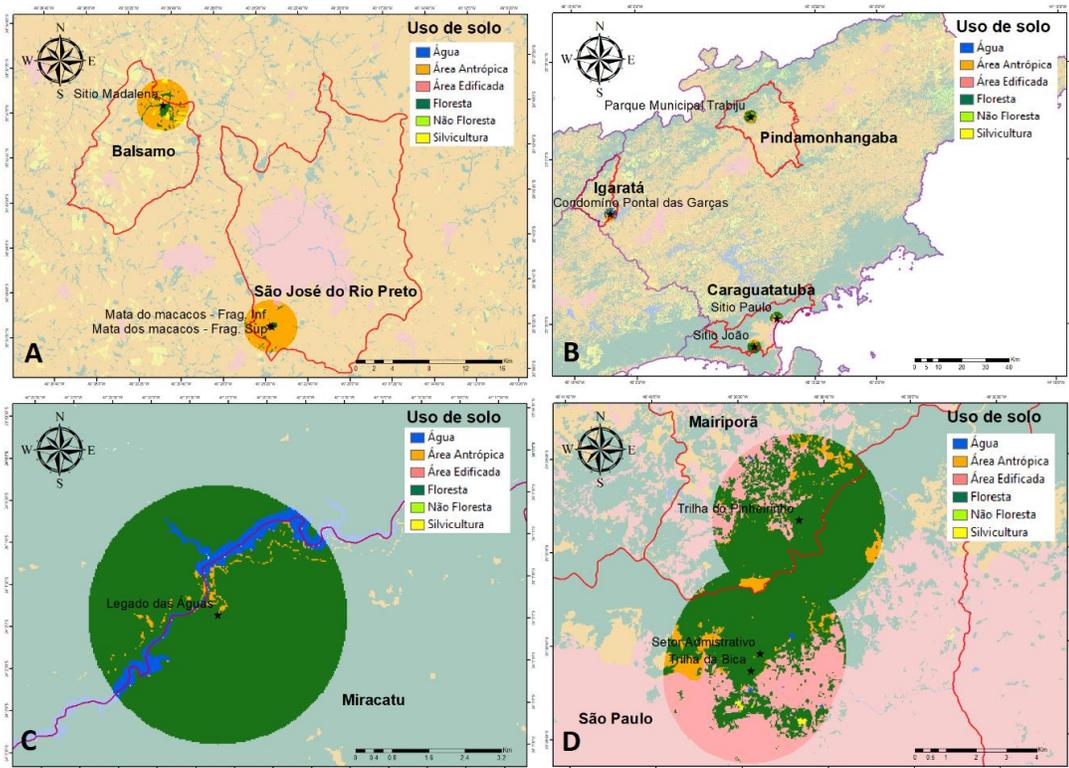


Figura 3. Mapa destacando os locais de coleta de acordo com suas mesorregiões de abrangência. A - mesorregião de São José do Rio Preto, municípios de Balsamo e São José do Rio Preto; B – mesorregião do Vale do Paraíba, municípios de Caraguatatuba, Igaratá e Pindamonhangaba; C – mesorregião litoral sul, localizada no Vale do Ribeira, município de Miracatu; e D – mesorregião Metropolitana, municípios de São Paulo e Mairiporã. Estrela identificam os pontos de coleta, enquanto os círculos correspondem a *buffers* com 2.850 metros de diâmetro ao redor dos mesmos. O mapa foi construído utilizando o software ArcGis versão 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).

3.2. Coleta e identificação dos mosquitos *Hg. leucocelaenus*

Entre novembro de 2018 e dezembro de 2020 foram realizadas um total de 24 incursões em fragmento de Mata Atlântica, das quais 17 foram positivas para a coleta da espécie *Hg. leucocelaenus*. As coletas dos indivíduos adultos foram realizadas ao nível do solo - durante o período diurno, das 08h00 às 16h00 -, com auxílio de puçá e aspirador bucal de sucção, sendo os mosquitos abatidos ainda em campo, utilizando-se de sacos plásticos e algodão embebido em acetado de etila. Posteriormente, os espécimes foram acondicionados em caixas entomológicas e transportados ao Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP), onde foram identificados por meio de chaves taxonômicas de literatura especializada (Consoli; Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Por sua vez, as formas imaturas foram obtidas empregando pissetas com mangueiras de silicone flexível, utilizadas para drenar os conteúdos presente nos criadouros encontrados nos ocos de árvores, sendo posteriormente transportadas para o LESP/FSP/USP, onde foram mantidas até emergência das formas aladas. Os dados obtidos foram registrados em banco de dados do Microsoft Excel® 2010 e separados de acordo com: Data de coleta, área de estudo, ponto de coleta, técnica de coleta, fase de vida e sexo.

3.3. Preparação das amostras e Genotipagem por Sequenciamento (GBS)

Os mosquitos foram separados individualmente em microtubos (2 ml) e macerados com a ajuda de pistilos, sendo posteriormente submetidos à extração de DNA genômico com o auxílio do *Kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação de DNA foi feita por meio de fluorometria utilizando o *Kit QuBit dsDNA HS Assay*, da *Thermo Fisher Scientific*, de acordo com as recomendações do fabricante.

Bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando um quinto do volume total recomendado para o *Nextera XT Library prep kit* (Illumina) de acordo com o protocolo do fabricante. Na sequência as amostras de DNA foram agrupadas (total de 92), sendo carregadas em duas *mid-output flowcells* e submetidas a sequenciamento individual utilizando a plataforma NextSeq500 (Illumina) em programa *single-read* de 151 ciclos,

conforme o protocolo desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” – UNESP/Botucatu, de acordo com a metodologia adotada por Alvarez (2020). As etapas de preparação de bibliotecas e sequenciamento, anteriormente mencionadas, foram feitas no Instituto de Biociências - UNESP/Botucatu.

Estatísticas do sequenciamento foram obtidas utilizando o programa FASTQC (Andrews, 2010), enquanto o controle de qualidade do sequenciamento foi realizado utilizando o programa Trimmomatic (Bolger; Lohse; Usadel, 2014), sendo os filtros aplicados: remoção de adaptadores se identificados; remoção de bases com qualidade inferior a 20 (*Phred Score*); remoção de *reads* com comprimento menor que 40 pb; *trimming* das 10 primeiras chamadas de base. Os dados do sequenciamento foram alinhados com o genoma mitocondrial de referência de *Hg. leucocelaenus* - NC_057212.1 (disponível em NCBI - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_057212.1) utilizando o programa *Burrows-Wheeler Aligner* 0.7.17 (Li; Durbin, 2009), sendo esta opção decorrente da ausência de um genoma completo de referência para a espécie objeto de estudo.

A chamada de variantes foi realizada pelo programa BCFtools do pacote SAMtools 1.10 (Li, 2011) e o painel de variantes foi exportado no formato VCF versão 4.2. As variantes foram filtradas pelo programa LCVCFtools (Alvarez, 2021) de acordo com os parâmetros a seguir: Frequência alélica do menor alelo (MAF) $\geq 1\%$; qualidade do genótipo (GQ) ≥ 20 ; profundidade mínima de sequenciamento (DP) ≥ 5 ; dados não-ausentes mínimo de 75%.

3.4. Diversidade populacional e análise de estratificação

Os valores para a diversidade nucleotídica dentro das populações, bem como a Análise Variância Molecular (AMOVA) foram estimados para os espécimes agrupados por local de coleta com o auxílio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier; Lischer, 2010). Para diversidade nucleotídica, foram calculados os valores de theta (θ): S e $\hat{\pi}$ - índices que representam as variações dentro ou entre as populações -, o primeiro é estimado a partir do número observado de *loci* polimórficos; enquanto o segundo é estimado a partir

número médio de diferenças par a par entre as sequências de DNA (Tajima, 1983, 1989). Sinais de eventos demográficos nas populações (expansão ou retração) foram verificados por meio dos testes de neutralidade Tajima's D (Tajima, 1989) e Fu's FS (Fu, 1997), enquanto sinais de estratificação nas mesmas foram investigados com base na estimativa do parâmetro F_{ST} de acordo com o modelo matemático de Weir and Cockerham (1984). O parâmetro mede probabilidade de dois alelos escolhidos ao acaso entre as subdivisões e na população serem iguais (Gillespie, 2004), e o cálculo de seus valores permitiram a comparação par a par tanto das populações agrupadas por mesorregiões (Metropolitana, Vale do Ribeira, Vale do Paraíba e São José do Rio Preto) quanto por município amostrado. Ainda por meio do programa Arlequin, foi possível estimar a significância (considerando como limiar um $p\text{-value} \leq 0,05$) dos valores médios de F_{ST} com base no teste de permutação (1.000 aleatorizações).

Dados oriundos da chamada de variantes (VCF), do inglês *Variant Call Format*, foram manipulados por meio do pacote *vcfR* (Knaus; Grünwald, 2017), de modo a permitir o cálculo das distâncias euclidianas entre as frequências alélicas observadas para os SNP's mitocondriais. Estas foram posteriormente utilizadas para verificação de sinais de estratificação entre as populações amostradas, por meio de uma análise de escalonamento multidimensional (MDS - do inglês *Multidimensional Scaling*), e construção de clusters hierárquicos (1.000 aleatorizações), com auxílio dos pacotes *stats* (R Core Team, 2018) e *pvclust* (Suzuki; Terada; Shimodaira, 2019), respectivamente.

Posteriormente, uma análise discriminante dos componentes principais (DAPC - do inglês *Discriminant Analysis of Principal Components*) entre as amostras foi realizada por meio do pacote *adegenet* (Jombart; Ahmed, 2011), com obtenção e utilização dos *eigenvalues* para a identificação do número de agrupamentos genéticos (K) que melhor representa o conjunto de dados, juntamente com painéis identificando a probabilidade de assinatura genética dos espécimes, isto é, o grau de similaridade entre os grupos, e tanto os agrupamentos quanto os painéis foram obtidos com o auxílio dos pacotes *adegenet* (Jombart; Ahmed, 2011) e *reshape2* (Wickham, 2007), com suas visualizações sendo realizadas por meio dos pacotes *ggplot2* (Wickham, 2016) e *ggpubr* 0.40 (Kassambara,

2020). Todos os pacotes mencionados anteriormente foram implementados no ambiente computacional R (R Core Team, 2018).

3.5. Descritores da paisagem

Dois *buffers*, um de 2.850 metros e outro de 5.700, ao redor de cada ponto de coleta foram determinados para calcular as métricas de paisagem, sendo o primeiro baseado na expectativa de um raio na paisagem de, aproximadamente, metade da dispersão máxima de uma determinada espécie (Jackson; Fahrig, 2012), no caso do *Hg. leucocelaenus*, um raio de voo de 5,7 quilômetros (km) (Causey; Kumm; Laemmert Jr., 1950), enquanto o segundo correspondeu a sua máxima distância. Cada um dos pontos foi georreferenciado e plotado em um mapa de uso de solo do estado de São Paulo (Ortofoto mosaico, criado por meio de classificação supervisionada com base em imagens *RapidEye* do ano de 2013, escala 1:10.000) da Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável (FBDS) (disponível em: <https://www.fbds.org.br/>) (Figuras 2 e 3). O mesmo foi utilizado para obtenção dos elementos da paisagem, de acordo com a classificação de uso de solo da FBDS: 1) Formação Florestal - Vegetação arbórea nativa de Mata Atlântica com dossel contínuo; 2) Água - Espelho d'água contínuo; 3) Área Antropizada - Áreas desprovidas de cobertura vegetal nativa; 4) Área Edificada - Áreas que apresentam construções (<https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/bases-cartograficas-continuas/15759-brasil.html>), 5) Formação não Florestal - Vegetação arbustiva ou herbácea nativa e 6) Silvicultura - Cultivos de *Eucalyptus* sp. ou *Pinus* sp.. Adicionalmente, modelos lineares generalizados (GLM - do inglês *Generalized Linear Models*) do tipo simples (univariados), com distribuição de erros Gaussiana, foram construídos empregando como variável preditora as classes de uso de solo e variável resposta os valores observados para os índices de diversidade theta S e theta $\hat{\pi}$, como forma de verificar uma possível influência das classes de uso de solo nos padrões de diversidade genética das populações amostradas.

Adicionalmente, análises da estrutura da paisagem foram realizadas tanto a nível local (Parque Estadual da Cantareira - PEC) quanto regional (Mesoregiões de Campinas, Metropolitana e Macro Metropolitana do estado de São Paulo). As análises em nível local tiveram como objetivo verificar a influência da configuração da paisagem na riqueza e

abundância de potenciais vetores do VFA a partir de um remanescente de floresta Atlântica, com base em dados de coletas de mosquitos realizadas mensalmente de fevereiro de 2015 a abril de 2017, por nosso grupo de pesquisa, durante o projeto “Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) no Parque Estadual da Cantareira e na Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos, Estado de São Paulo” (BIOTA – FAPESP, Processo: 2014/50444-5). Análises de maior abrangência buscaram verificar, por meio da construção de matrizes de resistência, a influência da estrutura da paisagem no padrão de dispersão temporal do VFA no estado de São Paulo, com base em dados de registros de epizootias em PNH, ao longo do ano de 2017, obtidas junto ao Ministério da Saúde, mediante lei de acesso à informação (ref. no. 25820004039202025). Maiores detalhes a respeito da metodologia utilizada e análises estatísticas encontram-se disponíveis nos dois artigos anexados (ANEXOS 1 e 2).

4. Resultados

4.1. Coletas de espécimes de *Haemagogus leucocelaenus*

Ao longo de todas as incursões a fragmentos de mata Atlântica, realizadas durante o período de estudo, foram coletados um total de 128 espécimes, sendo 84 adultos e 44 formas imaturas. Deste total, 91 (71%) indivíduos foram coletados na periferia dos fragmentos de vegetação (bordas florestais), enquanto 37 (29%) foram obtidos a partir das áreas núcleos (core) (Tabela 1, Figura 4).

Tabela 1. Número de espécimes adultos e formas imaturas (entre parênteses) de *Hg. leucoelaenus* obtidas a partir dos municípios amostrados, entre novembro de 2018 e dezembro de 2020.

Data de coleta	Municípios coletados																						Total de espécimes					
	Balsamo		Caraguatatuba				Igaratá		Mairiporã		Miracatu			São Paulo				São José do Rio Preto		Pindamonhagaba								
	Sitio Madalena		Sitio Paulo		Sitio João		Condomínio Pontal das Garças		PEC - Trilha do Pinheirinho		Legado das Águas			PEC - Setor administrativo		PEC - Trilha da Bica		Mata dos Macacos - INF		Mata dos Macacos - SUP		Parque Municipal Trabiju						
	Borda		Core		Core		Borda		Borda		Core		Borda			Borda		Core		Borda		Core						
♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	-	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂				
26/11/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(1)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(6)			
8/1/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4(0)			
15/01/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	2	0	-	-	-	-	5(0)			
24/01/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(1)	0(4)	0(4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(9)			
5/9/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(1)	0(6)	-	-	2(1)	3(1)	-	-	-	-	5(9)			
26/09/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(1)	0(1)	-	-	0(4)	0(9)	-	-	-	-	0(15)			
2/11/2019	-	-	-	-	3	0	0	0(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3(1)			
3/11/2019	-	-	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4(0)			
4/12/2019	-	-	-	-	-	-	-	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2(0)			
10/12/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0	12(0)			
11/12/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0	7(0)			
18/12/2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	2(0)			
15/01/2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	0(2)	1	0	0	0(1)	-	-	-	-	2(4)			
27/01/2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2(0)			
15/12/2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	12(0)			
16/12/2020	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7(0)			
18/12/2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	17(0)			
Total	7	0	4	0	3	0	0	0(1)	2	0	6(1)	0	0(1)	0(4)	0(4)	3(3)	0(9)	4	0	4(9)	3(12)	12	0	17	0	19	0	84(44)



Figura 4. Vista lateral de uma fêmea da espécie *Haemagogus leucocelaenus* (fonte: Oliveira-Christe, R).

4.2. Diversidade genética

Em função da ausência do sequenciamento do genoma completo da espécie *Hg. leucocelaenus*, com disponibilidade apenas de seu genoma mitocondrial (NC_057212.1), foi possível genotipar um total de 115 SNP's mitocondriais - taxa de genotipagem: 51,11% (Figura 5). Ao utilizarmos o genoma completo de referência da espécie *Aedes aegypti* (AaegL5.0), ideia original do projeto, foi possível a genotipagem de 8.581 SNP's nucleares – taxa de genotipagem: 4,68%. Contudo, ao nos depararmos com o grande volume de dados ausentes, optamos por trabalhar com genoma de referência correspondente à espécie objeto de estudo, visando garantir uma maior robustez em nossas análises subsequentes.

Do total de SNP's (115), as populações apresentaram em média 23 *loci* exibindo valores inferiores a 25% de dados ausentes (sítios podendo apresentar qualquer um dos quatro nucleotídeos: C, T, A e G), das quais, Pindamonhangaba apresentando o maior número de *loci* (48), enquanto Miracatu exibiu a menor quantidade (3). Com relação ao polimorfismo exibido pelos *loci* utilizados nas análises, novamente Pindamonhangaba exibiu o maior valor (31), seguida pelos municípios de São José do Rio Preto e Balsamo, 24 e 17, respectivamente. Com estas mesmas três populações exibindo os maiores valores para os índices de diversidade theta (θ): Pindamonhangaba ($\theta_S=10,96$, $\theta_{\hat{\pi}} = 9,53$); Balsamo ($\theta_S= 6,94$, $\theta_{\hat{\pi}} = 6,05$), e São José do Rio Preto ($\theta_S=6,50$, $\theta_{\hat{\pi}} = 6,26$). Por outro lado, Miracatu não exibiu qualquer variabilidade genética ($\theta_S= 0$, $\theta_{\hat{\pi}} = 0$), seguido por São Paulo ($\theta_S=1,31$, $\theta_{\hat{\pi}} = 0,56$); Igaratá ($\theta_S=2$, $\theta_{\hat{\pi}} = 2$); Mairiporã ($\theta_S=2,44$, $\theta_{\hat{\pi}} = 1,66$) e Caraguatatuba ($\theta_S=2,69$, $\theta_{\hat{\pi}} = 2,21$) (Tabela 2).

Tabela 2. Índices de diversidade molecular mitocondrial entre as populações (nível permitido de dados ausentes < 25%)

		SP	MA	IG	RP	CA	BA	PI	MI	Média	dp
Número de Haplótipos		26	7	2	23	8	7	10	7	11.25	8.515
Composição de nucleotídeo											
C(%)		30.97	28.4	28.57	28.71	30.35	30.79	31.14	32.48		
T(%)		29.1	29.14	31.75	30.07	30.1	29.48	28.94	25.91		
A(%)		26.05	26.42	24.6	21.65	23.38	20.96	24.29	30.66		
G(%)		13.88	16.05	15.08	19.57	16.17	18.78	15.63	10.95		
Número de loci		115	115	115	115	115	115	115	115	115	0
Número de loci utilizados		8	14	40	35	8	31	48	3	23.375	17.121
Número de loci polimórficos		5	6	2	24	7	17	31	0	11.5	11.225
Número de cópias de gene	Mean	21	6.333	2	19.792	7.143	6.588	9.032	0		
	sd	0.707	0.516	0	1.503	0.378	0.507	0.706	0		
Número de alelos	Mean	2	2	2	2	2	2	2	0		
	sd	0	0	0	0	0	0	0	0		
Heterozigosidade Esperada	Mean	0.17538	0.35079	1	0.35862	0.39456	0.40168	0.38292	0		
	sd	0.09365	0.09242	0	0.15464	0.13941	0.11801	0.12529	0		
Número de transições		5	6	1	24	7	17	31	0	11.375	11.351
Número de transversões		0	0	1	0	0	0	0	0	0.125	0.354
Número de substituições		5	6	2	24	7	17	31	0	11.5	11.225
Número de indels		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número de substituições privadas		0	0	0	1	0	0	1	0	0.25	0.463
Theta S		1.31029	2.44898	2	6.50263	2.69972	6.93878	10.9581	0	4.10731	3.67526
s.d. Theta S		0.69266	1.41218	1.732	2.45405	1.47924	3.44244	4.75643	0	1.99613	1.52513
Theta $\hat{\pi}$		0.56615	1.66667	2	6.26087	2.21429	6.04762	9.53333	0	3.53612	3.35144
s.d. Theta $\hat{\pi}$		0.53016	1.26802	2.45	3.43962	1.55185	3.75566	5.40757	0	2.3003	1.81832

SP – São Paulo; MA – Mairiorã; IG – Igaratá, RP – São José do Rio Preto; CA – Caraguatatuba; BA – Balsamo; PI – Pindamonhangaba; MI – Miracatu; dp – desvio padrão.

4.3. Teste de neutralidade

Com relação ao teste de neutralidade, para verificação de sinais de expansão ou retração populacional, somente as populações de São Paulo e Mairiporã apresentaram

concordância para o nível de significância estatísticas para os testes de Tajima's D e Fu's FS, ambas com valores negativos, e sugerindo dessa forma, eventos de expansão. Com relação às demais, nenhum nível de significância foi observado a partir do primeiro teste, enquanto para o segundo é possível verificar valores negativos e estatisticamente significantes para as populações São José do Rio Preto, Caraguatatuba, Balsamo e Pindamonhangaba (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de neutralidade baseado nas populações de *Haemagogus leucocelaenus* amostradas

Teste de Neutralidade	Estatística	SP	MA	IG	RP	CA	BA	PI	MI
Tajima's D	Tajima's D	-1.60937	-1.62291	0	-0.13906	-0.85567	-0.7151	-0.62518	0
	p-valor Tajima's D	0.026	0.003	1	0.535	0.222	0.265	0.308	1
Fu's FS	FS	-3.40282E+38	-6.42258	0.6932	-21.3184	-6.82143	-2.567	-3.6223	1E-06
	p-valor FS	0	0	0.367	0	0	0.031	0.021	1

SP – São Paulo; MA – Mairiorã, IG – Igaratá; RP – São José do Rio Preto; CA – Caraguatatuba; BA – Balsamo; PI – Pindamonhangaba; MI – Miracatu.

4.4. Estrutura genética

Com relação aos valores de F_{ST} , quando as populações são agrupadas por mesorregiões é possível verificar um claro padrão de estruturação da região de São José do Rio Preto em relação às demais, ao passo que o Vale do Ribeira exibiu um menor grau em relação às regiões Metropolitana e Vale do Paraíba (Figura 6A). Quando as comparações são obtidas por meio de combinações par a par entre as populações, o maior valor foi registrado entre os municípios de Igaratá x Miracatu (1), seguido por Balsamo x São Paulo (0.74982); Balsamo x Mairiporã (0.67021); São Paulo x São José do Rio Preto (0.6422), e Balsamo x Igaratá (0.62904). De modo geral, as duas populações localizadas na mesorregião de São José do Rio Preto (São José do Rio Preto e Balsamo) exibiram os maiores valores na maioria de suas comparações com os demais municípios amostrados, e destas o menor valor registrado ocorreu justamente na comparação entre os próprios (0.1099). Por outro lado, o menor valor exibido em todas as comparações, foi registrado entre São Paulo x Mairiporã (0.0201) (Tabela 4, Figura 6B).

De modo geral, os valores observados para o índice F_{ST} encontram-se em concordância com as distâncias geográficas entre os locais de coleta. A variável além de evidenciar uma forte associação com o padrão de estruturação observado, responde sozinha por cerca de 45% do mesmo, sugerindo dessa forma, um nítido efeito de isolamento por distância ($r^2: 0.4593$; $p\text{-value} < 0,001$, Tabela 5, Figura 7). As distâncias entre os locais variaram entre 5 e 535 km, com as populações localizadas na mesorregião de São José do Rio Preto exibindo distâncias entre si não superiores a 30 km, e distâncias entre 400 e 535 km com relação as demais, enquanto estas últimas, por sua vez, exibiram distâncias entre 5 e 230 km umas das outras, na comparação par a par.

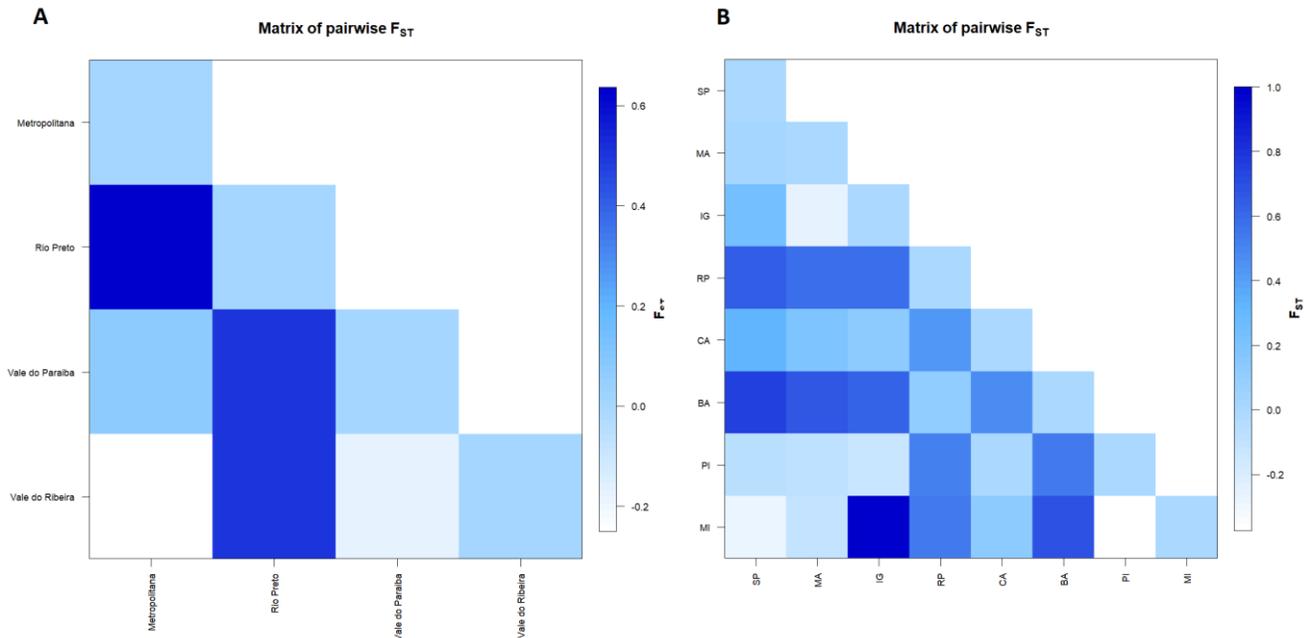


Figura 6. Valores para a par de F_{ST} , com base nas mesorregiões de abrangência das áreas de coletas no estudo (A), e por município amostrado (B): SP, São Paulo; MA – Mairiporã; IG, Igaratá; RP, São José do Rio Preto; CA, Caraguatatuba; BA, Balsamo; PI, Pindamonhangaba; e MI, Miracatu.

Tabela 4. Índice de fixação populacional F_{ST} , par a par, das populações do *Haemagogus leucocelaeus* amostradas, com base nos SNP's mitocondriais

	Sao Paulo	Mairiporã	Igaratá	São José do Rio Preto	Caraguatatuba	Balsamo	Pindamonhangaba
Sao Paulo	-	-	-	-	-	-	-
Mairiporã	0.0201	-	-	-	-	-	-
Igaratá	0.23701	0	-	-	-	-	-
São José do Rio Preto	0.6422*	0.57456*	0.58807*	-	-	-	-
Caraguatatuba	0.327*	0.18962*	0.12272	0.42301*	-	-	-
Balsamo	0.74982*	0.67021*	0.62904*	0.1099	0.46729*	-	-
Pindamonhangaba	0	0	0	0.5248*	0	0.54075*	-
Miracatu	0	0	1	0.5311*	0.12608	0.68457*	0

* nível de significância para $p < 0.05$.

Tabela 5. Modelo linear utilizando com variável preditora as distâncias geográficas entre os locais de coleta e variável resposta os valores de F_{ST} obtidos por meio das comparações par a par entre as populações.

Variável Preditora	Intercepto	Inclinação	EP	t-valor	Pr(> z)	r ²	F	GL	p-valor
Distância	-1.9368		0.5933	-3.264	0.003173 **	0.4593	21.24	25	0.0001027
		0.5207	0.1130	4.609	0.000103 ***				

EP – Erro Padrão; F – Estatística F; GL – Grau de Liberdade; *** nível de significância para $p < 0.001$; ** nível de significância para $p < 0.01$.

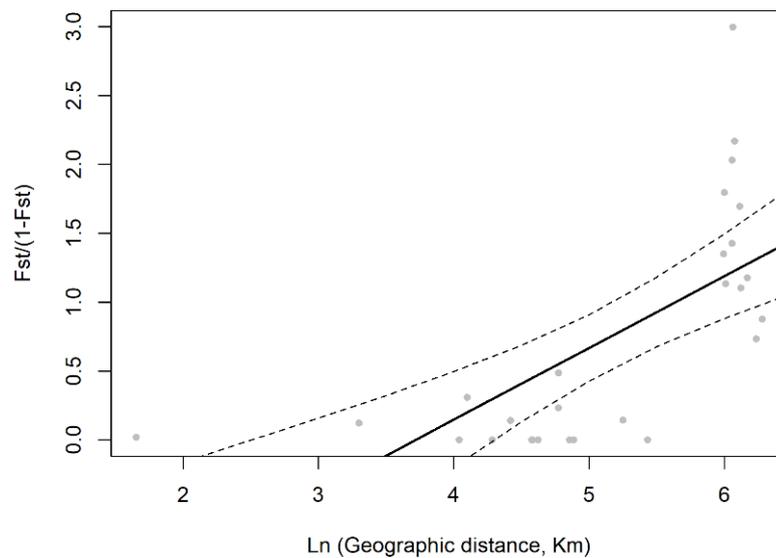


Figura 7. Correlação linear entre a distância genética ($F_{ST}/(1 - F_{ST})$) das populações de *Haemagogus leucocelaenus* e distância geográfica (Km), em escala logarítmica natural, a partir dos locais amostrados. Pontos cinzas representam a distribuição dos dados, a linha preta representa o ajuste do modelo, enquanto as linhas tracejadas representam um intervalo de confiança de 95%.

Por meio da análise de escalonamento multidimensional (MDS) foi possível verificar uma maior proximidade dos espécimes amostrados na região noroeste do estado de São Paulo (municípios de Balsamo e São José do Rio Preto), com estes exibindo uma maior proximidade entre si no espaço bidimensional, quando comparada as demais, enquanto Caraguatatuba é exibida segregada das demais, com estas últimas reunidas próximas umas das outras (Figura 8). Tal padrão foi corroborado por meio das análises de agrupamento hierárquico, sendo possível verificar uma clara segregação dos espécimes de Balsamo e São José do Rio Preto, quer seja quando as populações são agrupadas por mesorregiões ou identificadas por seus respectivos municípios de coleta. Quando a comparação é realizada com base nas mesorregiões

é possível verificar os espécimes da região de São José do Rio Preto constituindo um clado separado, sendo imediatamente seguido pelo Vale do Ribeira, enquanto as mesorregiões metropolitana e Vale do Paraíba são reunidas em um único clado. Quando os espécimes são reunidos por seus respectivos municípios de coleta é possível verificar novamente o mesmo padrão de segregação, no qual as populações de Balsamo e São José do Rio Preto são reunidas em um clado distinto, com os espécimes de Caraguatatuba exibidos em um segundo clado, sendo este último imediatamente seguido pela demais populações que são exibidas em um terceiro clado: no qual Miracatu constitui um ramo mais externo, enquanto Pindamonhangaba e São Paulo, e Igaratá e Mairiporã constituem dois outros ramos, respectivamente (Figuras 9 e 10).

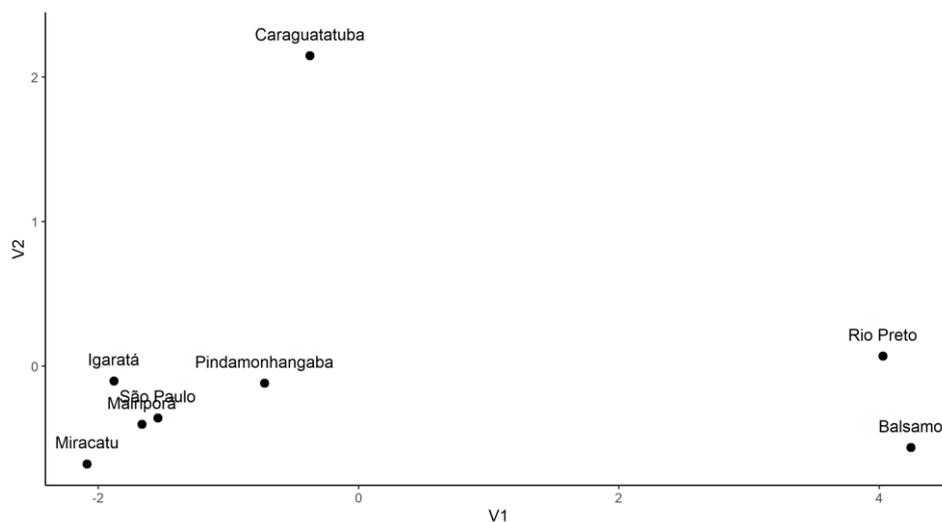


Figura 8. Análise de Escalonamento Multidimensional (MDS) obtida por meio das distâncias euclidianas entre as frequências alélicas das populações, observadas para os SNP's mitocondriais.

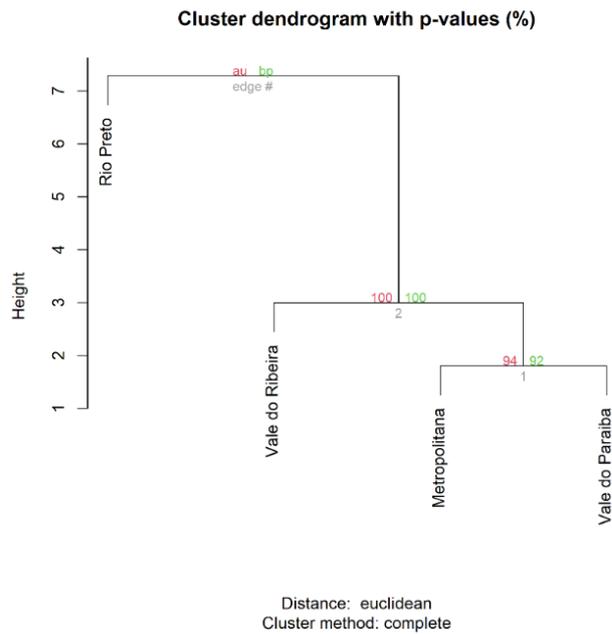


Figura 9. Dendrograma exibindo as populações agrupadas por mesorregiões, com base nas distâncias euclidianas entre as suas frequências alélicas, observadas para os SNP's mitocondriais (1.000 aleatorizações).

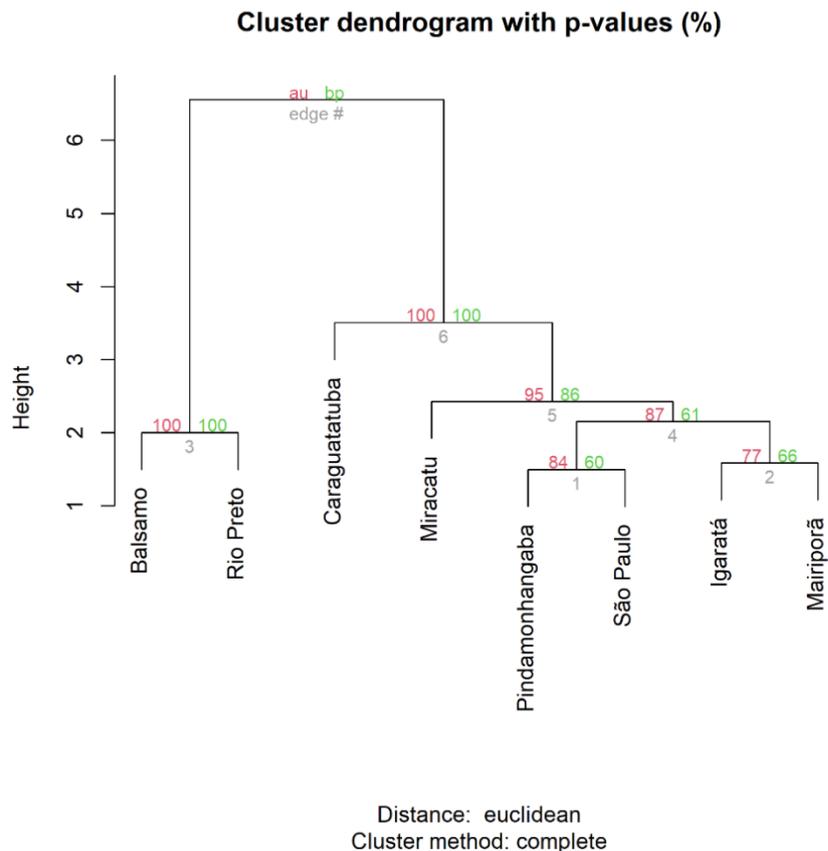


Figura 10. Dendrograma exibindo o agrupamento das populações amostradas, com base nas distâncias euclidianas entre as suas frequências alélicas, observadas para os SNP's mitocondriais (1.000 aleatorizações).

A análise DPCA, novamente, evidenciou uma sobreposição dos espécimes amostrados na região noroeste do estado de São Paulo, com alguns poucos indivíduos das populações de Pindamonhangaba e São Paulo exibindo uma maior similaridade com os indivíduos de Balsamo e São José do Rio Preto, entretanto, a maioria dos espécimes destas duas primeiras, bem como das demais populações aparecem sobrepondo-se, de modos a constituir, praticamente um único agrupamento (Figura 11). Por meio dos resultados obtidos a partir do *eigenvalues*, foi possível a identificação de três grupos (K=3) como melhor representação do conjunto de dados, dos quais as populações do noroeste paulista (Balsamo e São José do Rio Preto) constituindo dois grupos genéticos distintos, enquanto as demais aparecem, praticamente, homogeneizadas e integrando um único grupo (Figura 12). Quando comparado o padrão de assinatura genética dos indivíduos, foi possível verificar uma clara correspondência entre os indivíduos coletados a partir de Balsamo e São José do Rio Preto, enquanto as demais, novamente, configuram um agrupamento homogêneo (Figura 13).

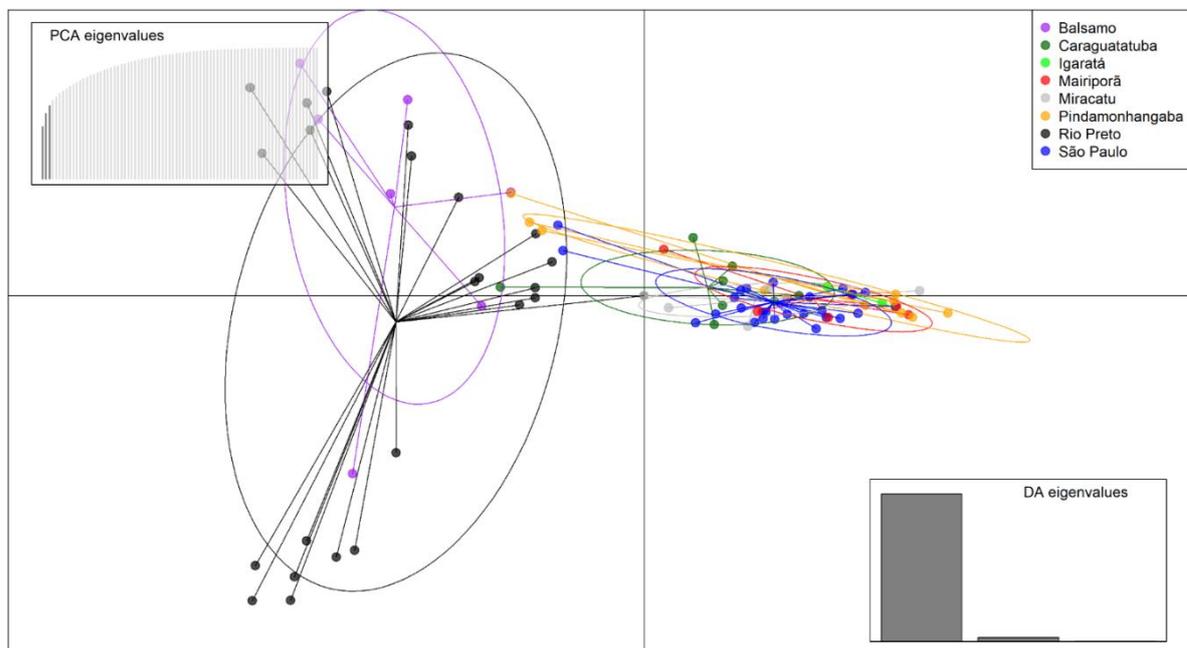


Figura 11. Análise Discriminante dos Componentes Principais (DAPC) com base nos indivíduos amostrados a partir dos oito municípios de coleta.

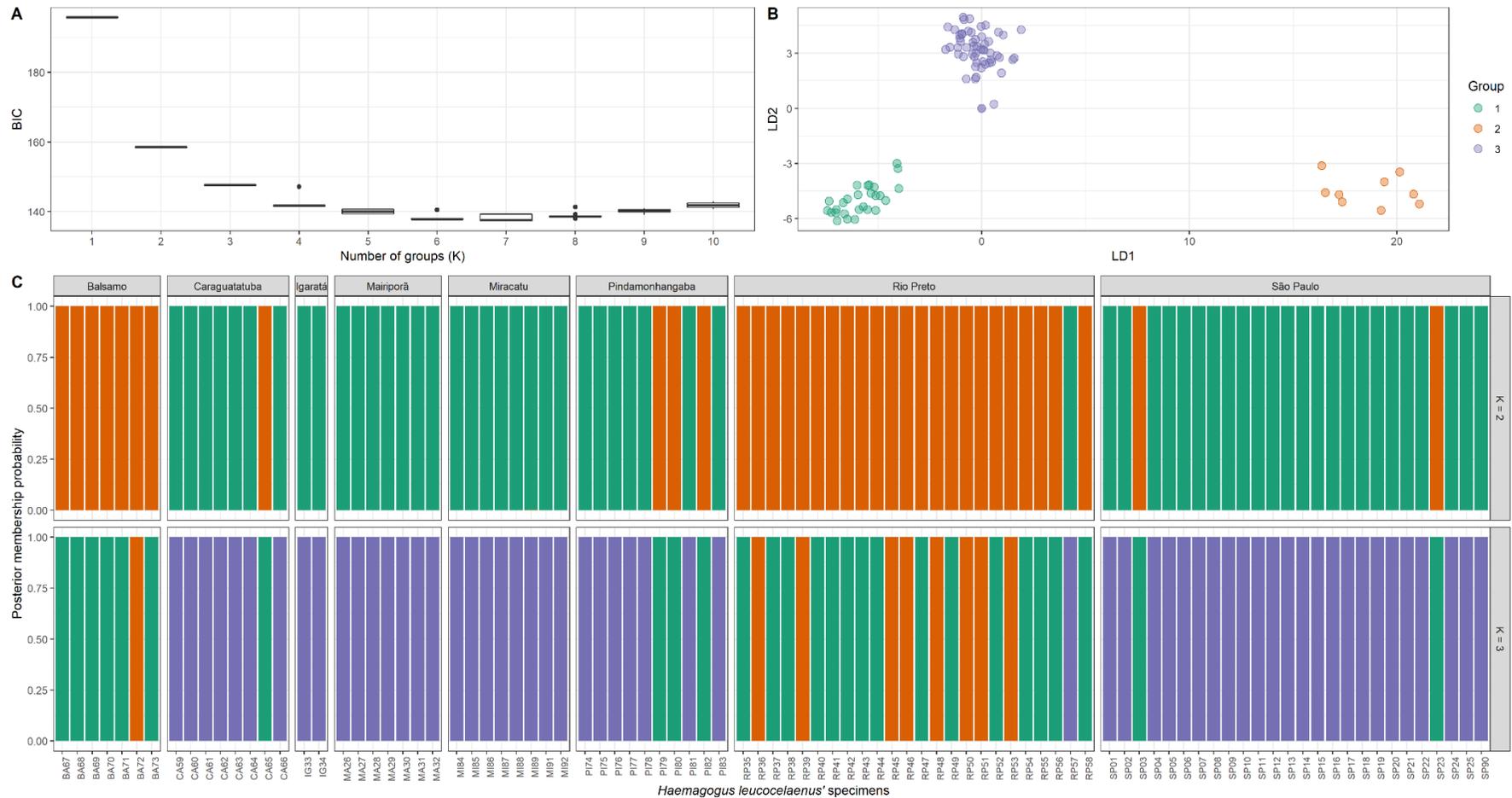


Figura 12. Multipanel identificando a estrutura populacional dos espécimes de *Haemagogus leucocelaenus* amostrados. A e B, número de agrupamentos genéticos (K); e C, subdivisão dos espécimes para K=2 e K=3. Cada um dos 92 exemplares para as 8 populações amostradas é representado por uma linha vertical.

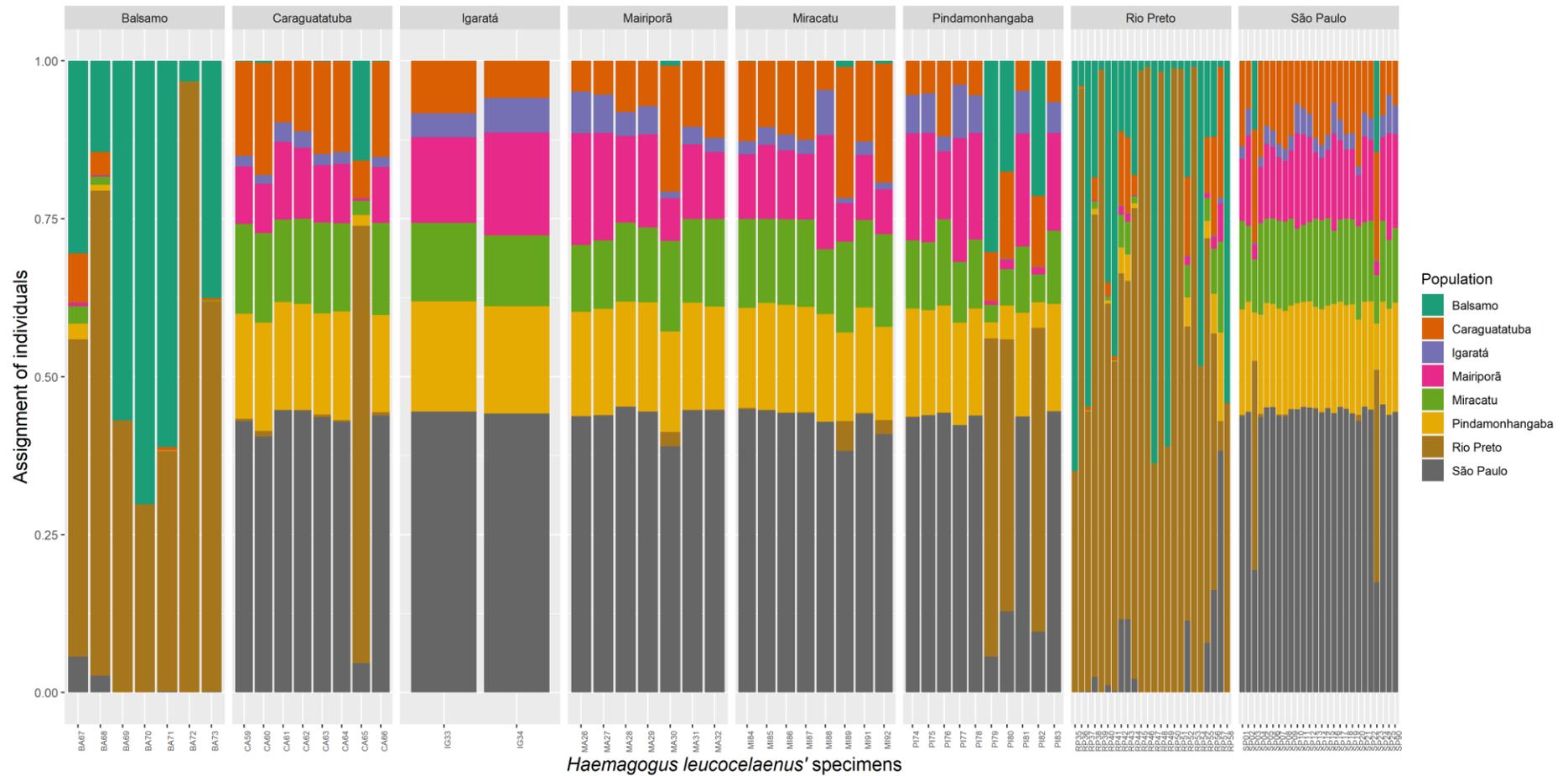


Figura 13. Probabilidade de assinatura genéticas dos indivíduos a um determinado agrupamento em contraste a população original. Os indivíduos aparecem identificados pelas linhas verticais, enquanto o comprimento dos segmentos representa a probabilidade dos indivíduos pertencerem a um determinado agrupamento genéticos contra a população original.

4.5. Métricas da paisagem e Modelos Lineares Generalizados

Quando comparada as métricas de paisagem a partir dos *buffers* de 2.850 metros (bf2850m) e 5.700 metros (bf5700m) os locais a apresentar maior diversidade genética exibiram um padrão de elevada proporção para o uso antrópico, ao menos para os municípios de Balsamo (bf2850m – 79,7%; bf5700m – 76,9%) e São José do Rio Preto (bf2850m – 92,9%; bf5700m – 84,9%), enquanto Pindamonhangaba, na comparação a estes dois, apresentou 32% e 50,1%, bf2850m e bf5700m, respectivamente (Tabela 6, Figura 14 e Anexo 3). Interessantemente, ao comparar a influência das classes de uso de solo nos índices de diversidade observados - por meio de modelos lineares generalizados -, a classe antrópica foi a única a apresentar associação com o padrão observado, principalmente, quando a mesma foi obtida com base no *buffer* de 5.700 metros ao redor dos pontos de coleta. A área antrópica evidenciou um melhor ajuste para o índice theta $\hat{\pi}$ (*slope* = 0.07598, *p-value* = 0.03417), com uma contribuição de, aproximadamente, 55% do padrão observado (M2pi_5700m); enquanto para o índice theta S, foi exibido um menor ajuste (*slope* = 0.07723, *p-value* = 0.05826), e contribuição de, aproximadamente, 48% do padrão observado (M2S_5700m) (Tabelas 7 e 8).

Outra característica em comum entre os municípios que exibiram maiores valores para os índices de diversidade genética é a baixa proporção de cobertura florestal, com Balsamo e São José do Rio Preto exibindo os menores valores, (bf2850m – 13,8% e bf5700m – 12,5%) e (bf2850m – 4,3% e bf5700m – 5,8%), respectivamente, enquanto Pindamonhangaba, por sua vez, apresentou 66% (bf2850m) e 47,6% (bf5700m) (Figuras 14 e Anexo 3). Contudo, não foi possível verificar nenhuma associação desta classe com o padrão observado (Tabelas 2, 7 e 8). Referente a quantidade de borda florestal (metros lineares), os três municípios apresentaram valores entre 65 e 161 mil (bf2850m) e 267 a 601 mil metros (bf5700m), com uma densidade de 10 à 63 metros por hectare (m/ha) (bf2850m) e 16 à 58 m/ha (bf5700m) (Tabela 6).

Tabela 6. Métricas de paisagem com base em *buffers* com raios de 2.850 e 5.700 metros ao redor dos locais de coleta.

Buffer	Município	Local	Classe de uso de solo														Área total (m ²)
			Água		Antrópica		Urbana		Floresta				Não Floresta		Silvicultura		
			CA	PLAND	CA	PLAND	CA	PLAND	CA	PLAND	TE	ED	CA	PLAND	CA	PLAND	
2850 metros	Balsamo	i	1.8	0.0705	2033.37	79.6734	0	0	352.08	13.7955	65880	25.8137	0	0	164.88	6.4605	2552.13
	Caraguatatuba	ii	0.36	0.0141	522.45	20.46425	0	0	2030.175	79.52165	67230	26.33385	0	0	0	0	2552.985
		iii	11.34	0.4987	306.9	13.4975	859.32	37.7929	1086.3	47.7755	103140	45.361	0	0	9.9	0.4354	2273.76
	Igaratá	iv	1022.94	40.079	1153.71	45.2026	0	0	346.86	13.59	94140	36.8842	0	0	28.8	1.1284	2552.31
	Mairiporã	v	2.7	0.1058	136.53	5.3491	353.88	13.8646	2059.29	80.6805	123960	48.5661	0	0	0	0	2552.4
	Miracatu	vi	174.87	6.8507	29.52	1.1565	0	0	2348.19	91.9928	40500	15.8663	0	0	0	0	2552.58
	São Paulo	vii	4.905	0.19215	140.04	5.48575	1146.735	44.92045	1252.08	49.0473	108570	42.5297	0	0	9.045	0.35435	2552.805
		viii	4.995	0.1957	165.87	6.4978	838.035	32.8292	1534.995	60.1319	111240	43.5771	0	0	8.82	0.34555	2552.715
	São José do Rio Preto	ix	4.365	0.171	2372.895	92.9492	36.945	1.44715	111.555	4.36975	28590	11.19905	0	0	27.135	1.0629	2552.895
	Pindamonhangaba	x	3.87	0.1516	2371.725	92.90665	41.625	1.63055	108.855	4.26415	28020	10.97615	0	0	26.73	1.0471	2552.805
		xi	0.27	0.0106	822.15	32.1995	0	0	1684.53	65.9746	161730	63.3416	0	0	46.35	1.8153	2553.3
5700 metros	Balsamo	i	16.65	0.1632	7851.15	76.9336	0	0	1276.29	12.5064	267750	26.2369	0	0	1061.01	10.3969	10205.1
	Caraguatatuba	ii	3.24	0.03175	2603.25	25.5045	0	0	7600.545	74.4638	209895	20.56375	0	0	0	0	10207.035
		iii	21.78	0.265	1255.59	15.276	1546.11	18.8106	5371.56	65.3527	257400	31.3164	0	0	24.3	0.2956	8219.34
	Igaratá	iv	2605.14	25.5267	5523.84	54.1258	53.82	0.5274	1578.6	15.4681	361650	35.4366	0	0	444.15	4.352	10205.55
	Mairiporã	v	32.94	0.3227	1217.43	11.9282	2389.77	23.4145	6562.17	64.2949	617550	60.5064	0.36	0.0035	3.69	0.0362	10206.36
	Miracatu	vi	288.36	2.8254	82.35	0.8069	0	0	9835.38	96.3678	91140	8.93	0	0	0	0	10206.09
	São Paulo	vii	9.585	0.0939	455.58	4.4636	5899.905	57.8046	3832.515	37.54925	295275	28.92975	0	0	9.045	0.08865	10206.63
		viii	13.635	0.1336	489.51	4.7961	5406.615	52.97275	4287.69	42.0098	347880	34.08445	0.135	0.00135	8.82	0.08645	10206.405
	São José do Rio Preto	ix	21.735	0.21295	8666.595	84.9088	831.69	8.1483	595.17	5.83105	165270	16.1919	0	0	91.755	0.89895	10206.945
	Pindamonhangaba	x	18	0.17635	8656.56	84.812	850.95	8.33715	585.945	5.74075	163425	16.01145	0	0	91.665	0.8981	10203.12
		xi	20.7	0.2028	5109.57	50.0538	0	0	4859.64	47.6054	601260	58.8999	0	0	218.25	2.138	10208.16

CA – Área total; PLAND – Porcentagem da paisagem ocupada pela classe de uso de solo; TE – Total de borda florestal (metros lineares); ED – Densidade de borda florestal (metros por hectare); i - Sítio Madalena; ii - Sítio João; iii - Sítio Paulo; iv - Condomínio Pontal das Garças; v - Trilha do Pinheirinho; vi - Reserva Ecológica Legado das Águas; vii - Trilha da Bica; viii - Setor administrativo; ix - Mata dos Macacos (fragmento de vegetação inferior); x - Mata dos Macacos (fragmento de vegetação superior); e xi - Parque Municipal Trabiju.

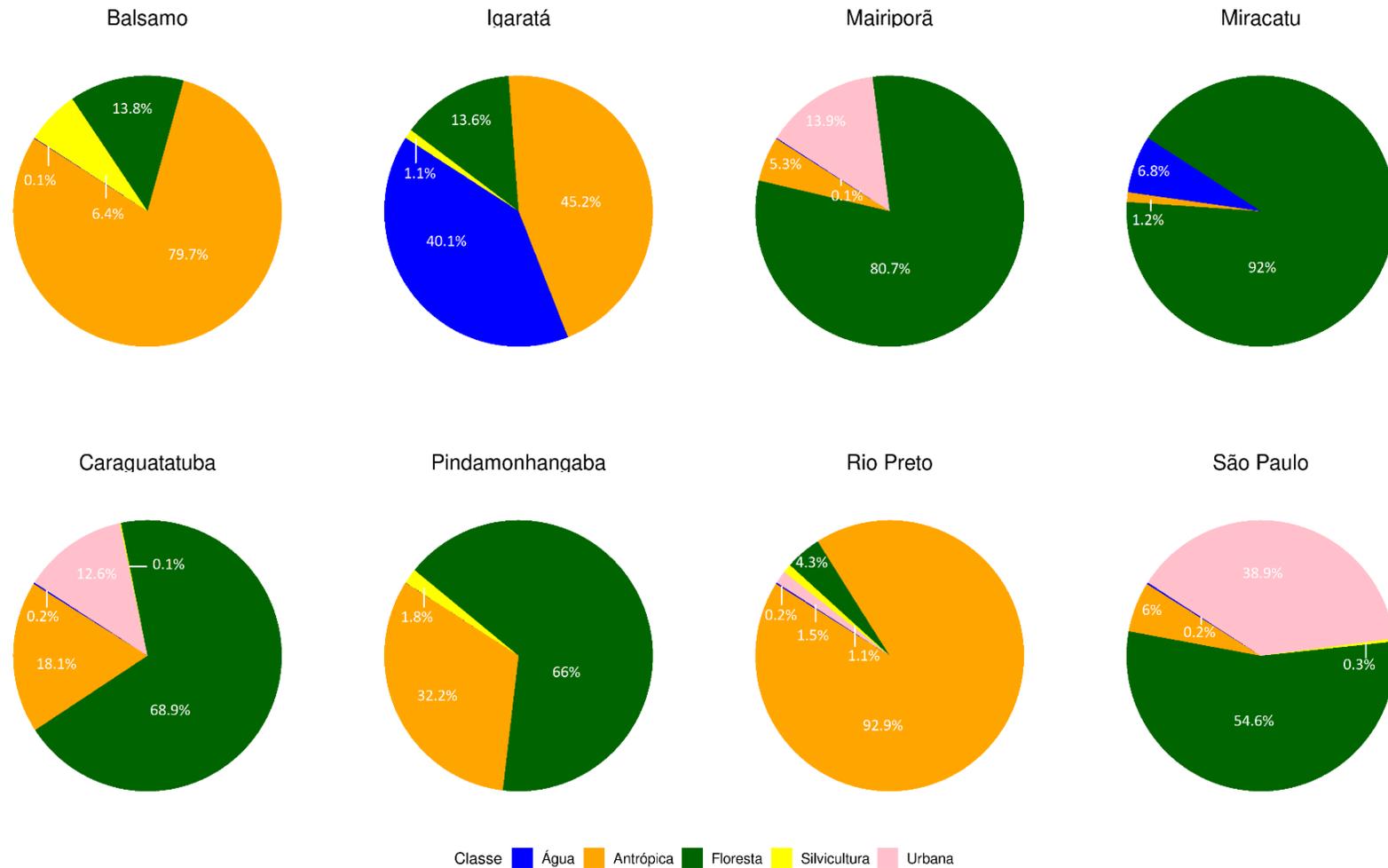


Figura 14. Configuração da paisagem obtida por meio de *buffers* de 2.850m - metade da distância máxima de dispersão da espécie *Haemagogus leucocelaenus* (Causey et al., 1950) - ao redor dos pontos de coleta, conforme raio de dispersão esperado por Jackson & Fahrig (2012) para uma determinada espécie.

Tabela 7. Modelos lineares generalizados utilizando como variável preditoras as classes de uso de solo e variável resposta o índice de diversidade theta S.

Modelos	Variável Resposta	Variável Preditora	Intercepto	Inclinação	EP	t-valor	Pr(> z)	r ²	F	GL	p-valor
M1S_2850m	theta S	Água	4.59829		1.46422	3.14	0.0201 *	0.09843	0.6551	6	0.4492
				-0.08244	0.10185	-0.809	0.4492				
M2S_2850m	theta S	Antrópica	1.99924		1.68306	1.188	0.28	0.329	2.941	6	0.1372
				0.06009	0.03504	1.715	0.137				
M3S_2850m	theta S	Urbana	5.04073		1.52613	3.303	0.0163 *	0.1721	1.248	6	0.3067
				-0.11166	0.09997	-1.117	0.3067				
M4S_2850m	theta S	Floresta	5.87074		2.44473	2.401	0.0532 .	0.1093	0.7365	6	0.4237
				-0.03582	0.04173	-0.858	0.4237				
M5S_2850m	theta S	Silvicultura	2.8586		1.4329	1.995	0.0931 .	0.2864	2.408	6	0.1717
				0.9119	0.5877	1.552	0.1717				
M6S_2850m	theta S	ED	1.71488		3.14653	0.545	0.605	0.1049	0.7034	6	0.4338
				0.06902	0.0823	0.839	0.434				
M7S_2850m	theta S	TE	1.70E+00		3.12E+00	0.545	0.605	0.108	0.7265	6	0.4267
				2.74E-05	3.21E-05	0.852	0.427				
M1S_5700m	theta S	Água	4.5354		1.4739	3.077	0.0217 *	0.0787	0.5125	6	0.501
				-0.1162	0.1623	-0.716	0.501				
M2S_5700m	theta S	Antrópica	1.15875		1.62083	0.715	0.5015	0.476	5.451	6	0.05826
				0.07723	0.03308	2.335	0.0583 .				
M3S_5700m	theta S	Urbana	4.92998		1.55404	3.172	0.0193 *	0.1364	0.9479	6	0.3678
				-0.07013	0.07203	-0.974	0.3678				
M4S_5700m	theta S	Floresta	6.38406		2.22982	2.863	0.0287 *	0.2026	1.524	6	0.2632
				-0.05156	0.04177	-1.235	0.2632				
M5S_5700m	theta S	Não Floresta	4.629		1.508	3.07	0.0219 *	0.08719	0.5731	6	0.4777
				-860.578	1136.74	-0.757	0.4777				
M6S_5700m	theta S	Silvicultura	3.2103		1.5494	2.072	0.0837 .	0.1544	1.095	6	0.3356
				0.3985	0.3808	1.047	0.3356				
M7S_5700m	theta S	ED	1.643		2.76258	0.595	0.574	0.1454	1.021	6	0.3513
				0.07531	0.07454	1.01	0.351				
M8S_5700m	theta S	TE	1.66E+00		2.73E+00	0.61	0.564	0.1477	1.04	6	0.3472
				7.38E-06	7.24E-06	1.02	0.347			7	
Null Model	theta S		4.107		1.30E+00	3.16E+00	0.0159 *				

EP – Erro Padrão; F – Estatística F; GL – Grau de Liberdade; *** nível de significância para $p < 0.001$; ** nível de significância para $p < 0.01$; * nível de significância para $p < 0.05$.

Tabela 8. Modelos lineares generalizados utilizando como variável preditoras as classes de uso de solo e variável resposta o índice de diversidade theta $\hat{\pi}$.

Modelos	Variável Resposta	Variável Preditora	Intercepto	Inclinação	EP	t-valor	Pr(> z)	r ²	F	GL	p-valor
M1pi_2850m	theta $\hat{\pi}$	Água	3.91061		1.35692	2.882	0.028 *	0.06887	0.4438	6	0.5301
				-0.06288	0.09439	-0.666	0.53				
M2pi_2850m	theta $\hat{\pi}$	Antrópica	1.41377		1.45007	0.975	0.3672	0.401	4.016	6	0.0919
				0.0605	0.03019	2.004	0.0919 .				
M3pi_2850m	theta $\hat{\pi}$	Urbana	4.52117		1.34167	3.37	0.015 *	0.2306	1.798	6	0.2285
				-0.11784	0.08788	-1.341	0.229				
M4pi_2850m	theta $\hat{\pi}$	Floresta	5.41905		2.17796	2.488	0.0473 *	0.1499	1.058	6	0.3433
				-0.03824	0.03718	-1.029	0.3433				
M5pi_2850m	theta $\hat{\pi}$	Silvicultura	2.3998		1.3077	1.835	0.116	0.2852	2.394	6	0.1728
				0.8298	0.5363	1.547	0.173				
M6pi_2850m	theta $\hat{\pi}$	ED	1.86668		2.93816	0.635	0.549	0.06144	0.3928	6	0.5539
				0.04816	0.07685	0.627	0.554				
M7pi_2850m	theta $\hat{\pi}$	TE	1.85E+00		2.91E+00	0.634	0.55	0.06397	0.41	6	0.5456
				3.00E-05	3.00E-05	0.64	0.546				
M1pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	Água	3.85752		1.36241	2.831	0.0299 *	0.05335	0.3381	6	0.5821
				-0.08723	0.15001	-0.581	0.5821				
M2pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	Antrópica	0.63527		1.36349	0.466	0.6577	0.5541	7.455	6	0.03417
				0.07598	0.02783	2.73	0.0342 *				
M3pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	Urbana	4.40785		1.37735	3.2	0.0186 *	0.1842	1.355	6	0.2886
				-0.07431	0.06384	-1.164	0.2886				
M4pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	Floresta	5.77105		1.99192	2.897	0.0274 *	0.2347	1.84	6	0.2237
				-0.05062	0.03731	-1.357	0.2237				
M5pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	Não Floresta	4.111		1.344	3.058	0.0223 *	0.1272	0.8746	6	0.3858
				947.928	1013.598	-0.935	0.3858				
M6pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	Silvicultura	2.6975		1.4062	1.918	0.104	0.1622	1.162	6	0.3225
				0.3726	0.3456	1.078	0.322				
M7pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	ED	1.66811		2.58455	0.645	0.543	0.1005	0.6702	6	0.4443
				0.05709	0.06973	0.819	0.444				
M8pi_5700m	theta $\hat{\pi}$	TE	1.68E+00		2.55E+00	0.657	0.535	0.1029	0.6878	6	0.4386
				5.61E-06	6.77E-06	0.829	0.439				
Null Model	theta $\hat{\pi}$		3.536		1.19E+00	2.984	0.0204 *			7	

EP – Erro Padrão; F – Estatística F; GL – Grau de Liberdade; *** nível de significância para $p < 0.001$; ** nível de significância para $p < 0.01$; * nível de significância para $p < 0.05$

4.6. Análise da estrutura e configuração da paisagem

A análise da estrutura da paisagem em nível local, PEC, baseada na coleta de mosquitos com potencial envolvimento na transmissão do YFV, revelou um padrão de distintas abundâncias das espécies. Durante o período de abrangência do estudo foram coletados 703 mosquitos pertencentes a 12 espécies das tribos Aedini e Sabethini. *Aedes scapularis* e *Psorophora ferox* apresentaram elevada abundância, enquanto o *Haemagogus leucocelaenus*, principal vetor do VFA no estado de São Paulo, apresentou uma menor abundância, porém com seus espécimes sendo exibidos em todas as áreas amostradas (Figura 15).

O local com maior borda entre área florestal e área antrópica (Trilha do Pinheirinho) apresentou uma maior riqueza e abundância de espécies potencialmente vetoradas do VFA, enquanto o local com maior área de cobertura florestal e bordas mais curtas entre floresta e áreas antrópicas (Administração) apresentou um padrão inverso. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre a composição de espécies potencialmente vetoradas do VFA entre os locais investigados. Embora *Hg. leucocelaenus* tenha ocorrido em todos os locais amostrados, os diferentes padrões de distribuição e abundância de outros mosquitos como *Aedes scapularis* e *Psorophora ferox* sugerem que essas espécies podem estar envolvidas na transmissão de VFA silvestre na área de estudo. Informações mais detalhadas podem ser encontradas no ANEXO 2.

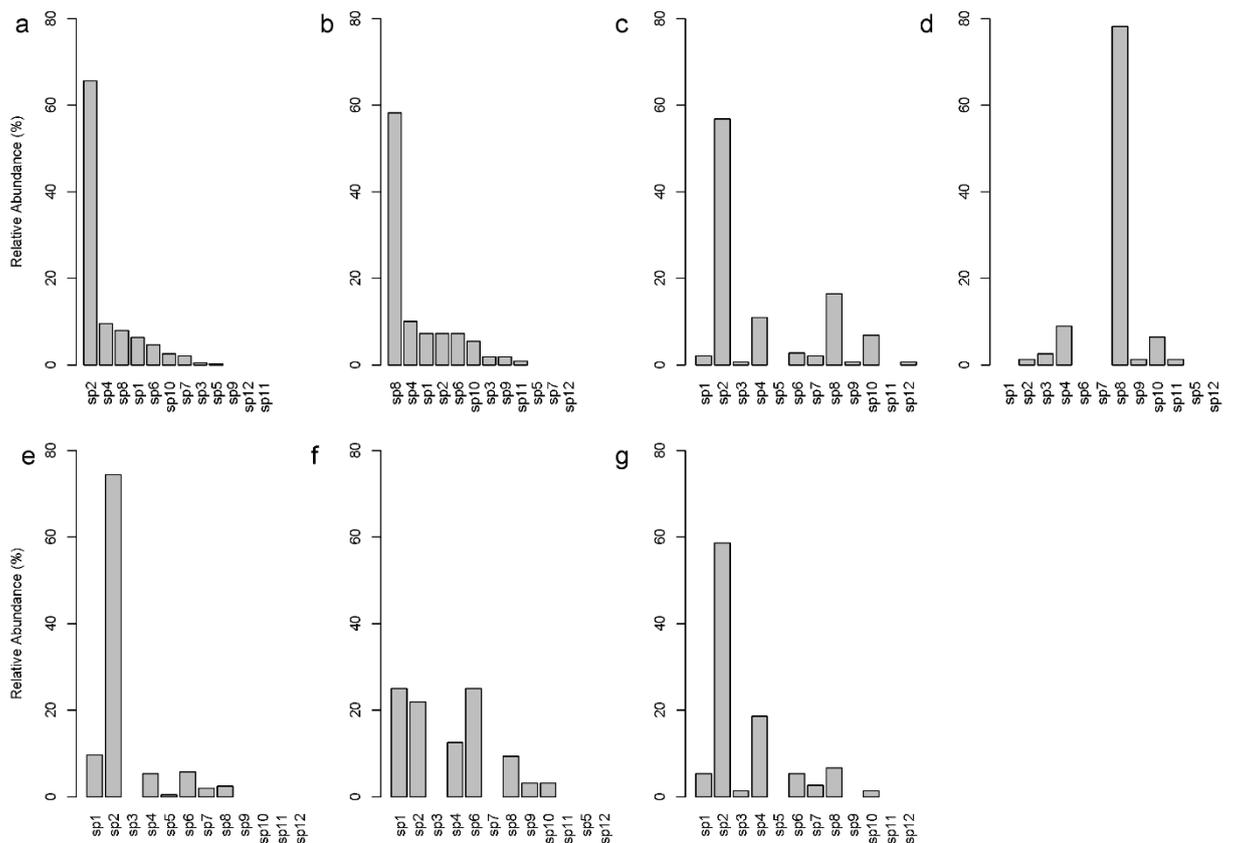


Figura 15. Proporção de dominância das espécies baseada nas três áreas amostradas no Parque Estadual da Cantareira. Coleções noturnas: a, c, e e g, Parque Estadual da Cantareira, Trilha do Pinheirinho, Trilha da Bica e Setor Administrativo, respectivamente. Coleções diurnas: b, d e f, Parque Estadual da Cantareira, Trilha do Pinheirinho e Trilha da Bica, respectivamente. sp1 - *Aedes fluviatilis*; sp2 - *Aedes scapularis*; sp3 - *Aedes serratus*; sp4 - *Aedes terreus*; sp5 - *Aedes aegypti*; sp6 - *Aedes albopictus*; sp7 - *Haemagogus leucocelaenus*; sp8 - *Psorophora ferox*; sp9 - *Sabethes undosus/fabrici/ignotus*; sp10 - *Sabethes purpureus*; sp11 - *Sabethes melanonymphe*, sp12 - *Sabethes sp.* A área do Setor Administrativo do parque foi removida das análises das coleções diurnas devido a sua baixa amostragem (somente três ao longo de todo o período de estudo).

Referente às análises da estrutura da paisagem de maior abrangência (Mesoregiões), com base nos registros de epizootias em PNHs, foi possível verificar um padrão de separação entre as ocorrências dos primeiros eventos de epizootias em cada um dos municípios amostrados (total de 20), sendo apresentada, em média, uma diferença de 74 dias e 29 km. O modelo de maior suporte empírico e força de evidência ($\Delta AIC = 0$, Weight = 0.4423) incluiu um efeito aditivo entre a distância geográfica dos locais de registro e uma matriz de resistência com bordas florestais mais ou menos permeáveis para dispersão do vírus, de acordo com suas classes de uso de solo adjacente, juntamente com uma resistência intermediária para as áreas núcleo de

floresta. Com o modelo sugerindo que ambos aumentos de distância geográfica e resistência associada as classes de uso de solo contribuem para um aumento no número de dias entre os primeiros registros de epizootias nos municípios amostrados (Tabela 9, Figura 16). Informações mais detalhadas podem ser encontradas no ANEXO 1.

Tabela 9. Modelos testados e seus parâmetros (efeitos fixos) listados de acordo para o grau de ajuste. Uma matriz de diferenças em dias para o primeiro registro de VFA nos municípios estudados foi utilizada como variável resposta.

Modelo	Intercepto	Inclinação	EP	z value	Pr(> z)	AIC	ΔAIC	GL	Peso
			0.19386	16.77	< 2e-16 ***	2114.7	0	5	0.4423
Distância + Matriz 2	3.251021	0.031361	0.003569	8.786	< 2e-16 ***				
		-0.00352	0.001103	-3.191	0.00142 **				
			0.191093	16.889	< 2e-16 ***	2114.9	0.1	5	0.4125
Distância + Matriz 1	3.2273	0.031661	0.003581	8.842	< 2e-16 ***				
		-0.0039	0.00123	-3.169	0.00153 **				
			0.203492	16.368	< 2e-16 ***	2117.2	2.5	5	0.1295
Distância + Matriz 3	3.330726	0.029566	0.003642	8.119	4.72e-16 ***				
		-0.00242	0.000883	-2.741	0.00613 **				
			0.21114	14.859	< 2e-16 ***	2123.2	8.4	5	0.0065
Distância + Matriz 6	3.137429	0.026618	0.003287	8.099	5.56e-16 ***				
		0.004506	0.005695	0.791	0.429				
			0.369417	9.104	< 2e-16 ***	2123.6	8.8	5	0.0053
Distância + Matriz 7	3.363013	0.027712	0.004338	6.388	1.68e-10 ***				
		-0.00045	0.001029	-0.442	0.659				
			0.225662	13.95	< 2e-16 ***	2125.2	10.5	5	0.0023
Distância + Matriz 4	3.148097	0.026439	0.003579	7.387	1.5e-13 ***				
		0.008598	0.01216	0.707	0.48				
			0.199384	16.314	< 2e-16 ***	2126	11.3	4	0.0016
Distância	3.252687		0.003617	7.343	2.09e-13 ***				
		0.026562							

			0.214686	18.914	< 2e-16 ***	2133.6	18.9	5	<0.001*
Distância + Matriz 5	4.060647	0.03055	0.004107	7.439	1.01e-13 ***				
		-0.00208	0.00074	-2.816	0.00487 **				

EP – Erro Padrão; GL – Grau de Liberdade; *** nível de significância para $p < 0.001$; ** nível de significância para $p < 0.01$, * nível de significância para $p < 0.05$.

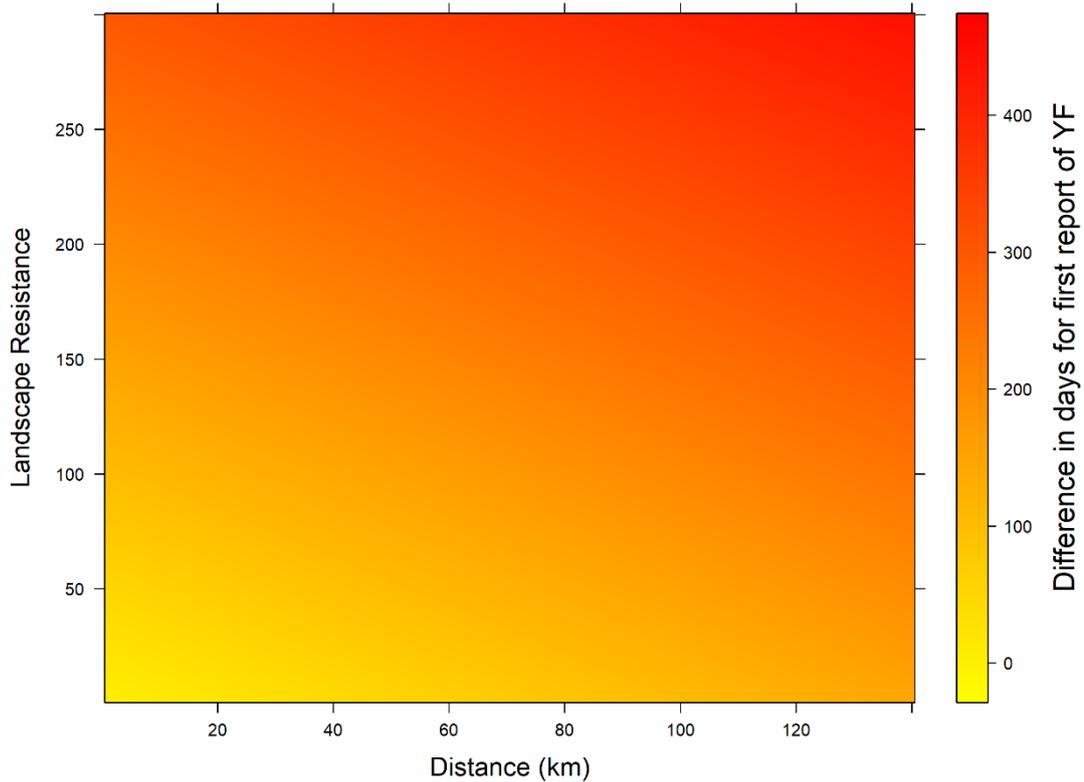


Figure 16. Relação entre a resistência associada às classes de uso de solo e distância geográfica (Distância + Matriz 2) e a diferença em dias para o primeiro registro de febre amarela nos municípios estudados. A predição aqui é baseada somente nas inclinações dos termos de efeitos fixos no modelo.

5. Discussão

As florestas tropicais são responsáveis por abrigar a maior parte da biodiversidade do planeta (Reed et al., 2020). A floresta Amazônica, por exemplo, responde sozinha por cerca de um quarto de todas as espécies do mundo (Betts; Malhi; Roberts, 2008), enquanto a Mata Atlântica, por sua vez, integra a lista de *hotspots* de biodiversidade, áreas com elevada concentração de espécies endêmicas e sob intenso processo de perda de habitat (Myers et al., 2000). Adicionalmente, as mesmas são responsáveis pela provisão dos chamados serviços ecossistêmicos, benefícios que o homem obtém da natureza e que são fundamentais para seu bem-estar (MEA, 2005), tais como a regulação do clima, provisão de água, polinização e regulação de doenças (Charles; Dukes, 2007). Portanto, o intenso processo de desmatamento observado nas florestas tropicais além de constituir uma das principais ameaças para suas espécies (Giam, 2017), coloca em cheque também a sobrevivência da própria espécie humana. Cenário evidenciado pelo crescente aumento das epidemias de origem zoonótica, infecções que são transmitidas de animais para humanos em função da exposição a seus patógenos, ao longo das últimas décadas (Jones et al., 2008; WHO, 2021).

No caso particular de zoonoses decorrentes de patógenos transmitidos por mosquitos, os eventos de *spillover* são determinados, principalmente, pela sobreposição de hospedeiros, vetores e populações humanas (Dantas-Torres and Otranto, 2015). De modo que, a febre amarela silvestre, doença que acomete o ser humano, mediante picadas de mosquitos infectados ao adentrar áreas de mata (Monath; Vasconcelos, 2015), consiste em um ótimo modelo de estudo. Neste sentido, modificações antrópicas da paisagem, a exemplo do próprio desmatamento e mudanças no uso de solo, são causas primárias para o aumento de sua incidência (Jones et al., 2013; Gottdenker et al., 2014; Mishra; Mishra; Arora, 2021). Inclusive, cerca de 40% das doenças zoonóticas recentes tiveram origem por causa do desmatamento e das mudanças de uso do solo associadas a este (Loh et al., 2015).

Outra característica decorrente das modificações antrópicas da paisagem consiste na redução de sua conectividade estrutural (Taylor; Fahrig; With, 2006), o que por sua vez, pode vir a constituir uma restrição no deslocamento de indivíduos, e conseqüentemente, na limitação do fluxo gênico das populações (Klinga et al., 2019). Desse modo, as modificações da paisagem podem implicar em variações genéticas

dentro das populações (Pelletier; Coltman, 2018), ou ainda na própria redução de suas variabilidades (Schlaepfer et al., 2018). Por outro lado, tais modificações, por vezes, podem significar um aumento na conectividade funcional da paisagem, quando estas aumentam o movimento ou fluxo de organismos através da paisagem (Taylor; Fahrig; with, 2006).

No caso particular de culicídeos, suas dinâmicas populacionais são determinadas tanto por fatores exógenos quanto por fatores endógenos. O primeiro está relacionado a variáveis ambientais, como temperatura, pluviosidade e umidade, enquanto que o segundo relaciona-se às variáveis intrínsecas, a exemplo da densidade larval dos criadouros (Yang et al., 2008). Modificações da paisagem podem implicar em uma maior disponibilidade de habitats (Mayi et al., 2019), resultando na elevação das abundâncias das espécies de culicídeos destes locais (Medeiros-Sousa et al., 2015). Adicionalmente, tais modificações podem facilitar a dispersão de espécies de mosquitos antropofílicos, alterando dessa forma a dinâmica vetor – hospedeiro, e tendo como resultado um aumento do contato dessas espécies com os reservatórios silvestres de patógenos zoonóticos (dos Santos et al., 2018).

No presente estudo foi testada a hipótese da configuração e grau de fragmentação da paisagem desempenhar um papel na dinâmica populacional da espécie *Hg. leucocelaenus* em municípios localizados no estado de São Paulo. Os resultados obtidos demonstram uma maior diversidade genética (índices θ_S e $\hat{\pi}$) para as populações de Pindamonhangaba, São José do Rio Preto e Balsamo, com estas duas últimas exibindo uma nítida estruturação em relação as demais amostradas. Ambas estão localizadas na região noroeste – mesorregião de São José do Rio Preto – e são exibidas constituindo um clado separado das demais populações, com este sendo imediatamente seguido pela população de Caraguatatuba, enquanto as demais são apresentadas constituindo um terceiro clado separado, no qual a população de Miracatu surge em um ramo mais externo, enquanto Pindamonhangaba e São Paulo, e Igaratá e Mairiporã compõe outros dois ramos, respectivamente.

As populações com os maiores índices de diversidade genética (*loci* polimórficos e média de diferenças par a par entre as sequências) estão localizadas em áreas com elevado uso antrópico (>32%), e quando levadas em conta somente as populações da mesorregião de São José do Rio Preto, esses valores superam os 75% de

ocupação das áreas amostradas, com esta classe de uso de solo evidenciando uma forte associação ao padrão de diversidade genética das populações, principalmente, no que tange o índice theta $\hat{\pi}$.

A estrutura da paisagem, isto é, as diferenças no uso de solo, está diretamente relacionada com padrões distintos de comunidades de mosquitos (Zittra et al., 2017), com sua diversidade e riqueza variando em função da resposta das espécies para as alterações ambientais (Mayi et al., 2019). Enquanto em nível de espécie, tais alterações podem implicar em eventos de microevolução, mudanças na estrutura genética das populações em curto espaço de tempo, forma pela qual os espécimes irão reagir ao meio ambiente (Suesdek, 2019). Por exemplo, no caso particular do gênero *Haemagogus*, Mucci et al. (2015) demonstraram a influência das áreas adjacentes aos fragmentos de floresta em seus hábitos alimentares, por meio da observação da presença de múltiplos repastos sanguíneos (aves, bovinos e primatas) para espécie *Hg. janthinomys/capricornii*. Curiosamente, o mesmo estudo falhou em identificar a presença de tais repastos para a espécie *Hg. leucocelaenus*, cujos espécimes apresentam maior plasticidade ecológica, quando comparados a esta primeira (Gomes et al., 2010). Adicionalmente, a exposição a patógenos pode desencadear eventos de microevolução em mosquitos, e por vezes, pode refletir em sua capacidade vetorial (Bartholomay et al., 2010; Cohuet et al., 2010).

Neste sentido, os resultados do presente estudo podem estar refletindo tanto a plasticidade do *Hg. leucocelaenus*, cujos espécimes encontram-se amplamente distribuídos na região de São José do Rio Preto (Camargo-Neves et al., 2005), quanto a pressão imposta pelo VFA, cuja circulação na mesma região possui um extenso registro, ao longo das últimas décadas (Saad et al., 2016), inclusive já tendo sido isolado a partir de mosquitos silvestres (Moreno et al., 2011). Contudo, cabe aqui ressaltar, que a população a exibir maiores valores de diversidade genética (Pindamonhangaba), diferentemente das populações anteriormente citadas, está localizada em uma região que até recentemente não possuía histórico de registro de epizootias em PNHs, com a confirmação ocorrendo somente no ano de 2018 (Moreno et al., 2013; SES-SP, 2018).

Referente aos eventos demográficos (expansão e retração populacional), a maioria das populações, seis de oito, exibiram valores negativos estatisticamente

significantes, ao menos para um dos testes de neutralidade. Entretanto, somente as populações de São Paulo e Mairiporã apresentaram concordância entre os dois testes (Tajima's D e Fu's FS). Valores negativos, geralmente, indicam sinais recentes de expansão populacional, e em comum as estas duas populações estão: i) o fato de estarem inseridas dentro do Parque Estadual da Cantareira (PEC), um importante remanescente de mata Atlântica do estado de São Paulo e considerado a maior floresta urbana do mundo (Trevelin et al., 2007); ii) os maiores valores observados de área edificada entre as populações amostradas; e iii) uma elevada superfície de borda florestal - entre 109 e 321 mil metros lineares -, com uma densidade entre 31 e 43 m/ha.

Embora a justaposição entre áreas urbanas e florestas apresente um impacto direto na composição florística, levando à diminuição de sua riqueza (Melliger et al., 2018), o que por vezes, pode implicar em uma provável redução dos criadouros tipos (occos de árvore) da espécie *Hg. leucocelaenus*, de modo a refletir na ausência de seus indivíduos em espaços urbanos (Montagner; Silva; Jahnke, 2018). Trabalhos com levantamentos de fauna de culicídeos (Ceretti-Junior et al., 2020; Mucci et al., 2016) já haviam registrado a presença do *Hg. leucocelaenus* em áreas do PEC. Aqui reforçamos esse encontro inclusive, a partir de locais com diferentes graus de cobertura vegetal (Wilk-da-Silva et al., 2020 - ANEXO 2). Neste sentido, novamente os resultados do presente estudo podem estar refletindo a plasticidade ecológica desta espécie a ambientes com maior grau de perturbação antrópica (Gomes et al., 2010), o que por sua vez, poderia contribuir para os eventos de expansão populacional observados nas duas populações amostradas dentro da área do PEC.

Referente aos valores de F_{ST} observados no presente estudo, embora as comparações par a par entre as populações tenha exibido elevados valores (0.02 – 0.75), os mesmos estão em concordância com os resultados de Alonso et al. (2022) em trabalho realizado com populações de *Mansonia spp.*, cujo protocolo utilizado para obtenção de SNP's mitocondriais foi o mesmo empregado em nosso estudo. Com relação ao grau de estruturação das populações, nitidamente é possível verificar uma separação dos espécimes coletados na região noroeste do estado de São Paulo, com as populações desta área ainda exibindo os maiores valores de F_{ST} na comparação par a par com as demais, enquanto estas últimas exibiram menores valores,

demonstrando uma maior proximidade genética, e sugerindo, dessa forma, que caso exista alguma barreira física, a mesma não seria um completo impedimento para a dispersão dos indivíduos. Neste sentido, nossos resultados estão em concordância com o isolamento por distância, de modo que, quanto maior a distância maior seria a diferenciação genética observada entre os espécimes. Estudos anteriores com mosquitos no estado de São Paulo demonstraram baixa estruturação genética e uma ausência de efeito de isolamento por distância, tanto para espécies silvestres (*Aedes fluviatilis* e *Anopheles cruzii*) como uma invasiva (*Aedes aegypti*) (Multini et al., 2016, 2020; Wilke et al., 2017). Contudo, cabe destacar que tais estudos foram realizados em escala microgeográfica, enquanto o presente estudo cobriu distâncias de centenas de quilômetros. Por outro lado, Petersen et al. (2022) em trabalho realizado com populações de *Aedes scapularis*, outra espécie silvestre, e já em uma escala um pouco maior, puderam observar um padrão de correspondência entre as distâncias genéticas e geográficas das populações amostradas.

Mosquitos, de modo geral, possuem um faixa de dispersão em torno de 6 quilômetros (Verdonschot; Besse-Lototskaya, 2014), enquanto para o gênero *Haemagogus* são registradas distâncias entre 5 a 11 quilômetros (Causey; Kumm; Laemmert , 1950), está primeira sendo observada para *Hg. leucocelaenus*. Não obstante, mosquitos podem cobrir grandes distâncias por meio da dispersão passiva (Verdonschot; Besse-Lototskaya, 2014), e em alguns casos chegando a centenas de quilômetros (Huestis et al., 2019). As maiores distâncias geográficas em nosso estudo são observadas entre os municípios da região noroeste do estado e aqueles presentes nas demais regiões (>400 km). À medida que os municípios das demais regiões são comparados entre si essas distâncias tendem a diminuir em algumas centenas. Contudo, ainda assim, observa-se uma razoável distância entre as populações. Mesmo assumindo que auxiliados por meio da dispersão passiva os espécimes seriam capazes de cobrir grandes distâncias geográficas, não seria razoável atribuir a esta unicamente o grau de semelhança genética entre os espécimes.

Ainda neste sentido, as populações que constituíram um único clado (mesorregiões Vale do Ribeira, Vale do Paraíba e Metropolitana) e cujas distâncias estão entre 5 e 230 km, fazem parte ou estão localizadas próximas a uma faixa de remanescente de mata Atlântica contínua, um grande fragmento de vegetação que se

estende ao longo da costa atlântica do estado de São Paulo (Wagner et al., 2020). Essa região pode constituir área de deslocamento para os espécimes de *Hg. leucocelaenus*, por meio dos chamados “corredores ecológicos” observados em meio aos fragmentos de vegetação, a exemplo daqueles utilizados no espalhamento do VFA (Fioravanti, 2018). Adicionalmente, a própria malha urbana, a exemplo de rodovias próximas a bordas florestais, pode contribuir para o deslocamento de indivíduos desta espécie, tal qual o padrão observado de dispersão do VFA no trabalho de Prist et al. (2021). Portanto, seria razoável supor que o padrão observado poderia ser explicado por uma dispersão dos espécimes auxiliada por determinado grau de conexão da paisagem.

Referente ao tipo de marcador molecular empregado no presente estudo (SNP's mitocondriais), o mesmo tem sido utilizado com sucesso para caracterização populacional tanto para escalas macro (Rašić et al., 2015a, 2015b) quanto micro (Alonso et al., 2022), demonstrando a viabilidade do seu emprego em estudos com genética de populações. Entretanto, cabe aqui destacar que uma das principais limitações do presente estudo, pode estar relacionada justamente ao tipo de marcador utilizado. Em razão da ausência do genoma completo de referência para a espécie objeto de estudo (*Hg. leucocelaenus*), foi utilizado como alternativa o genoma mitocondrial, o que, por sua vez, resultou em redução significativa na quantidade de SNP's obtidos e, uma consequente impossibilidade de se analisar os pontos amostrados na borda e no núcleo dos fragmentos de floresta – pontos estes, relacionados a um dos objetivos específicos anteriormente pretendido, de verificar uma possível estruturação entre indivíduos coletados nestes dois ambientes –, em função de um baixo número amostral de indivíduos. Tal fato, evidencia de maneira imperativa a necessidade de um maior investimento de recursos destinados a obtenção não só do sequenciamento genômico completo da espécie objeto de estudo do presente trabalho, mas também a do outro principal vetor para VFA no país (*Hg. janthinomys*) (Abreu et al., 2019b), para a qual também não se dispõem de dados de referência.

Contudo, mesmo diante do cenário adverso, anteriormente mencionado, o marcador foi exitoso em caracterizar a estruturação das populações do *Hg. leucocelaenus*, provando de fato ser uma ótima alternativa para estudo com genética

de populações, cuja a espécie alvo não possua o genoma completamente sequenciado.

Uma outra limitação, pode estar relacionada as coletas de espécimes imaturos, mais especificamente, aquela oriunda do município de Miracatu, local onde foi realizada uma única coleta. Deste modo, existe uma grande chance de os indivíduos obtidos constituírem uma única prole e, portanto, nossos resultados desta área não estariam refletindo de forma fidedigna a variabilidade genética de sua população.

Referente aos resultados obtidos por meio da análise da estrutura da paisagem em microescala, baseado em dados de coletas de mosquitos (Wilk-da-Silva et al., 2020 - ANEXO 2), foi possível verificar espécies com potencial envolvimento na transmissão do VFA, tais como *Aedes scapularis* e *Psorophora ferox*, exibindo elevada abundância. Esse resultado conduz para um possível envolvimento destas espécies no espalhamento do vírus na área amostrada, principalmente, se levarmos em conta, a elevada circulação do vírus no local, confirmada pela ocorrência da alta mortalidade de Bugios, e a baixa abundância do *Hg. leucocelaenus*, ainda que este tenha sido registrado em todas as áreas amostradas, bem como uma ausência de espécimes de *Hg. janthinomys/capricornii*. Ao passo que, nas análises em macro escala, baseadas em registros de epizootias (Wilk-da-Silva et al., 2022 - ANEXO 1), foi possível identificar um padrão de deslocamento temporal do vírus da febre amarela associado as diferentes classes de uso de solo e a distância geográfica dos locais de registro das epizootias, sendo ainda observada uma maior permeabilidade nas bordas florestais (150 metros) em interface com as seguintes áreas núcleos: Água, Agricultura, Formação não Florestal e Silvicultura, enquanto áreas núcleo como Água, Agricultura, Urbana e áreas de Floresta, e a interface entre estas duas últimas formando importantes barreiras para a circulação do VFA. Sugerindo dessa forma, que o processo de fragmentação florestal tende a aumentar a velocidade de espalhamento de patógenos, enquanto a conservação de florestas tem um efeito oposto. Portanto, demonstrando assim, a relevância destes dois trabalhos para uma melhor compressão do padrão de circulação do VFA no estado de São Paulo.

6. Conclusão

- Foi possível verificar uma nítida estruturação das populações amostradas no presente estudo, com os espécimes da mesorregião de São José do Rio Preto exibindo uma maior proximidade genética entre si, quando comparada as demais mesorregiões.
- As populações de São Paulo e Mairiporã, amostradas a partir do PEC, evidenciaram sinais de um possível evento de expansão populacional.
- As populações de São José do Rio Preto, Balsamo e Pindamonhangaba exibiram os maiores valores de diversidade genética (índices θ e $\hat{\pi}$), na comparação com as demais.
- As populações amostradas nas mesorregiões Vale do Ribeira, Vale do Paraíba e Metropolitana exibiram uma maior proximidade genética, com uma maior dissimilaridade em relação aquelas amostradas na mesorregião de São José do Rio Preto, corroborando dessa forma com o padrão de isolamento por distância observado, e sugerindo um maior fluxo gênico entre estas primeiras.
- A dispersão dos espécimes de *Hg. leucocelaenus* pode estar associada ao grau de conexão da paisagem, a exemplo do próprio padrão de espalhamento do VFA observado no estado de São Paulo, no qual o vírus exibiu uma maior mobilidade nas bordas florestais, juntamente como a presença de rodovias próximas a estes ambientes.
- A composição de espécies potencialmente envolvidas na transmissão do VFA variou em função da composição e configuração da paisagem observada nos distintos locais amostrados.
- As diferenças observadas nos padrões de distribuição e abundância de culicídeos sugerem que outras espécies além do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, a exemplo da *Pshorophora ferox* e *Aedes scapularis*, podem estar contribuindo para o espalhamento e manutenção do VFA nas áreas amostrada.
- Foi demonstrado que fragmentos de floresta (bordas florestais) são mais permeáveis para a dispersão do VFA, ao passo que, áreas núcleo de floresta e áreas construídas oferecem resistências intermediária e elevada, respectivamente.

- O padrão de dispersão temporal do VFA entre os municípios amostrados no estado de São Paulo pode ser melhor explicado quando a resistência da paisagem é adicionada ao efeito da distância geográfica entre os locais.

7. Referências

- Abreu, F.V.S. de, Delatorre, E., dos Santos, A.A.C., Ferreira-de-Brito, A., de Castro, M.G., Ribeiro, I.P., Furtado, N.D., Vargas, W.P., Ribeiro, M.S., Meneguete, P., Bonaldo, M.C., Bello, G., Lourenço-de-Oliveira, R., 2019a. Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 114. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076>
- Abreu, F.V.S. de, Ribeiro, I.P., Ferreira-de-Brito, A., Santos, A.A.C. dos, Miranda, R.M. de, Bonelly, I. de S., Neves, M.S.A.S., Bersot, M.I., Santos, T.P. dos, Gomes, M.Q., Silva, J.L. da, Romano, A.P.M., Carvalho, R.G., Said, R.F. do C., Ribeiro, M.S., Laperrière, R. da C., Fonseca, E.O.L., Falqueto, A., Paupy, C., Failloux, A.-B., Moutailler, S., Castro, M.G. de, Gómez, M.M., Motta, M. de A., Bonaldo, M.C., Lourenço-de-Oliveira, R., 2019b. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes Infect.* 8, 218–231. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>
- Alencar, J., de Mello, C.F., Gil-Santana, H.R., Guimarães, A.É., de Almeida, S.A.S., Gleiser, R.M., 2016. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* 41, 18–26. <https://doi.org/10.1111/jvec.12189>
- Alencar, J., de Mello, C.F., Leite, P.J., Bastos, A.Q., Freitas Silva, S.O., Serdeiro, M., dos Santos Silva, J., Müller, G.A., 2021. Oviposition activity of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) during the rainy and dry seasons, in areas with yellow fever virus circulation in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* 16, e0261283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261283>
- Alonso, D.P., Alvarez, M.V.N., Amorim, J.A., de Sá, I.L.R., de Carvalho, D.P., Ribeiro, K.A.N., Ribolla, P.E.M., Sallum, M.A.M., 2022. *Mansonia* spp. population genetics based on mitochondrion whole-genome sequencing alongside the Madeira River near Porto Velho, Rondonia, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 103, 105341. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105341>
- Alvarez, M.V., 2021. LCVCFtools v1.0.2-alpha (v1.0.2-alpha). <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.5259931>
- Alvarez, M.V.N., 2020. Análise de Dados por Imputação de Sequenciamento de Baixa Cobertura: Seleção de Marcadores e Genética Populacional. Universidade Estadual Paulista.
- Andrews, S., 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Babraham Bioinformatics.
- Aragão, A. de O., Nunes Neto, J.P., Cruz, A.C.R., Casseb, S.M.M., Cardoso, J.F., da Silva, S.P., Ishikawa, E.A.Y., 2019. Description and phylogeny of the mitochondrial genome of *Sabethes chloropterus*, *Sabethes glaucodaemon* and *Sabethes belisarioi* (Diptera: Culicidae). *Genomics* 111, 607–611. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.03.016>
- Arnell, J.H., 1973. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* 10, 1–174.

- Bartholomay, L.C., Waterhouse, R.M., Mayhew, G.F., Campbell, C.L., Michel, K., Zou, Z., Ramirez, J.L., Das, S., Alvarez, K., Arensburger, P., Bryant, B., Chapman, S.B., Dong, Y., Erickson, S.M., Karunaratne, S.H.P.P., Kokoza, V., Kodira, C.D., Pignatelli, P., Shin, S.W., Vanlandingham, D.L., Atkinson, P.W., Birren, B., Christophides, G.K., Clem, R.J., Hemingway, J., Higgs, S., Megy, K., Ranson, H., Zdobnov, E.M., Raikhel, A.S., Christensen, B.M., Dimopoulos, G., Muskavitch, M.A.T., 2010. Pathogenomics of *Culex quinquefasciatus* and Meta-Analysis of Infection Responses to Diverse Pathogens. *Science* (80-.). 330, 88–90. <https://doi.org/10.1126/science.1193162>
- Betts, R.A., Malhi, Y., Roberts, J.T., 2008. The future of the Amazon: new perspectives from climate, ecosystem and social sciences. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 1729–1735. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0011>
- Bicca-Marques, J.C., Chaves, Ó.M., Hass, G.P., 2020. Howler monkey tolerance to habitat shrinking: Lifetime warranty or death sentence? *Am. J. Primatol.* 82, 1–9. <https://doi.org/10.1002/ajp.23089>
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bolt, L.M., Russell, D.G., Schreier, A.L., 2021. Anthropogenic edges impact howler monkey (*Alouatta palliata*) feeding behaviour in a Costa Rican rainforest. *Primates* 62, 647–657. <https://doi.org/10.1007/s10329-021-00904-y>
- Bonaldo, M.C., Gómez, M.M., dos Santos, A.A., Abreu, F.V.S. de, Ferreira-de-Brito, A., Miranda, R.M. de, Castro, M.G. de, Lourenço-de-Oliveira, R., 2017. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 447–451. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170134>
- Brasil, 2016. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano de Contingência para Resposta às Emergências em Saúde Pública: Febre Amarela. Ministério da Saúde, Brasília.
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- Bryant, J.E., Holmes, E.C., Barrett, A.D.T., 2007. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 3, e75. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030075>
- Camargo-Neves, V.L.F. de, Poletto, D.W., Rodas, L.A.C., Pacholi, M.L., Cardoso, R.P., Scandar, S.A.S., Sampaio, S.M.P., Koyanagui, P.H., Botti, M. V., Mucci, L.F., Gomes, A. de C., 2005. Entomological investigation of a sylvatic yellow fever area in São Paulo State, Brazil. *Cad. Saude Publica* 21, 1278–1286. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000400031>
- Causey, OR; Kumm, HW, Laemmert Jr., H., 1950. Dispersion of Forest Mosquitoes in Brazil: Further Studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* s1-30, 301–312. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1950.S1-30.301>
- Charles, H., Dukes, J.S., 2007. Impacts of Invasive Species on Ecosystem Services, in: *Biological Invasions*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 217–

237. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36920-2_13
- Chippaux, J.-P., Chippaux, A., 2018. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 24, 20. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0162-y>
- Cohuet, A., Harris, C., Robert, V., Fontenille, D., 2010. Evolutionary forces on Anopheles: what makes a malaria vector? *Trends Parasitol.* 26, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.12.001>
- Consoli, R.A.G.B., Lourenço-de-Oliveira, R., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, *Cadernos de Saúde Pública*. Editora FIOCRUZ. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1995000100027>
- Couto-Lima, D., Andreazzi, C.S., Leite, P.J., Bersot, M.I.L., Alencar, J., Lourenço-de-Oliveira, R., 2020. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the Atlantic Forest, southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 115, 1–13. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200218>
- Cunha, M. dos P., Duarte-Neto, A.N., Pour, S.Z., Ortiz-Baez, A.S., Černý, J., Pereira, B.B. de S., Braconi, C.T., Ho, Y.-L., Perondi, B., Sztajn bok, J., Alves, V.A.F., Dolhnikoff, M., Holmes, E.C., Saldiva, P.H.N., Zanotto, P.M. de A., 2019. Origin of the São Paulo Yellow Fever epidemic of 2017–2018 revealed through molecular epidemiological analysis of fatal cases. *Sci. Rep.* 9, 20418. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56650-1>
- Cunha, M.S., da Costa, A.C., de Azevedo Fernandes, N.C.C., Guerra, J.M., dos Santos, F.C.P., Nogueira, J.S., D’Agostino, L.G., Komninakis, S.V., Witkin, S.S., Ressio, R.A., Maeda, A.Y., Vasami, F.G.S., Kaigawa, U.M.A., de Azevedo, L.S., de Souza Facioli, P.A., Macedo, F.L.L., Sabino, E.C., Leal, É., de Souza, R.P., 2019. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci. Rep.* 9, 5474. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41950-3>
- CVE, 2022. Centro de Vigilância Epidemiológica - “Prof. Alexandre Vranjac”: Boletim Epidemiológico FEBRE AMARELA atualização [Internet]. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agravos/febre-amarela/boletim-epidemiologico>> Acesso em: 18 mai 2022
- Dantas-Torres F., O.D., 2015. Vector-Borne Zoonoses., In: Sing A. (eds) *Zoonoses- Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects*. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9457-2>
- dos Santos, T.P., Roiz, D., de Abreu, F.V.S., Luz, S.L.B., Santalucia, M., Jiolle, D., Neves, M.S.S.A., Simard, F., Lourenço-de-Oliveira, R., Paupy, C., 2018. Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0194-y>
- Emerson, K.J., Conn, J.E., Bergo, E.S., Randel, M.A., Sallum, M.A.M., 2015. Brazilian *Anopheles darlingi* root (Diptera: Culicidae) clusters by major biogeographical region. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130773>

- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fahrig, L., 2003. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 487–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>
- Fioravanti, C., 2018. O combate à febre amarela no estado de São Paulo: História , desafios e inovações. CVE/SES, São Paulo.
- Forattini, O.P., 2002. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia e Epidemiologia*, vol. 2. ed. EdUSP, São Paulo.
- Fouet, C., Kamdem, C., Gamez, S., White, B.J., 2017. Extensive genetic diversity among populations of the malaria mosquito *Anopheles moucheti* revealed by population genomics. *Infect. Genet. Evol.* 48, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.006>
- Franklin JF, 1993. Preserving biodiversity: species, ecosystems, or landscapes? *Ecol. Appl.* 202–205.
- Frierson, J.G., 2010. The yellow fever vaccine: A history. *Yale J. Biol. Med.* 83, 77–85.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147, 915–925. <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
- Gaythorpe, K.A.M., Hamlet, A., Jean, K., Garkauskas Ramos, D., Cibrelus, L., Garske, T., Ferguson, N., 2021. The global burden of yellow fever. *Elife* 10, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.64670>
- Giam, X., 2017. Global biodiversity loss from tropical deforestation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 5775–5777. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706264114>
- Gillespie, J.H., 2004. *Population genetics: a concise guide*. JHU Press.
- Gomes, A. de C., Torres, M.A.N., Paula, M.B. de, Fernandes, A., Marassá, A.M., Consales, C.A., Fonseca, D.F., 2010. *Ecologia de Haemagogus e Sabethes (Diptera: Culicidae) em áreas epizoóticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. Epidemiol. e Serviços Saúde* 19, 101–113. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742010000200003>
- Gottdenker, N.L., Streicker, D.G., Faust, C.L., Carroll, C.R., 2014. Anthropogenic Land Use Change and Infectious Diseases: A Review of the Evidence. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0941-z>
- Harbach, R., 2022. Mosquito Taxonomic Inventory. Valid Species List [Internet]. Disponível em: <<https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/valid-species-list>> Acesso em: 20 jul 2022
- Harrisson, K.A., Pavlova, A., Telonis-Scott, M., Sunnucks, P., 2014. Using genomics to characterize evolutionary potential for conservation of wild populations. *Evol. Appl.* 7, 1008–1025. <https://doi.org/10.1111/eva.12149>
- Helyar, S.J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M.I., Ogden, R., Limborg, M.T., Cariani, A., Maes, G.E., Diopere, E., Carvalho, G.R., Nielsen, E.E., 2011.

- Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: New opportunities and challenges. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 123–136. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02943.x>
- Hofmeister, J., Hošek, J., Brabec, M., Střalková, R., Mýlová, P., Bouda, M., Pettit, J.L., Rydval, M., Svoboda, M., 2019. Microclimate edge effect in small fragments of temperate forests in the context of climate change. *For. Ecol. Manage.* 448, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.05.069>
- Howell, P.E., Koen, E.L., Williams, B.W., Roloff, G.J., Scribner, K.T., 2016. Contiguity of landscape features pose barriers to gene flow among American marten (*Martes americana*) genetic clusters in the Upper Peninsula of Michigan. *Landsc. Ecol.* 31, 1051–1062. <https://doi.org/10.1007/s10980-015-0331-0>
- Huestis, D.L., Dao, A., Diallo, M., Sanogo, Z.L., Samake, D., Yaro, A.S., Ousman, Y., Linton, Y.M., Krishna, A., Veru, L., Krajacich, B.J., Faiman, R., Florio, J., Chapman, J.W., Reynolds, D.R., Weetman, D., Mitchell, R., Donnelly, M.J., Talamas, E., Chamorro, L., Strobach, E., Lehmann, T., 2019. Windborne long-distance migration of malaria mosquitoes in the Sahel. *Nature* 574, 404–408. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1622-4>
- IBGE, 2021. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Cidades e Estados [Internet]. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/>> Acesso em: 10 jan 2022
- Ilacqua, R.C., Medeiros-Sousa, A.R., Ramos, D.G., Obara, M.T., Ceretti-Junior, W., Mucci, L.F., Marrelli, M.T., Laporta, G.Z., 2021. Reemergence of Yellow Fever in Brazil: The Role of Distinct Landscape Fragmentation Thresholds. *J. Environ. Public Health* 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/8230789>
- Jackson, H.B., Fahrig, L., 2012. What size is a biologically relevant landscape? *Landsc. Ecol.* 27, 929–941. <https://doi.org/10.1007/s10980-012-9757-9>
- Jombart, T., Ahmed, I., 2011. adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27, 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.Y., 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change 110, 8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Kassambara, A., 2020. ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots. [Internet]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=ggpubr>> Acesso em: 10 jan 2022.
- Klinga, P., Mikoláš, M., Smolko, P., Tejkal, M., Höglund, J., Paule, L., 2019. Considering landscape connectivity and gene flow in the Anthropocene using complementary landscape genetics and habitat modelling approaches. *Landsc. Ecol.* 34, 521–536. <https://doi.org/10.1007/s10980-019-00789-9>
- Knaus, B.J., Grünwald, N.J., 2017. VCFR: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Mol. Ecol. Resour.* 17, 44–53.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12549>

- Kumar, S., Banks, T.W., Cloutier, S., 2012. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *Int. J. Plant Genomics* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/831460>
- Laurance, W.F., Lovejoy, T.E., Vasconcelos, H.L., Bruna, E.M., Didham, R.K., Stouffer, P.C., Gascon, C., Bierregaard, R.O., Laurance, S.G., Sampaio, E., 2002. Ecosystem Decay of Amazonian Forest Fragments: a 22-Year Investigation. *Conserv. Biol.* 16, 605–618. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01025.x>
- Laurance, W.F., Vasconcelos, H.L., 2009. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na amazônia. *Oecologia Bras.* 13, 434–451. <https://doi.org/10.4257/oeco.2009.1303.03>
- Li, H., 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27, 2987–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509>
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Lima-Ribeiro, M.D.S., 2008. Efeitos de borda sobre a vegetação e estruturação populacional em fragmentos de Cerradão no Sudoeste Goiano, Brasil. *Acta Bot. Brasilica* 22, 535–545. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062008000200020>
- Liu, J., Taylor, W.W., 2002. Integrating Landscape Ecology into Natural Resource Management. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511613654>
- Loh, E.H., Zambrana-Torrel, C., Olival, K.J., Bogich, T.L., Johnson, C.K., Mazet, J.A.K., Karesh, W., Daszak, P., 2015. Targeting Transmission Pathways for Emerging Zoonotic Disease Surveillance and Control. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 15, 432–437. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1563>
- MapBiomas, 2020. Projeto Maobiomas: Coleção 5.0 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil, período em 1985 e 2019. [Internet]. Disponível em: <<https://plataforma.mapbiomas.org/>> Acesso em: 10 fev 2022
- Massad, E., Burattini, M., Coutinho, F., Lopez, L., 2003. Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in Sao Paulo State, Brazil. *Rev. Saude Publica* 37, 477–484.
- Mayi, M.P.A., Foncha, D.F., Kowo, C., Tchuinkam, T., Brisco, K., Anong, D.N., Ravinder, S., Cornel, A.J., 2019. Impact of deforestation on the abundance, diversity, and richness of *Culex* mosquitoes in a southwest Cameroon tropical rainforest. *J. Vector Ecol.* 44, 271–281. <https://doi.org/10.1111/jvec.12359>
- Mbora, D.N.M., McPeck, M.A., 2009. Host density and human activities mediate increased parasite prevalence and richness in primates threatened by habitat loss and fragmentation. *J. Anim. Ecol.* 78, 210–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01481.x>
- MEA, 2005. Millennium Ecosystem Assessment: Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC.

- Medeiros-Sousa, A.R., Ceretti-Junior, W., de Carvalho, G.C., Nardi, M.S., Araujo, A.B., Vendrami, D.P., Marrelli, M.T., 2015. Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera:Culicidae) in an urban park: Larval habitats and temporal variation. *Acta Trop.* 150, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.002>
- Melliger, R.L., Braschler, B., Rusterholz, H.-P., Baur, B., 2018. Diverse effects of degree of urbanisation and forest size on species richness and functional diversity of plants, and ground surface-active ants and spiders. *PLoS One* 13, e0199245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199245>
- Metzger, J.P., 2001. O Que É Ecologia De Paisagens? *Biota Neotrop.* 1, 1–9. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn246>
- Mishra, J., Mishra, P., Arora, N.K., 2021. Linkages between environmental issues and zoonotic diseases: with reference to COVID-19 pandemic. *Environ. Sustain.* 4, 455–467. <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00165-x>
- MMA, 2017. Ministério do Meio Ambiente: Impactos sobre a biodiversidade [Internet]. <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos>> Acesso em: 20 jun 2022
- Monath, T.P., Vasconcelos, P.F.C., 2015. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 64, 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>
- Montagner, F.R.G., Silva, O.S., Jahnke, S.M., 2018. Mosquito species occurrence in association with landscape composition in green urban areas 1–7. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.04416>
- 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. de, 2011. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 290–296. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000041>
- Moreno, E.S., Spinola, R., Tengan, C.H., Brasil, R.A., Siciliano, M.M., Coimbra, T.L.M., Silveira, V.R., Rocco, I.M., Bisordi, I., Souza, R.P. de, Petrella, S., Pereira, L.E., Maeda, A.Y., Silva, F.G. da, Suzuki, A., 2013. Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 55, 45–50. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000100008>
- Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K., 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 19, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>
- MS, 2021. Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica da febre amarela – Monitoramento 2020/2021, Boletim Epidemiológico.
- MS, 2020. Ministério da Saúde: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes, Boletim Epidemiológico Arboviroses.
- MS, 2019. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde: Nota informativa Nº169 de 2019 - CGARB/DEIDT/SVS/MS.
- MS, 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela. Ministério da Saúde, Brasília.
- Mucci, F., Medeiros-Sousa, A.R., Ceretti-Jr, W., Fernandes, A., Camargo, A., Evangelista, E., Christe, R.O., Montes, J., Teixeira, R.S., Marrelli, M.T., 2016.

- 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 Assoc.* 32, 329–332,.
- Mucci, L.F., Júnior, R.P.C., de Paula, M.B., Scandar, S.A.S., Pacchioni, M.L., Fernandes, A., Consales, C.A., 2015. Feeding habits of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an area of sylvatic transmission of yellow fever in the state of São Paulo, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 6. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0005-z>
- Multini, L.C., de Souza, A.L. da S., Marrelli, M.T., Wilke, A.B.B., 2020. The influence of anthropogenic habitat fragmentation on the genetic structure and diversity of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Sci. Rep.* 10, 18018. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74152-3>
- Multini, L.C., Wilke, A.B.B., Suesdek, L., Marrelli, M.T., 2016. Population Genetic Structure of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *PLoS One* 11, e0162328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162328>
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- OPAS, 2008. Organización Panamericana De La Salud: Fiebre Amarilla En Paraguay Informe De Situacion No 13.
- PAHO, 2014. Small bites Big threats - Yellow Fever [Internet]. Disponível em: <<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wpcontent/uploads/2014/04/Yellow-fever.pdf>> Acesso em: 20 abr 2022.
- PAHO, 2008. Disasters: Preparedness and Mitigation in the Americas 1–7.
- PAHO/WHO, 2022. Pan American Health Organization/World Health Organization: Febre Amarela [Internet]. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/node/40>> Acesso em: 20 jun 2022
- Pelletier, F., Coltman, D.W., 2018. Will human influences on evolutionary dynamics in the wild pervade the Anthropocene? *BMC Biol.* 16, 7. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0476-1>
- Petersen, V., Santana, M., Alves, J.M.P., Suesdek, L., 2022. Genetic and morphological polymorphisms of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae), vector of filariae and arboviruses. *Infect. Genet. Evol.* 97, 105193. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105193>
- Plowright, R.K., Parrish, C.R., McCallum, H., Hudson, P.J., Ko, A.I., Graham, A.L., Lloyd-smith, J.O., 2017. Pathways to zoonotic spillover. *Nat Rev Microbiol.* 15, 502–510. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>
- Primackm, R.B., Rodrigues, E., 2001. *Biologia da Conservação*. Londrina: Midiograf, 2001. *Biologia da Conservação*. Midiograf, Londrina.
- Prist, P., Tambosi, L., Mucci, L., Pinter, A., de Souza, R., Muylaert, R., Rhodes, J., Comin, C., Costa, L., D'Agostini, T., de Deus, J., Pavão, M., Port-Carvalho, M., Saad, L., Sallum, M., Spinola, R., Metzger, J., 2021. Roads and forest edges facilitate yellow fever virus dispersion. *J. Appl. Ecol.* 1–14.

<https://doi.org/10.1111/1365-2664.14031>

- Prist, P.R., Uriarte, M., Tambosi, L.R., Prado, A., Pardini, R., D'Andrea, P.S., Metzger, J.P., 2016. Landscape, environmental and social predictors of Hantavirus risk in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 11, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163459>
- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing.
- Rašić, G., Endersby-Harshman, N., Tantowijoyo, W., Goundar, A., White, V., Yang, Q., Filipović, I., Johnson, P., Hoffmann, A.A., Arguni, E., 2015a. *Aedes aegypti* has spatially structured and seasonally stable populations in Yogyakarta, Indonesia. *Parasit. Vectors* 8, 610. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1230-6>
- Rašić, G., Schama, R., Powell, R., Maciel-de Freitas, R., Endersby-Harshman, N.M., Filipović, I., Sylvestre, G., Máspero, R.C., Hoffmann, A.A., 2015b. Contrasting genetic structure between mitochondrial and nuclear markers in the dengue fever mosquito from Rio de Janeiro: implications for vector control. *Evol. Appl.* 8, 901–915. <https://doi.org/10.1111/eva.12301>
- Reed, S.C., Reibold, R., Cavaleri, M.A., Alonso-Rodríguez, A.M., Berberich, M.E., Wood, T.E., 2020. Soil biogeochemical responses of a tropical forest to warming and hurricane disturbance, in: *Advances in Ecological Research*. Elsevier Ltd., pp. 225–252. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2020.01.007>
- Ruzzante, L., Reijnders, M.J.M.F., Waterhouse, R.M., 2019. Of Genes and Genomes: Mosquito Evolution and Diversity. *Trends Parasitol.* 35, 32–51. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.10.003>
- Saad, L.D.C., Barata, R.B., Saad, L.D.C., Barata, R.B., 2016. Surtos de febre amarela no estado de São Paulo, 2000-2010*. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 25, 531–540. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000300009>
- Schlaepfer, D.R., Braschler, B., Rusterholz, H.-P., Baur, B., 2018. Genetic effects of anthropogenic habitat fragmentation on remnant animal and plant populations: a meta-analysis. *Ecosphere* 9, e02488. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2488>
- Schmidt, T.L., Rašić, G., Zhang, D., Zheng, X., Xi, Z., 2017. Genome-Wide SNPs Reveal the Drivers of Gene Flow In An Urban Population of the Asian Tiger Mosquito , *Aedes albopictus* 1–37.
- SES-SP, 2018. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saude. Boletim Epidemiológico Febre Amarela - 2018.
- SOS Mata Atlântica & INPE, 2020. Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata Atlântica Período 2018-2019 Relatório Técnico São Paulo.
- SOSMA, 2020. Qual é a área de cobertura da Mata Atlântica? [WWW Document]. Fundação SOS Mata Atl. URL <https://www.sosma.org.br/artigos/qual-e-area-de-cobertura-da-mata-atlantica/>
- Stapley, J., Reger, J., Feulner, P.G.D., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., Bennison, C., Ball, A.D., Beckerman, A.P., Slate, J., 2010. Adaptation genomics: The next generation. *Trends Ecol. Evol.* 25, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.09.002>
- Steffler, L.M., Dolabella, S.S., Ribolla, P.E.M., Dreyer, C.S., Araújo, E.D., Oliveira,

- R.G., Martins, W.F.S., La Corte, R., 2016. Genetic variability and spatial distribution in small geographic scale of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under different climatic conditions in Northeastern Brazil. *Parasit. Vectors* 9, 530. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1814-9>
- Suesdek, L., 2019. Microevolution of medically important mosquitoes – A review. *Acta Trop.* 191, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.013>
- Suzuki, R., Terada, Y., Shimodaira, H., 2019. {pvclust: Hierarchical Clustering with P-Values via Multiscale Bootstrap Resampling.
- Tajima, F., 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- Tajima, F., 1983. Evolutionary Relationship Of Dna Sequences In Finite Populations. *Genetics* 105, 437–460.
- Taylor, P.D., Fahrig, L., With, K.A., 2006. Landscape connectivity: a return to the basics, in: *Connectivity Conservation*. Cambridge University Press, pp. 29–43. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511754821.003>
- Trevelin, L.C., Port-Carvalho, M., Silveira, M., Morell, E., 2007. Abundance, habitat use and diet of *Callicebus nigrifrons spix* (Primates, Pitheciidae) in Cantareira State Park, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 24, 1071–1077. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000400026>
- Vasconcelos, P.F., 2003. Febre amarela Yellow fever. *Rev Soc Bras. Med Trop* 36, 275–293.
- Vasconcelos, P.F. da C., 2010. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev. Saude Publica* 44, 1144–1149. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.04416>
- Verdonschot, P.F.M., Besse-lototskaya, A.A., 2014. Flight distance of mosquitoes (Culicidae): A metadata analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologica* 45, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2013.11.002>
- Vignal, A. Milan, D. Sancristobal, M. Eggen, A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34 (2002), 275–305. <https://doi.org/10.1051/gse>
- Wagner, F.H., Sanchez, A., Aidar, M.P.M., Rochelle, A.L.C., Tarabalka, Y., Fonseca, M.G., Phillips, O.L., Gloor, E., Aragão, L.E.O.C., 2020. Mapping Atlantic rainforest degradation and regeneration history with indicator species using convolutional network. *PLoS One* 15, e0229448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229448>
- Weaver, S.C., 2013. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: Mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol.* 21, 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.003>
- Weaver, S.C., Reisen, W.K., 2010. Present and Future Arboviral Threats, Antiviral Research. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008.Present>
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* (N.Y.) 38, 1358–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x>

- WHO, 2021. Zoonoses Key facts [Internet]. Disponivel <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>> Acesso em: 20 jun 2022
- WHO, 2019. Yellow fever [Internet]. Disponivel em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>> Acesso: 10 fev 2022
- Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, Second. ed, Use R! Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wickham, H., 2007. Reshaping Data with the reshape Package. J. Stat. Softw. 21, 1–20.
- Wilk-da-Silva, R., Medeiros-Sousa, A.R., Laporta, G.Z., Mucci, L.F., Prist, P.R., Marrelli, M.T., 2022. The influence of landscape structure on the dispersal pattern of yellow fever virus in the state of São Paulo. Acta Trop. 228, 106333. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106333>
- Wilk-da-Silva, R., Mucci, L.F., Ceretti-Junior, W., Duarte, A.M.R. de C., Marrelli, M.T., Medeiros-Sousa, A.R., 2020. Influence of landscape composition and configuration on the richness and abundance of potential sylvatic yellow fever vectors in a remnant of Atlantic Forest in the city of São Paulo, Brazil. Acta Trop. 204, 105385. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105385>
- Wilke, A.B.B., Wilk-da-Silva, R., Marrelli, M.T., 2017. Microgeographic population structuring of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). PLoS One 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185150>
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc. 26, 375–400. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1985.tb02048.x>
- World Health Organization, 2014. A global brief on vector-borne diseases. World Heal. Organ. 9. <https://doi.org/WHO/DCO/WHD/2014.1>
- Wu, J., 2013. Key concepts and research topics in landscape ecology revisited: 30 years after the Allerton Park workshop. Landsc. Ecol. 28, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10980-012-9836-y>
- Yang, Gj, Brook, Bw, Whelan, Pi, Cleland, S, Bradshaw, C., 2008. Endogenous and exogenous factors controlling temporal abundance patterns of tropical mosquitoes. Ecol. Appl. 18, 2028–2040.
- Zittra, C., Vitecek, S., Obwaller, A.G., Rossiter, H., Eigner, B., Zechmeister, T., Waringer, J., Fuehrer, H.-P., 2017. Landscape structure affects distribution of potential disease vectors (Diptera: Culicidae). Parasit. Vectors 10, 205. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2140-6>
- Zohdy, S., Schwartz, T.S., Oaks, J.R., 2019. The Coevolution Effect as a Driver of Spillover. Trends Parasitol. 35, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.010>

8. ANEXOS

ANEXO 1. The influence of landscape structure on the dispersal pattern of yellow fever virus in the state of São Paulo

Acta Tropica 228 (2022) 106333



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



The influence of landscape structure on the dispersal pattern of yellow fever virus in the state of São Paulo

Ramon Wilk-da-Silva^{a,*}, Antônio Ralph Medeiros-Sousa^b, Gabriel Zorello Laporta^c,
Luis Filipe Mucci^d, Paula Ribeiro Prist^e, Mauro Toledo Marrelli^{a,b}

^a Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP, Brazil

^c Graduate Studies, Research and Innovation Center, FMABC University Center, ABC Foundation, Santo André, SP, Brazil

^d Superintendency for the Control of Endemic Diseases (SUCEN), State Department of Health, São Paulo, Brazil.

^e EcoHealth Alliance, 520 Eighth Avenue, Ste. 1200, New York, NY 10018, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Sylvatic yellow fever
Haemagogus leucocelaenus
Forest edge
Land use

ABSTRACT

Man-made changes to the landscape play a crucial role in altering the epidemiologic patterns of infectious diseases, mainly as a result of pathogen spillover. Sylvatic yellow fever is ideally suited to modeling of this phenomenon as the risk of transmission of the disease as well as its circulation and dispersal are associated with forest fragmentation. In this study we investigated the temporal dispersal pattern of yellow fever virus (YFV) by means of confirmed cases of epizootics in non-human primates in municipalities in the state of São Paulo where there was no recommendation for vaccination in 2017. We analyzed the resistance to dispersal associated with different classes of land use and the geographic distances between the different locations where epizootics were recorded. The model that best explained the temporal dispersal pattern of YFV in the study area indicated that this was influenced by the geographic distance between collection locations and by the permeability of the forest edges (150 m) at the interface with the following core areas: Water, Agricultural, Non-Forest Formation and Forestry. Water, Agricultural, Urban and Forest core areas and the interfaces between the latter two formed important barriers to circulation of the virus. These findings indicate that fragmentation of vegetation tends to decrease the time taken for pathogens to spread, while conservation of forest areas has the opposite effect.

1. Introduction

As the emergence and spread of zoonotic diseases become increasingly common, the risk of epidemics and pandemics becomes ever greater, requiring more integrative and transdisciplinary approaches in the search for solutions to issues related to human, animal and ecosystems health as advocated by the One Health concept (Destoumieux-Garzón et al., 2018; Buregyeya et al., 2020). Emerging infectious diseases place a significant burden on the global economy and public health worldwide. The main infectious agents are bacteria (54.3%) and viruses (25.4%) (Jones et al., 2008). In the case of viruses, most of those that have the potential to cause significant epidemics are of zoonotic origin; most notable are arthropod-borne viruses (arboviruses), which can cause arboviral diseases and adversely affect human health worldwide (Mayer et al., 2017).

Arbovirus spillover into human populations is the result of various

emerging forces, including two key factors: social behavior and changes to the natural environment. The former involves characteristics associated with the geographic expansion of human populations, e.g., the increased amount of international travel and trade, which are considered to play a significant role in the emergence and reemergence of arboviral diseases as viruses are introduced to new areas or even as a result of viruses spreading from a particular area (Mayer et al., 2017). An example of the latter is changes in land use, which can in turn lead to habitat fragmentation. This is reflected not only in the incidence and abundance patterns of potential vector mosquitoes (Zittra et al., 2017), but also in interaction mechanisms between hosts, vectors and pathogens (Zohdy et al., 2019).

In this regard, it is worth highlighting the recent reemergence of yellow fever (YF) of unprecedented magnitude in Brazil in the last decades. The outbreak that occurred in 2014 is still active, with 2276 human cases recorded to date and 2978 laboratory-confirmed epizootics

* Corresponding author at: Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar 470, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: ramonwilk@usp.br (R. Wilk-da-Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106333>

Received 24 December 2021; Received in revised form 24 January 2022; Accepted 25 January 2022

Available online 28 January 2022

0001-706X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

(MS, 2021, 2020, 2019), the probable cause being human expansion combined with environmental changes (Possas et al., 2018).

Yellow fever is an infectious disease that is endemic to tropical and subtropical countries in Africa and South and Central America. It is caused by yellow fever virus (YFV), a member of the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*, which circulates in the wild between non-human primates (NHPs) and mosquitoes in family *Culicidae*, particularly genus *Haemagogus* in South and Central America and *Aedes* (subgenera *Diceromyia* and *Stegomyia*) on the African continent (Chippaux and Chippaux, 2018; Monath and Vasconcelos, 2015). There are estimated to be 208,000 cases annually, and the severe form of the disease affects 78,000 people every year, the majority in Africa (Garske et al., 2014).

In Brazil, the sylvatic cycle of YF (in which humans are infected sporadically when they enter forest areas) is endemic to the Amazon region; however, sylvatic YF spreads through epizootic waves to the Midwest, South and Southeast regions. The urban cycle of the disease (transmitted between humans by *Aedes aegypti*) has not been observed in Brazil since the 1940s (Monath and Vasconcelos, 2015; Possas et al., 2018).

Recently, Abreu et al. (2020), in a study carried out during the re-emergence of YFV in Southeast Brazil, did not find signs of spillover to urban areas. Nevertheless, the same research group had previously found that the virus had persisted in the same region of the Atlantic Forest for at least three consecutive transmission periods (2016–2017, 2017–2018 and 2018–2019) without the need for it to be reintroduced. The authors warned of a possible scenario in which the disease re-emerged seasonally, mainly where Atlantic Forest fragments are close to urban areas (Abreu et al., 2019).

Some recent studies have shown the importance of forest edge density for YFV circulation and dispersal, most notably those by Ilacqua et al. (2021) and Prist et al. (2021) based on Atlantic Forest and Cerrado fragments. The former found an increased risk of human cases and epizootics associated with vegetation cover thresholds of 30%–70% and forest edge density >80 m/ha, while the latter found that the virus uses mainly forest edge environments (≤ 100 m wide) at interfaces with agricultural areas and highways for dispersal.

Landscape ecology is a multidisciplinary field focused on understanding the spatial pattern and heterogeneity of the landscape, as well as its characterization over time, changes that have occurred in the landscape and their causes and consequences, which in turn provides important information for management and policy-making (Hersperger et al., 2021). The spatial heterogeneity of landscapes is a determining factor for the dispersal pattern of organisms (Pérez-Espona et al., 2008), and one way of estimating landscape functional connectivity is by constructing resistance maps, which can be used to represent the relationships between the flow of organisms and landscape characteristics (Spear et al., 2010).

Using landscape functional connectivity, the present study therefore sought to identify possible associations between land use characteristics and YFV dispersal patterns based on a case study of the temporal displacement of epizootics in the state of São Paulo in the year 2017, during the last sylvatic outbreak (2016–2020). We tested the hypothesis that forest edges favor dispersal of the virus whereas Forest core areas afford some degree of resistance and that this factor, when considered together with geographic distance between locations where epizootics occur, can better explain the temporal YFV dispersal pattern through Atlantic Forest fragments as the events are temporally dependent.

2. Material and Methods

2.1. Characterisation of the Study Area

The study area covers the first twenty municipalities affected by YFV in 2017 in an area of the state of São Paulo, Brazil, where there was no recommendation for vaccination. Some of the municipalities are in the two main metropolitan regions of the state, which have an at-risk

population of 15,023,398 according to an IBGE estimate (2021) (Fig. 1 and Table S1).

The state of São Paulo extends over 248,219.48 km² (24.8 million ha) and has an estimated population of 46,649,132, with a population density of 166.25 inhabitants/km² (IBGE, 2021). In the last 30 years, land use in the state has undergone far-reaching changes, an example being the replacement of areas given over to pasture with plantations of semi-perennial crops like sugarcane, mainly in order to satisfy new worldwide demand for biofuels. Modernization and the use of new techniques have led to qualitative and quantitative changes in the new arrangement of agricultural and livestock farming land in the state (Angelo and Ghobril, 2017). Currently, the spatial arrangement in the state is as follows: agricultural sector – 17,778,910 ha (71.6%); area with vegetation – 5,577,114 ha (22.5%), of which 3.9 million ha is made up of Atlantic Forest and 163,674 ha of Cerrado; area without vegetation – 880,768 ha (3.54%); and water bodies – 582,619 ha (2.34%) (Map-Biomass, 2020; SOSMA, 2020).

2.2. Data on epizootics

During 2017, the state of São Paulo confirmed a total of 437 epizootic events in NHPs according to data obtained from the Ministry of Health (under the law on access to information, ref. no. 25820004039202025). Because the records contain only the centroid of the municipality where each event occurred, additional information was requested from the Prof. Alexandre Vranjac Center for Epidemiologic Surveillance (CVE) at the São Paulo State Department of Health. This resulted in 48.3% (n=211) of the exact geographic coordinates of the reports of epizootics being recovered. Subsequently, only those records corresponding to the period after the virus emerged in the municipality of Amparo (13/3/2017) in the Campinas mesoregion (IBGE, 2016) and those corresponding to the Metropolitan São Paulo and Macro Metropolitan São Paulo mesoregions during 2017 were selected as a way of investigating a possible relationship between the temporal displacement of YFV and landscape structure.

2.3. Network analysis

Network analysis allows connection patterns (links) to be identified based on units (nodes) that form a particular network and can therefore represent the connectivity between the nodes that make up the network (Opsahl et al., 2010). The technique can be used to develop a conceptual model, making it suitable for use in a wide range of scientific fields (Ames et al., 2011; Martínez-López et al., 2009). In the present study, once the data had been obtained, a network was built in which the geographic coordinates of the first YF event in each municipality sampled were considered a node (n=20) and the connections to subsequent events were considered links (n=190). For example, the initial event (in Amparo) was connected to 19 subsequent events (epizootics that occurred in the study period and area on dates after the initial event), while event number 2 (in Monte Alegre do Sul) was connected to 18 subsequent events and so on. In our network model, we assumed that all the municipalities can be connected spatially to each other given that the maximum distance between them is 103 km and that mosquitoes can cover long distances by passive dispersal (Verdonschot and Besse-lototskaya, 2014), in some cases as much as hundreds of kilometers (Huestis et al., 2019).

Hence, by considering that each epizootic event could generate all the other subsequent events, we were able to determine the temporal displacement pattern of YFV in the study region as a function of the geographic distance between events and the resistance associated with land use.

2.4. Resistance Matrices

To understand how landscape structure affects dispersal of the virus,

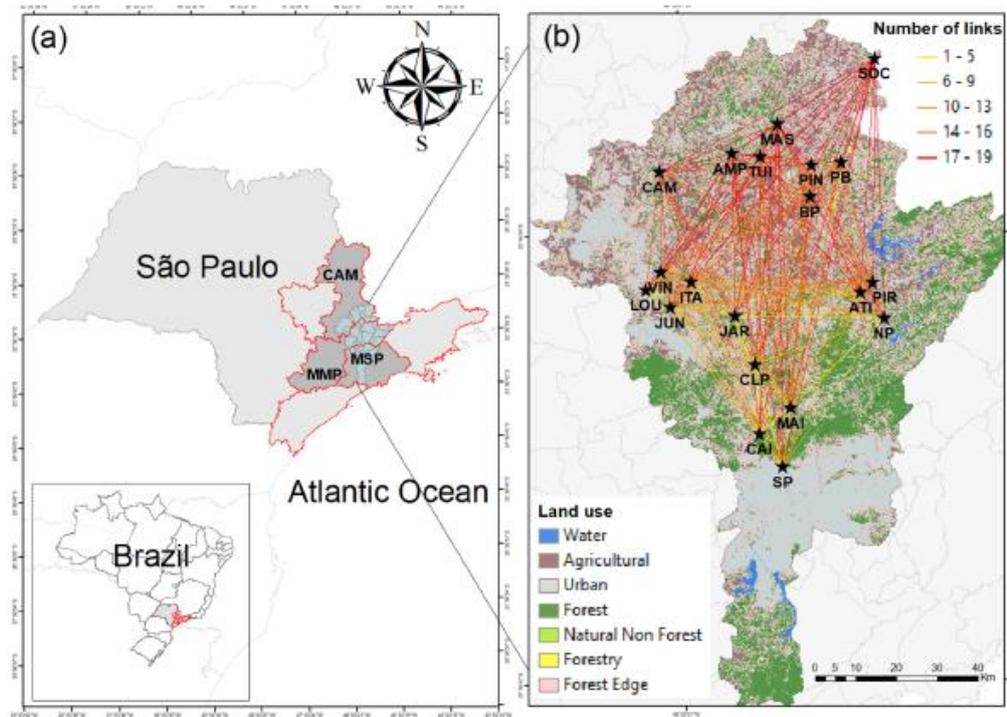


Fig. 1. Map of the state of São Paulo. The gray areas are the mesoregions where the municipalities studied are located: GAM – Campinas, MSP – Metropolitan São Paulo and MMP – Macro Metropolitan São Paulo. The red lines indicate the area where there was no recommendation for vaccination prior to the 2016 outbreak (a). The study area and different land uses are shown on the right. Black stars represent municipalities with recorded epizootics; lines represent the connections between source and target municipalities according to the estimated number of occurrences (b). The map was created in ArcGis version 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).

resistance surface matrices were built using the Brazilian Foundation for Sustainable Development (FBDS) land use map (<https://www.fbds.org.br/>). The FBDS base map has a total of six land use classes: 1) Forest Formation - Tree vegetation native to the Atlantic Forest with a continuous canopy; 2) Water - Continuous water surface; 3) Human-impacted Area - Areas without any native vegetation cover; 4) Built Area - Areas with buildings (<https://www.ibge.gov.br/geociencias/car>

<https://www.ibge.gov.br/geociencias/car>), 5) Non-Forest Formation - Native bushy or herbaceous vegetation and 6) Forestry - *Eucalyptus* sp. or *Pinus* sp. plantations. The map was created by means of supervised classification based on *RapidEye* images from 2013 (scale 1:10,000).

A total of seven surface resistance models were proposed, each of which represents a hypothesis about how land use can affect YFV

Table 1
Matrices and corresponding resistance values assigned to land use classes.

Matrices		Landscape Use Class										
		Water	Agricultural	Urban	Forest	Natural Non-Forest	Forestry	Forest Edge adjacent to Water	Forest Edge adjacent to Agricultural	Forest Edge adjacent to Urban	Forest Edge adjacent to Natural Non-Forest	Forest Edge adjacent to Forestry
Resistance values	Matrix 1	500	500	500	50	300	100	1	1	500	1	50
	Matrix 2	500	500	500	100	300	100	1	1	500	1	50
	Matrix 3	500	500	500	300	300	100	1	1	500	1	50
	Matrix 4	500	500	500	50	300	100	1	1	1	1	1
	Matrix 5	500	500	500	50	300	100	500	500	500	500	500
	Matrix 6	500	500	500	100	300	100	1	1	1	1	1
	Matrix 7	500	500	500	100	300	100	500	500	500	500	500

propagation time in the study region (Table 1). Our premise was that each type of land use, including edge areas and core areas, has different permeability to YFV. The choice of permeability values was based on our group's field experience and advice from YF specialists, but in all matrices more permeable areas had a low resistance (1), while less permeable areas had a high resistance (500). To identify the interfaces between the forest edges and all the other types of land use, 150 m buffers in both directions were created around the forest areas. This distance was defined based on reports of *Haemagogus leucocelaenus*, the main sylvatic YFV vector in the Southeast of Brazil (Vasconcelos, 2010), from our group's collection efforts at the edges of Atlantic Forest fragments. These showed that most of the individuals (69%) had been collected at distances of no more than 150 m within the forest (Wilk-da-Silva R., unpublished data).

A new land use map was then created with forest edges and their interfaces with all other land uses, and this was used as the basis to create a resistance matrix. Resistance values (1 - 500) were assigned to each land use class, where 1 corresponded to low resistance and 500 to high resistance, in order to identify possible influences on the displacement pattern of YFV between the municipalities that recorded epizootics in NHPs during the study period, when the virus was circulating. In order to determine the temporal displacement of YFV between the areas, a peer-to-peer distance matrix made up of the differences in days between the first records of epizootics in each municipality was built (Supplementary Material - Table S1).

A surface resistance matrix (Matrix 1, based on our research group's field experience and advice from YFV specialists - the study working hypothesis) was constructed considering different permeabilities both for the core land use classes and for the contact surfaces between Forest core areas and the respective adjacent land use classes (forest edges), the latter being more permeable than the former (Table 1), regardless of the type of adjacent land use. A further two matrices (Matrices 2 and 3) were prepared based on Matrix 1, and intermediate (100) and high (300) resistance values were used for the Forest core class. Our premise was based on the "dilution effect", according to which the greater the species richness, the lower the chance of hosts and vectors coming into contact (Ostfeld and Keesing, 2000; Schmidt and Ostfeld, 2001). Hence, circulation of YFV could face a certain degree of resistance.

Next, the flow values obtained from the matrices were used with the geographic distances between the locations of the epizootics (both predictor variables) and the difference in days observed between the events (the response variable) to build generalized linear mixed (GLM) models. After the GLM models with the best fit and empirical support were chosen, four other surface resistance matrices (Matrices 4, 5, 6 and 7) were built so as to assign to the edge areas a value corresponding to totally permeable (1) or resistant (500, maximum value). The idea behind this last value was that the forest edges would act as barriers to circulation of YFV and therefore contradict our working hypothesis (Table 1).

2.5. Data analysis

To understand how landscape structure affects YFV dispersal time, flow values based on landscape connectivity were determined with Circuitscape (Anantharaman et al., 2020) using the surface resistance matrices as input. These values were then used in GLM models with negative binomial errors (log link function) constructed with the lme4 (Bates et al., 2015), lmerTest (Kuznetsova et al., 2017) and bbmle (Bolker et al., 2017) packages in the R computing environment.

The values in the matrix containing the differences in days between the dates on which the epizootic was reported in each municipality were used as the response variable, and the flow values between the sampled locations and the geographic distances (km) as the predictor variables. The links (connections) between municipalities were included in the models as a random effect (random variable). A model containing only "geographic distance" as predictor variable was used for the base model

as virus dispersal time is directly influenced by the distance between the areas. Seven models were subsequently built using the flow values obtained from the resistance matrices as an added fixed effect to determine whether this improved the distance model fit (Table 2). Finally, the statistical significance of each of the fixed effect terms in the model with the best fit was determined. The information-theory approach based on the Akaike information criterion (AIC) was applied to select the most plausible statistical models. The models with the smallest AIC were considered the best, and $\Delta AIC \leq 2$ was adopted as the cutoff to select models with more empirical support. The strength of evidence in favor of each model was evaluated using Akaike weights (Burnham and Anderson, 2002).

All the analysis was carried out with ArcGIS 10.5 (<https://www.arcgis.com/>), Circuitscape (Anantharaman et al., 2020) and R 3.5 (R Development Core Team, 2019).

3. Results

The epizootic events included in the study (n=211) were separated by on average 74 days and 29 km. Of the models tested, the Distance + Matrix 2 had the best fit with the temporal virus dispersal pattern based on the 20 municipalities studied (greatest empirical support and strength of evidence - $\Delta AIC = 0$, Weight = 0.4423). This model included an additive effect of geographic distance between the locations where the epizootics occurred and a resistance matrix in which the forest edges were more or less permeable according to the adjacent land use together with a Forest core area with intermediate resistance. The model suggests that both an increase in geographic distance and an increase in resistance associated with land use leads to an increase in the number of days before the first YF report in the municipalities (Fig. 2). Matrix 2, which was used in this model, is based on the following resistance values: maximum value (500) for Water, Agricultural and Urban core areas; a high value (300) for Non-Forest Formations; and an intermediate value (100) for Forest and Forestry. Forest edges were assigned different permeability values depending on the adjacent core land use: 1 for forest edges close to Water, Agricultural and Non-Forest Formations; 500 for edges adjacent to Urban; and 50 for edges adjacent to Forestry (Table 1, Fig. 3b). Fig. 3a shows the map of flows obtained with matrix 2. More intense flows are shown in darker red. A greater predominance of flows can be seen in the northwestern part of the study area.

The second model with the best fit (Distance + Matrix 1) differs from the previous one only in terms of the resistance of the Forest core areas, which is lower (50) than in the first model ($\Delta AIC = 0.1$, Weight = 0.4125), showing that this model is equally plausible. This indicates that landscapes with greater edge density as a result of forest fragmentation facilitate YFV dispersal and therefore contribute to circulation of the virus when sylvatic YF reemerges in areas of the Atlantic Forest.

4. Discussion

The model that best explained the temporal pattern of epizootics in the study area was the one based on the resistance matrix with more permeable forest edges and intermediate resistance for the Forest core areas as well as the geographic distance between the sampled locations where epizootics had been reported. The resistance matrix in this model contained maximum resistance values for Water, Urban and Human-impacted core areas; a high value for Non-Forest formation; and intermediate values for Forest and Forestry. The areas that interfaced with Forest and the other core areas (forest edges) had permeable values for adjacent classes Water, Agriculture and Non-Forest formation; low values for the interface with Forestry; and maximum resistance for Urban.

Forest fragments play an important role in the circulation and maintenance of YFV by maintaining populations of NHPs (Bicca-Marques et al., 2020), primary vectors (*Haemagogus janthinomys* and *Hg. leucocelaenus*) (de Abreu et al., 2019) and other potential vectors

Table 2

Models tested and their parameters (fixed effects) listed according to their degree of fit. A matrix of the differences in days for the first report of YFV in the municipalities studied was used as the response variable.

Model	Intercept	Slope	SE	z value	Pr(> z)	AIC	ΔAIC	df	weight
Distance + Matrix 2	3.251021	0.031361	0.193860	16.770	< 2e-16 ***	2114.7	0	5	0.4423
		-0.003521	0.001103	8.786	< 2e-16 ***				
Distance + Matrix 1	3.227300	0.031661	0.191093	16.889	< 2e-16 ***	2114.9	0.1	5	0.4125
		-0.003897	0.001230	8.842	< 2e-16 ***				
Distance + Matrix 3	3.3307264	0.0295663	0.0036418	8.119	4.72e-16 ***	2117.2	2.5	5	0.1295
		-0.0024192	0.0008828	-2.741	0.00613 **				
Distance + Matrix 6	3.137429	0.026618	0.211140	14.859	< 2e-16 ***	2123.2	8.4	5	0.0065
		0.004506	0.003287	8.099	5.56e-16 ***				
Distance + Matrix 7	3.3630131	0.0277118	0.3694173	9.104	< 2e-16 ***	2123.6	8.8	5	0.0053
		-0.0004542	0.0010285	-0.442	0.659				
Distance + Matrix 4	3.148097	0.026439	0.225662	13.950	< 2e-16 ***	2125.2	10.5	5	0.0023
		0.008598	0.003579	7.387	1.5e-13 ***				
Distance	3.252687	0.026562	0.199384	16.314	< 2e-16 ***	2126.0	11.3	4	0.0016
		0.003617	0.003617	7.343	2.09e-13 ***				
Distance + Matrix 5	4.0606468	0.0305498	0.2146861	18.914	< 2e-16 ***	2133.6	18.9	5	<0.001*
		-0.0020826	0.0041066	7.439	1.01e-13 ***				
			0.0007397	-2.816	0.00487 **				

SE – Standard Error;

*** is significant at $p < 0.001$ level;

** is significant at $p < 0.01$ level;

* is significant at $p < 0.05$ level.

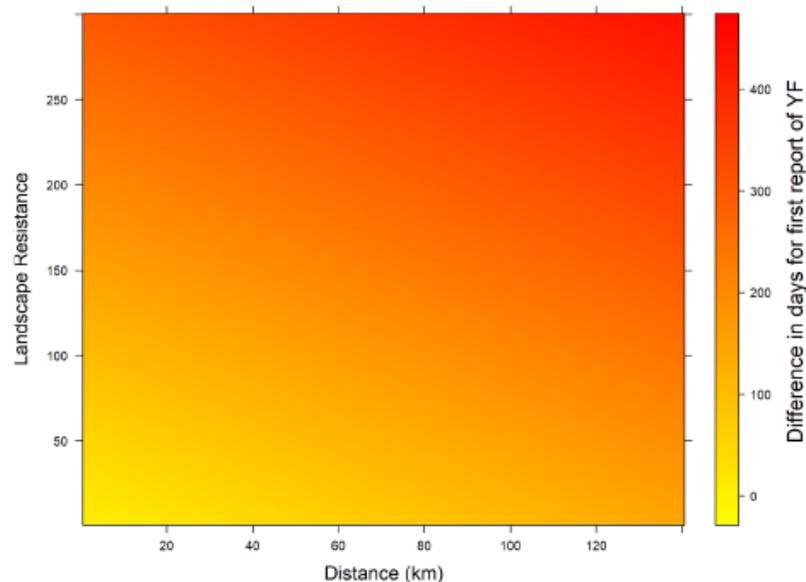


Fig. 2. Relationship between the land use resistance and geographic distance matrix (Distance + Matrix 2) and the matrix of the difference in days for the first report of YF in the municipalities studied. The prediction here is based only on the slopes of the fixed effect terms in the model.

(Cardoso et al., 2010; Couto-Lima et al., 2017; Cunha et al., 2020; Moreno et al., 2011; Segura and Castro, 2007). In addition, the peripheral areas of these fragments, or forest edges, help to maintain populations of *Hg. leucocelaenus* (because of its ecological plasticity to environments subjected to human disturbances) (Lopes, 1997; Silva and Lozovei, 1999; Castro et al., 2010) and exhibit different distribution and abundance patterns of other potential vector species (Wilk-da-Silva et al., 2020). These spaces have been shown to facilitate movement of

YFV (Prist et al., 2021) and to represent a risk for transmission of sylvatic YF (Ilacqua et al., 2021) in areas of the Atlantic Forest (Ilacqua et al., 2021; Prist et al., 2021).

However, our results suggest that these fragments exhibit different responses depending on the adjacent area. For example, interfaces between forests and water surfaces exhibited permeability to the virus, whereas interfaces between forests and urban areas showed maximum resistance values. Core areas consisting of water surfaces are

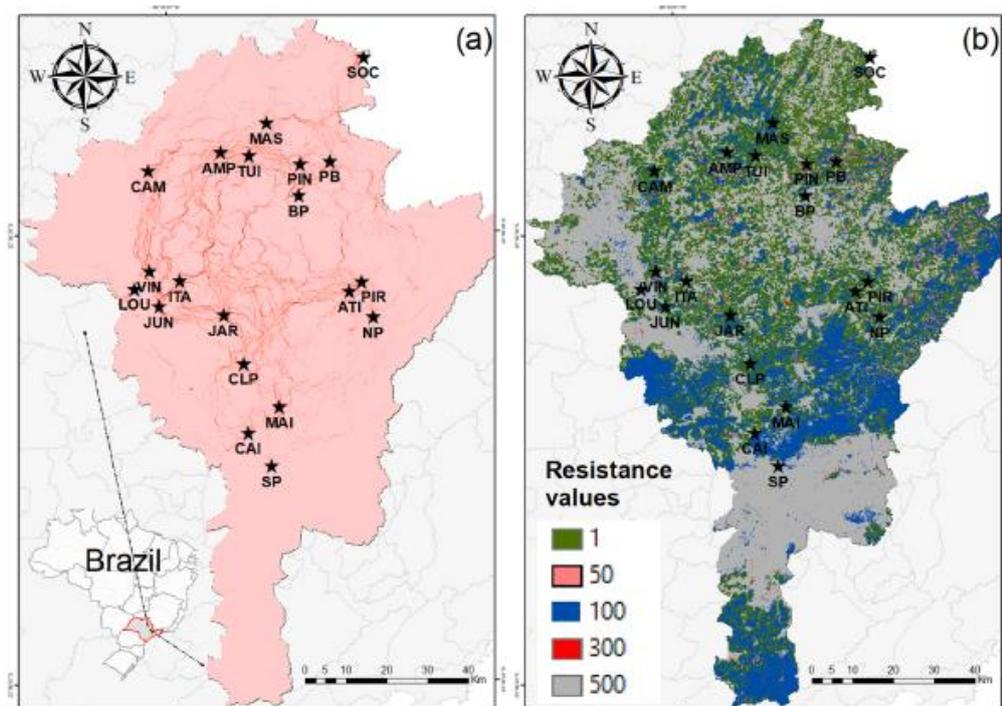


Fig. 3. Map highlighting the study area in the state of São Paulo: (a) flow intensity between sampled points (fields in red indicate greater possibility of flow between locations); (b) Surface resistance map (Matrix 2) based on land use and respective values attributed to each class. The map was created in ArcGIS version 10.2 (<http://resources.arcgis.com/en/help/main/10.2/index.html>).

characterized by the presence of forest formations known as "gallery forests", in which both the main YFV vectors (*Haemagogus janthinomys* and *Hg. leucocelaenus*) and species potentially associated with transmission of this virus can be found (Lira-Vieira et al., 2013). In contrast, the juxtaposition of urban areas and forests has a direct impact on the composition of the flora, leading to a reduction in its richness (Melliger et al., 2018). This in turn is reflected in the patterns of mosquito occurrence and abundance, as shown by the absence of *Hg. leucocelaenus* in urban spaces (Montagner et al., 2018).

Although our results indicate different values for resistance to circulation of YFV in the core areas, most of the areas, such as Water, Agriculture and Urban, had maximum values. This would suggest that the conditions needed for dispersal of YFV are absent and that they are probably related to vector ecology. In the case of urban areas, the spatial configuration of these tends to result in isolated fragments of vegetation in their midst, forming islands of vegetation in which sylvatic vectors such as those of genus *Haemagogus* are absent or present in low abundance (Medeiros-Sousa et al., 2017). This in turn corroborates the probable absence of YFV circulating in urban centers (Monath and Vasconcelos, 2015).

Areas given over to agriculture can become places where humans and mosquitoes interact, particularly when one considers the presence of different mosquito communities (Zittra et al., 2017) associated with human activities in these locations. An example of this is the seasonal hiring for sugarcane harvesting, an activity which despite making use of new technologies still requires human labor (Prist et al., 2016). Nevertheless, our findings suggest that in the specific case of YFV areas such as these may not favor dispersal of the virus.

With regard to the intermediate resistance values for the remaining

core areas (Forest and Forestry), the value for the former is in agreement with the dilution effect, according to which the greater the species richness, the less the chance of hosts and vectors of a particular pathogen coming into contact (Ostfeld and Keesing, 2000; Schmidt and Ostfeld, 2001). This highlights the importance of conserving these areas to ensure the integrity of the landscape and avoid the risk of pathogen spillover to human populations (Plowright et al., 2021). At the same time, it signals the need for a better understanding of the interdependence between humans, animals and the environment so that sufficient information for mitigation measures can be gathered when necessary following the One Health approach (Buregyeya et al., 2020). The resistance value for Forestry may be related to the different responses of mosquito species to the environment. For example, Young et al. (2021) observed differences between mosquito communities along a gradient extending from inside a palm plantation to inside a forest on the island of Borneo. However, the same study failed to identify differences in the abundance of *Aedes albopictus* between the locations. Interestingly, individuals of this species found in the Atlantic Forest have been shown to be susceptible to YFV infection (Couto-Lima et al., 2017).

The fact that forest edges were permeable to YFV, as suggested by the present study, together with the possibility that the virus may persist in Atlantic forest fragments for two or three seasonal periods after it is introduced (Abreu et al., 2019), illustrates the epidemiologic role forest fragments and corridors play in both dispersal and maintenance of the virus.

Currently, habitat fragmentation is one of the main causes of biodiversity loss (Haddad et al., 2015). Fragmented areas can also favor the emergence and reemergence of infectious diseases in human populations, primarily as a result of the exposure of humans to the

pathogens in these areas (Zohdy et al., 2019). The high degree of fragmentation of native vegetation in the Atlantic Forest biome (Joly et al., 2014) can lead to spillover of YFV to human populations, causing an increase in prevalence as a result of the greater density of NHPs (Mborá and McPeck, 2009) and changing pathogen-host dynamics inside the vegetation fragments (Zohdy et al., 2019).

The YF outbreak in the Atlantic Forest had a major impact on public health and transmission of the disease and occurred because the virus found a perfect scenario in which to expand its geographic distribution. Although the Atlantic Forest biome is considered a biodiversity hotspot, its forest cover has been reduced to 28% of its original extent and is highly fragmented (Rezende et al., 2018). Habitat shrinkage has been shown to lead to a higher concentration of howler monkeys, one of the main YFV hosts in South America (Bicca-Marques et al., 2020). Forest fragmentation can lead to a greater primate density, which can in turn cause YFV to become more prevalent (Mborá and McPeck, 2009). Deforestation can therefore lead to forest patches in which primate hosts are concentrated, favoring the vector mosquitoes (*Hg. leucocelanus* in particular) and leading to YFV spillover to humans.

Spillover events involving pathogens found in the wild, such as YFV, have increased two- to threefold in the last decade compared with 40 years earlier (Carroll et al., 2018; Morse et al., 2012). These events are very common in tropical areas because of the high species richness in such areas and are usually associated with natural environments that have been turned over to agriculture and livestock breeding (Johnson et al., 2020). Generally, the species that manage to survive in these environments are precisely those that carry pathogens and are known to be hosts and vectors of diseases (Gibb et al., 2020).

Recently, we have seen this happen with the Ebola (EBOV) epidemic in Western Africa in 2014 (Pandey et al., 2014) and the YF epidemic in Brazil in 2016 and 2018 (Faria et al., 2018). The emergence of SARS-CoV-2 (Guarner, 2020) in a tropical forest in Southeast Asia was probably the result of a similar process.

The mechanism underlying the (re)emergence of viral infections of zoonotic origin (e.g., EBOV, YFV, SARS-CoV-2) in human populations is linked to anthropogenic loss of biosphere integrity, especially in tropical forests (Dobson et al., 2020). It is reasonable to surmise that these emergences may be associated with what we here call “viral start-up microcosmoses”, which represent locations with the necessary characteristics for virus maintenance, transmission and geographic expansion. Hence, an understanding of the patterns and processes that govern YFV maintenance and displacement and give rise to these microcosmoses is of fundamental importance in the implementation of more effective prevention and control measures to reduce the risk of reurbanization of this virus in Brazil and other South American countries.

One of the main limitations of the present study may be related to the area sampled since it covers only a small part of the Atlantic Forest in the state of São Paulo and, consequently, does not represent the whole area where transmission of YFV occurs. Further studies covering a larger area should therefore be carried out.

5. Conclusion

This study suggests that forest fragments (edge areas) are more permeable to YFV, that Forest core areas offer intermediate resistance to dispersal of the virus and that built-up areas offer greater resistance. The temporal pattern of YFV displacement between different municipalities in the state of São Paulo can be better explained when landscape resistance is added to the effect of geographic distance.

Credit authorship contribution statement

Ramon Wilk da Silva: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Formal analysis. Antônio Ralph Medeiros-Sousa: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - review & editing, Supervision. Gabriel

Zorello Laporta: Investigation, Data curation, Review & editing. Luls Filipe Mucci: Investigation, Visualization, Review & editing. Paula Ribeiro Prist: Formal analysis, Review & editing. Mauro Toledo Marrelli: Conceptualization, Project administration, Funding acquisition, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors wish to thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP ref. nos. 2018/25437-6, 2018/18751-6 and 2017/23127-7), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 301865/2018-3) and the Superintendency for Endemic Disease Control (SUCEN) of the São Paulo State Health Department for their financial support. We would also like to thank the Prof. Alexandre Vranjac Center for Epidemiologic Surveillance at the São Paulo State Department of Health for making available the geographic coordinates of the locations where epizootics occurred. Finally, we would also like to thank Dr. João Marcelo Pereira Alves, assistant professor in the Parasitology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, for allowing and helping us to use the servers so that the data involving the resistance matrix rasters could be processed.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.actatropica.2022.106333.

References

- Abreu, F.V.S.deD., Ferreira-de-Brito, A., Azevedo, A.de D.S., Linhares, J.H.R., de Oliveira Santos, V., Miranda, Hime H., et al., 2020. Survey on Non-Human Primates and Mosquitoes Does not Provide Evidences of Spillover/Spillback between the Urban and Sylvatic Cycles of Yellow Fever and Zika Viruses Following Severe Outbreaks in Southeast Brazil. *Viruses* 12, 364.
- de Abreu, F.V.S., Ribeiro, I.P., Ferreira-de-Brito, A., Santos, A.A.C., Miranda, R.M., Bonelly, I.S., et al., 2019. *Haemagogus leucocelanus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes Infect.* 8, 218–231. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>.
- Abreu, F.V.S., Delatorre, E., Santos, A., Ferreira-de-Brito, A., Castro, M., Ribeiro, I., et al., 2019. Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons 114. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076>.
- Ames, G.M., George, D.B., Hampson, C.P., Kanarek, A.R., McBee, C.D., Lockwood, D.R., et al., 2011. Using network properties to predict disease dynamics on human contact networks. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 3544–3550. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0290>.
- Anantharaman, R., Hall, K., Shah, V.B., Edelman, A., 2020. Circuitscape in Julia: High Performance Connectivity Modelling to Support Conservation Decisions. *JuliaCon Proc* 1, 58. <https://doi.org/10.21105/jcon.00058>.
- Angelo, J.A., Ghobril, C.N., 2017. Estudos Sobre a Ocupação e Uso do Solo Agrícola no Estado de São Paulo, Período de 1990 a 2015. *Análises e Indicadores do Agronegócio* 12, 1–6.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67 <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Bicca-Marques, J.C., Chaves, Ó.M., Haas, G.P., 2020. Howler monkey tolerance to habitat shrinking: Lifetime warranty or death sentence? *Am. J. Primatol.* 82, 1–9. <https://doi.org/10.1002/ajp.23089>.
- Bolker, B., R.D.C.T., 2017. *bbmle: Tools for General Maximum Likelihood Estimation*. (R package version 1.0.20).
- Buregyeya, E., Atusingwize, E., Nsamba, P., Musoke, D., Naigaga, I., Kabasa, J.D., et al., 2020. Operationalizing the One Health Approach in Uganda: Challenges and Opportunities. *J. Epidemiol. Glob Health* 10 (4), 250–257. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.200825.001>.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2002. *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*, Second. Springer US, New York.
- da Cardoso, J.C., de Almeida, M.A.B., dos Santos, E., da Fonseca, D.F., Sallum, M.A.M., Noll, C.A., et al., 2010. Yellow Fever Virus in *Haemagogus leucocelanus* and *Aedes serratus* Mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1918–1924. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100608>.

- Carroll, D., Watson, B., Togami, B., Daszak, P., Mazet, J.A.K., Chrisman, C.J., et al., 2018. Building a global atlas of zoonotic viruses. *Bull. World Health Organ.* 96, 292–294. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.205005>.
- Castro, G.A., Torres, M.A.N., Paula, M.E., Fernandes, A., Marassá, A.M., Consales, C.A., Fonseca, D., 2010. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizooticas do vírus da febre amarela. Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde* 19, 101–113. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742010000200003>.
- Chippaux, J.P., Chippaux, A., 2018. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 24, 20. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0162-y>.
- Couto-Lima, D., Madec, Y., Berset, M.I., Campos, S.S., Motta, M.D.A., dos Santos, F.B., et al., 2017. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci. Rep.* 7, 4848. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>.
- Cunha, M.S., Tubaki, R.M., de Menezes, R.M.T., Pereira, M., Caleiro, G.S., Coelho, E., et al., 2020. Possible non-sylvatic transmission of yellow fever between non-human primates in São Paulo city, Brazil, 2017–2018. *Sci. Rep.* 10, 15751. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72794-x>.
- Destoumieux-Garzon, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., et al., 2018. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front. Vet. Sci.* 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>.
- Dobson, A.P., Pimm, S.L., Hannah, L., Kaufman, L., Ahumada, J.A., Ando, A.W., et al., 2020. Ecology and economics for pandemic prevention. *Science* 369, 379–381. <https://doi.org/10.1126/science.abc3189> (80-).
- Faria, N.R., Kraemer, M.U.G., Hill, S.C., Goes de Jesus, J., Aguiar, R.S., Iani, F.C.M., et al., 2018. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 361, 894–899. <https://doi.org/10.1126/science.aar7115> (80-).
- Garske, T., Van Kerkhove, M.D., Yactayo, S., Ronveaux, O., Lewis, R.F., Staples, J.E., et al., 2014. Yellow Fever in Africa: Estimating the Burden of Disease and Impact of Mass Vaccination from Outbreak and Serological Data. *PLoS Med* 11, e1001638. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001638>.
- Gibb, R., Redding, D.W., Chin, K.Q., Donnelly, C.A., Blackburn, T.M., Newbold, T., Jones, K.E., 2020. Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature* 584, 990–1002. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2562-8>.
- Guarner, J., 2020. Three Emerging Coronaviruses in Two Decades. *Am. J. Clin. Pathol.* 153, 420–421. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa029>.
- Haddad, N.M., Brudvig, L.A., Globert, J., Davies, K.F., Gonzalez, A., Holt, R.D., et al., 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci. Adv.* 1, e1500052. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052>.
- Hersperger, A.M., Grádinaru, S.R., Pierrri Daunt, A.B., et al., 2021. Landscape ecological concepts in planning: review of recent developments. *Landscape Ecol* 36, 2329–2345. <https://doi.org/10.1007/s10980-021-01193-y>.
- Huestis, D.L., Dao, A., Diallo, M., Sanogo, Z.L., Samake, D., Yaro, A.S., et al., 2019. Windborne long-distance migration of malaria mosquitoes in the Sahel. *Nature* 574, 404–408. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1622-4>.
- IBGE, 2021. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Cidades e Estados [WWW Document]. URL <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/> (accessed Dec 2 2021).
- IBGE, 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades - São Paulo [WWW Document]. URL <http://cod.ibge.gov.br/YGZ> (accessed Dec 2 2021).
- Iacocca, R.C., Medeiros-Sousa, A.R., Ramos, D.G., Obara, M.T., Ceretti-Junior, W., Mucci, L.P., et al., 2021. Reemergence of Yellow Fever in Brazil: The Role of Distinct Landscape Fragmentation Thresholds. *J. Environ. Public Health* 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/8230789>.
- Johnson, C.K., Hitchens, P.L., Pandit, P.S., Rushmore, J., Evans, T.S., Young, C.W., Doyle, M.M., 2020. Global shifts in mammalian population trends reveal key predictors of virus spillover risk. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287, 20192736. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2736>.
- Joly, C.A., Joly, C.A., Metzger, J.P., Tabarelli, M., 2014. Tansley review Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives 459–473.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B., 2017. ImerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J. Stat. Softw.* 82. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.
- Lira-Vieira, A.R., Gurgel-Gonçalves, R., Moreira, I.M., Yoshizawa, M.A.C., Coutinho, M. L., Prado, P.S., et al., 2013. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the gallery forest of Brasília National Park, Brazil, with an emphasis on potential vectors of yellow fever. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46, 566–574. <https://doi.org/10.1590/s0037-8682-0136-2013>.
- Lopes, J., 1997. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. V. Coleta de larvas em recipientes artificiais instalados em mata ciliar. *Rev. Saude Publica* 31, 370–377. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101997000400006>.
- MapBiomass, 2020. Projeto Maobiomass: Coleção 5.0 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil, período em 1985 e 2019. [WWW Document]. MapBiomass. URL <https://plataforma.mapbiomas.org/> (accessed Dec 2 2021).
- Martínez-López, B., Perez, A.M., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2009. Social Network Analysis. Review of General Concepts and Use in Preventive Veterinary Medicine. *Transbound. Emerg. Dis.* 56, 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01073.x>.
- Mayer, S.V., Tesh, R.B., Vasilakis, N., 2017. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global perspective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop* 166, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>.
- Mbora, D.N.M., McPeck, M.A., 2009. Host density and human activities mediate increased parasite prevalence and richness in primates threatened by habitat loss and fragmentation. *J. Anim. Ecol.* 78, 210–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01481.x>.
- Medeiros-Sousa, A.R., Fernandes, A., Ceretti-Junior, W., Wilke, A.B.B., Marrelli, M.T., 2017. Mosquitoes in urban green spaces: using an inland biogeographic approach to identify drivers of species richness and composition. *Sci. Rep.* 7, 17826. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18208-x>.
- Melliger, R.L., Braschler, B., Rusterholz, H.P., Baur, B., 2018. Diverse effects of degree of urbanisation and forest size on species richness and functional diversity of plants, and ground surface-active ants and spiders. *PLoS One* 13, e0199245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199245>.
- Monath, T.P., Vasconcelos, P.F.C., 2015. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 64, 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>.
- Montagner, F.R.G., Silva, O.S., Jahnke, S.M., 2018. Mosquito species occurrence in association with landscape composition in green urban areas 1–7. *J. Biol.* <https://doi.org/10.1590/1519-6984.04416>.
- Moreno, E.S., Rocco, I.M., Bergo, E.S., Brasil, R.A., Siciliano, M.M., Suzuki, A., et al., 2011. Reemergência de febre amarela: Detecção de transmissão no estado de São Paulo, Brasil, 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 290–296. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000041>.
- Morse, S.S., Mazet, J.A.K., Woolhouse, M., Parrish, C.R., Carroll, D., Karesch, W.B., et al., 2012. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *Lancet* 380, 1956–1965. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61684-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61684-5).
- MS, 2021. Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika, 2015 a 2020, Boletim Epidemiológico.
- MS, 2020. Ministério da Saúde: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes*, Boletim Epidemiológico Arboviroses.
- MS, 2019. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde: Nota informativa No169 de 2019 - CGARB/DEIDT/SVS/MS.
- Opsahl, T., Agneessens, F., Skvoretz, J., 2010. Node centrality in weighted networks: Generalizing degree and shortest paths. *Soc. Networks* 32, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.socnet.2010.03.006>.
- Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2000. Biodiversity and Disease Risk: the Case of Lyme Disease 14, 722–728.
- Pandey, A., Atkins, K.E., Medlock, J., Wenzel, N., Townsend, J.P., Childs, J.E., et al., 2014. Strategies for containing Ebola in West Africa. *Science* 346, 991–995. <https://doi.org/10.1126/science.1260612> (80-).
- Pérez-España, S., Pérez-Barbería, F.J., Mcleod, J.E., Jiggins, C.D., Gordon, I.J., Pemberton, J.M., 2008. Landscape features affect gene flow of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*). *Mol. Ecol.* 17, 981–996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03629.x>.
- Plowright, R.K., Reaser, J.K., Locke, H., Woodley, S.J., Patz, J.A., Becker, D.J., et al., 2021. Land use-induced spillover: a call to action to safeguard environmental, animal, and human health. *Lancet Planet. Heal.* 5, e237–e245. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00031-0).
- Posas, C., Lourenço-de-Oliveira, R., Tauli, P.L., Pinheiro, F.P., Pizzinatti, A., Cunha, R.V., et al., 2018. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, e180278. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180278>.
- Prist, P., Tamboi, L., Mucci, L., Pinter, A., de Souza, R., Muyllaert, R., et al., 2021. Roads and forest edges facilitate yellow fever virus dispersion. *J. Appl. Ecol.* 1–14. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14031>.
- Prist, P.R., Uriarte, M., Tamboi, L.R., Prado, A., Pardini, R., D'Andrea, P.S., Metzger, J. P., 2016. Landscape, environmental and social predictors of Hantavirus risk in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 11, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163459>.
- Rezende, C.L., Scarano, F.R., Assad, E.D., Joly, C.A., Metzger, J.P., Strassburg, B.B.N., et al., 2018. From hotspot to hotspot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspect. Ecol. Conserv.* 16, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2018.10.002>.
- Schmidt, K.A., Ostfeld, R., 2001. Biodiversity and the Dilution Effect in Disease Ecology. *Ecol. Soc. Am.* 609–619, 10.1890/0012-9658(2001)082[0609:BATDEJ]2.0.CO;2.
- Segura, M.N., Castro, F., 2007. Atlas of Culicidae in the Brazilian Amazon: Characteristics of Hematophagous Insects of the Family Culicidae. Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.
- Silva, M.A.N., Lozovei, A.L., 1999. Ocorrência de *Haemagogus* (*Conopostegus*) *leucoclaenus* (Dyar & Shannon) e *Toxorhynchites* (*Lynchella*) *theobaldi* (Dyar & Knab) em ocas de árvore em capão de mata, Curitiba, Paraná. *Brasil. Rev. Bras. Zool.* 16, 257–267. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000500018>.
- SOSMA, 2020. Qual é a área de cobertura da Mata Atlântica? [WWW Document]. Fundação SOS Mata Atl. URL <https://www.sosma.org.br/artigos/qual-e-area-de-cobertura-da-mata-atlantica/> (accessed Dec 2 2021).
- Spear, S.F., Balkenhol, N., Portin, M.J., Mcrae, B.H., Scribner, K., 2010. Use of resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for parameterization and analysis. *Mol. Ecol.* 19, 3576–3591. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04657.x>.
- Vasconcelos, P.F.C., 2010. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev. Saude Publica* 44, 1144–1149. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.04416>.
- Verdonchot, P.F.M., Besse-lototskaya, A.A., 2014. Flight distance of mosquitoes (Culicidae): A metadata analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologia* 45, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2013.11.002>.
- Wijk-da-Silva, R., Mucci, L.P., Ceretti-Junior, W., Duarte, A.M.R.D.C., Marrelli, M.T., Medeiros-Sousa, A.R., 2020. Influence of landscape composition and configuration

R. Wijk-da-Silva et al.

Acta Tropica 228 (2022) 106333

- on the richness and abundance of potential sylvatic yellow fever vectors in a remnant of Atlantic Forest in the city of São Paulo, Brazil. *Acta Trop.* 204 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105385>.
- Young, K.I., Buenemann, M., Vasilakis, N., Perera, D., Hanley, K.A., 2021. Shifts in mosquito diversity and abundance along a gradient from oil palm plantations to conterminous forests in Borneo. *Ecosphere* 12. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3463>.

- Zittra, C., Vitecek, S., Obwaller, A.G., Rossiter, H., Eigner, B., Zechmeister, T., et al., 2017. Landscape structure affects distribution of potential disease vectors (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors* 10, 205. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2140-6>.
- Zohdy, S., Schwartz, T.S., Oaks, J.R., 2019. The Coevolution Effect as a Driver of Spillover. *Trends Parasitol* 35, 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.010>.

ANEXO 2. Influence of landscape composition and configuration on the richness and abundance of potential sylvatic yellow fever vectors in a remnant of Atlantic Forest in the city of São Paulo, Brazil.

Acta Tropica 204 (2020) 105385



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Influence of landscape composition and configuration on the richness and abundance of potential sylvatic yellow fever vectors in a remnant of Atlantic Forest in the city of São Paulo, Brazil.



Ramon Wilk-da-Silva^{a,*}, Luis Filipe Mucci^c, Walter Ceretti-Junior^b,
Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte^c, Mauro Toledo Marrelli^{a,b}, Antônio Ralph Medeiros-Sousa^b

^a Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, Av. Dr. Enes Carvalho de Aguiar 470, São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP, Brazil

^c Superintendency for the Control of Endemic Diseases (SUCEN), State Department of Health, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Sylvatic yellow fever
Haemagogus leucocelaenus
Forest cover

ABSTRACT

The landscape's structure can play a relevant role in epidemic patterns of arboviruses, influencing factors such as abundance, movement, and dispersal ability in arthropod vectors and vertebrate hosts, besides promoting alterations in the rate of potential infectious contacts between these organisms. In the Americas, yellow fever (YF) exhibits only the sylvatic cycle, in which the virus circulates in sylvatic areas among non-human primates, being transmitted by mosquitoes of the *Haemagogus* and *Sabethes* genera. In this study, we investigate some aspects of the landscape in relation to diversity and abundance of culicid species associated with YF transmission. Studies were performed in the Cantareira State Park, a remnant of the Atlantic Forest located in Greater Metropolitan São Paulo, Brazil, where the YF virus circulated recently with dozens of deaths in howler monkeys (*Alouatta guariba*), in addition to reported human cases. Mosquito collections were carried out monthly from February 2015 to April 2017. Mosquitoes were collected from three sites using battery-powered aspirator (12-volt battery), CDC, and Shannon traps for adults, and suction samplers and entomological spoons in breeding sites to collect immature forms. 703 mosquitoes belonging to 12 species of the Aedini and Sabethini tribes were collected. *Aedes scapularis* and *Psorophora ferox* exhibited higher abundance, while *Haemagogus leucocelaenus*, the main vector of YF in São Paulo state, showed lower abundance in all sampled areas. The site with longer edge between forest area and anthropic area presented more richness and abundance of YF vector species, while the site with larger forest cover area and shorter edges between forest and anthropic areas exhibited an inverse pattern. Statistically significant differences were observed between the composition of potential YF vector species among the investigated sites. Although *Hg. leucocelaenus* occurred in all sampled sites, the different patterns of distribution and abundance of other mosquitoes such as *Aedes scapularis* and *Psorophora ferox* suggest that these species may be involved in the transmission of sylvatic YF in the study area.

1. Introduction

Yellow fever (YF) is an endemic infectious disease in tropical and subtropical countries in Africa and South America. Estimated annual burden is about 208,000 cases, and the severe form can affect 78,000 people, with most cases occurring in Africa (Garske et al., 2014). The etiological agent of YF is the yellow fever virus (YFV) of the Flavivirus genus (Flaviviridae family), mainly transmitted by mosquitoes of the *Haemagogus* and *Aedes* genera in South America and Africa, respectively (Monath and Vasconcelos, 2015).

Regions of West, East, and Central Africa still experience YF

outbreaks involving the urban transmission cycle, where YFV is transmitted between humans by *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes. In addition, an intermediate (rural) and a sylvatic transmission cycle of YFV have also been observed in these areas, including various species of *Aedes* mosquitoes and humans and non-human primates (NHPs). In South and Central America, YF only occurs in the sylvatic cycle, where humans are infected accidentally by sylvatic mosquitoes in forest areas (Monath and Vasconcelos, 2015).

Changes in landscape patterns by anthropic activities can play a significant role in the modification of epidemic patterns of infectious diseases, mainly affecting the abundance and movement of arthropod

* Corresponding author.

E-mail address: ramonwilk@usp.br (R. Wilk-da-Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105385>

Received 17 September 2019; Received in revised form 31 January 2020; Accepted 31 January 2020

Available online 03 February 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

vectors and vertebrate hosts, besides promoting changes in the contact rates among these organisms (Lambin et al., 2010). Such landscape alterations involve the suppression and fragmentation of natural vegetation, leading to loss of local biodiversity (Haddad et al., 2015). Additionally, this scenario can drive an elevation in mosquito populations, including some disease vectors (Norris, 2004), given the changes in abiotic (microclimatic) (Clements, 1992) and biotic factors (competition and predation levels) (Tsurim et al., 2013; Freed et al., 2014), both directly associated with the mosquitoes' development cycle. Furthermore, environmental changes can promote an increase in availability of blood sources, such as humans and other vertebrates, contributing to an increase in the abundance of some mosquito species, as observed with *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* in South and Southeast Brazil during the YF outbreak in 2008 and 2009 (Gomes et al., 2010). In addition, environmental changes have been suggested as key processes in the rapid spread of YF in recent outbreaks in Brazil (Possas et al., 2018), with 778 confirmed cases (262 deaths) from 2016 to 2017 and 1376 cases (483 deaths) from 2017 to 2018 (MS, 2018).

The last sylvatic YF outbreak in São Paulo State started in 2016 with two human cases confirmed in the northwest region of the State, following 293 epizootic events in NHPs. In early 2017, YFV struck a region with no prior recommendation of vaccination. However, prompt action by health services with ring vaccination avoided many YF cases until December that year, when the outbreak underwent rapid expansion. The record number of epizootic events persisted throughout the year 2017, reducing in cold months, and the YFV dispersal proceeded southward towards Greater Metropolitan São Paulo (GMSP), with about 21 million inhabitants (Emplasa, 2018). In October 2017, the first cases of YF were recorded in GMSP, following an epizootic outbreak in NHP in Alberto Löfgren State Park (ALSP), located in the city of São Paulo. About four months later, the first autochthonous human case was reported in a resident in the vicinity of the Cantareira State Park (CSP) (SES-SP, 2019).

The dispersal pattern of YFV in São Paulo state indicates the northern area of São Paulo city as the probable route of the virus' introduction in the city (Fioravanti, 2018). This area is characterized by remnants of Atlantic Forest, including one of the world's largest urban forests (CSP), formerly home to one of the largest populations of howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*), in addition to *Callicebus nigrifrons*, *Sapajus nigritus*, and *Callithrix* (Trevelin et al., 2007). The introduction of YFV was later confirmed after the emergence of a YF epizootic, which quickly decimated the local howler monkey population in ALSP and CSP (SMA, 2018). Previously, in 2016, our research group had already recorded the presence of *Hg. leucocelaenus* and other species of mosquitoes, potential YF vectors, in a survey of mosquito biodiversity (Diptera: Culicidae) in CSP (Mucci et al., 2016). At the time, we issued an alert that this area was the probable route for YFV introduction in the city of São Paulo.

Given the importance of the Cantareira State Park as one of the main routes for YFV introduction in the city of São Paulo, the current study focused on key aspects of the landscape in different areas of the CSP in relation to biodiversity patterns and abundance of *Hg. leucocelaenus*, as well as other potential YF vectors.

2. Material and methods

2.1. Characterization of study area

Cantareira State Park (CSP) is located in the core zone of the Green Belt Biosphere Reserve in the city of São Paulo, covering parts of four municipalities in Greater Metropolitan São Paulo (São Paulo, Mairiporã, Caieiras, and Guarulhos), and has 7916.52 hectares of total area with a 90.5-km perimeter (SMA, 2009). The local climate is mesothermal and humid with wet summers and dry winters, with average annual precipitation of 1322 mm (Cwa of the Köppen-Geiger system) (Kottek et al., 2006), where some areas present remarkable

microclimatic modulation according to topography, forest cover, wind, and pollutant dispersion. The natural vegetation of CSP is characterized by dense montane ombrophilous forest associated with plateau semi-deciduous forest elements. The vegetation presents several stages of regeneration, with a predominance of intermediate stages and a few significant patches with advanced and climax stages (SMA, 2009). Related to the biodiversity of vertebrate species, the CSP presents: 97 species of mammals; 233 species of birds; 28 species of amphibians; 20 species of reptiles, and 10 species of fishes (SMA, 2009).

Three areas were selected for entomological collections, with differences in proportion of forest cover, degree of conservation and anthropic use inside and around the CSP (urban spaces, gated communities, and recreational clubs). The Bica Trail (23°27.237'S, 46°38.089'W) is located in the southern part of the CSP and presents the highest degree of changes in vegetation, being situated on the edge of a transition with a consolidated urban area. This trail is about 1400 m long, with an average altitude of 750 m, and is the place where park visitors usually go hiking. The park's administrative area (23°27.062'S, 46°38.143'W) exhibits an intermediate degree of changes in vegetation. It is located at a higher altitude than the Bica Trail (average height 900 m) and consists of a space with daily circulation of employees, with fewer visitors. The area features artificial lakes, and its vegetation is regenerated, with epiphytes and lianas, in addition to open and built areas. The Pinheirinho Trail (23°24.624'S, 46°37.205'W) exhibits fewer changes to the vegetation. The trail is about 4000 m long and is located at an average altitude of 1100 m. This area features natural streams, preserved forest (25–30 m of canopy) with underwood elements, and abundant epiphytes and lianas; visitation is intense, especially on weekends. The space is characterized by the presence of upscale gated communities (SMA, 2009) (Fig. 1).

2.2. Collection of specimens

Monthly collections of mosquitoes were performed from February 2015 to April 2017 (collection license number 44740-3, Ministry of the Environment of Brazil). The adult collections were both diurnal and nocturnal. Diurnal collections were performed from November 2015 to April 2017 with CDC light traps using CO₂ bait at each sampling point (one in level of ground – about 1.5 m – and another in level of canopy) (Fig. 2a and b) and an operating period from 14:00 h to 18:00 h, in addition to use of a battery-powered aspirator (12-volt battery) for 20 min. Nocturnal collections were performed from February 2015 to April 2017 using CDC traps with CO₂ bait installed in the same sampling points of the diurnal collections and the operating period from 18:00 h to 06:00 h. Besides this technique, Shannon's traps were employed to collect mosquitoes for two hours beginning at twilight (Fig. 2c). Collections of immature forms were performed from February 2015 to April 2017 (between 08:00 h and 14:00 h), and specimens were obtained through suction samplers used in tree holes and exposed bamboo internodes, besides entomological spoons in puddles and artificial breeding sites. Both adult and immature forms were captured once a month, from 08:00 h to 06:00 h, totalizing approximately 20 days of collection effort.

2.3. Descriptors of the landscape

A buffer of 500 m around the sampling points was determined to calculate the landscape metrics. Each point was georeferenced and plotted on the map of Atlantic Forest biome remnants in the city of São Paulo (a 1:50,000-scale orthophoto mosaic, available at <http://maps.sosma.org.br/dados/>) (Figs. 1 and 3). Classification of elements in the landscape was based on the CSP management plan (SMA, 2009) and aerial maps (<https://www.bing.com/maps>). Landscape elements were classified as: forest area with intermediate and high degrees of conservation (FA); consolidated urban area (CUA); anthropic area associated with forest area (AAF); lake areas (LA); the edge between FA and

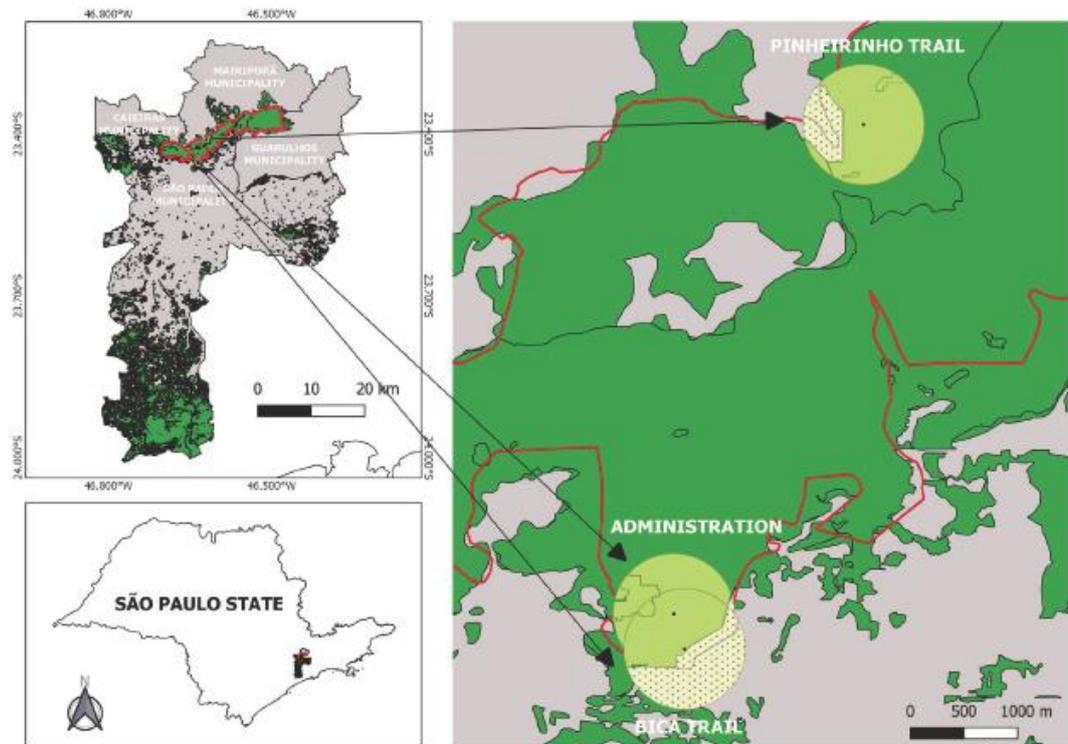


Fig. 1. Location of sampled areas in Cantareira State Park (red outline) and their landscapes in a 500-m radius around each collection point; plant cover is highlighted in light green, while urban areas are dotted. The map was constructed using QGIS v2.18.17 (<http://www.qgis.org>).

CUA; and the edge between FA and AAF (Table 2). All analyses were performed with QGIS 2.18 (<http://www.qgis.org>) and Fragstats 4.2 (https://www.umass.edu/landeco/research/fragstats/documents/fragstats_documents.html). The landscape classification and quantification were later used to compare abundance, richness, and composition patterns of the mosquitoes potentially associated with YF transmission in the sampled areas. The study defined potential YFV vectors as the species reported by Mucci et al. (2016) in the same locations.

2.4. Statistical analysis

To investigate differences between the composition of YFV vectors presented at each site was used a permutational multivariate analysis of variance based on Bray-Curtis dissimilarity indices matrix. (Anderson, 2001; Bray and Curtis, 1957). This analysis allows fitting a linear model by partitioning distance matrices among sources of variation and can be used to test if two or more sites have similar species composition. The significance test was performed using F-tests obtained

from 1000 permutations. In addition, a similarity percentage analysis (SIMPER) based on the decomposition of Bray-Curtis dissimilarity index (Clarke, 1993) was used to determine the contribution of individual species to the overall dissimilarity between investigated sites. Statistical analyses were conducted with the R software, version 3.5 (R Development Core Team, 2019) using the vegan package (Oksanen et al., 2019).

3. Results

Considering only the Aedini and Sabethini tribes, 703 mosquitoes were collected, belonging to 12 species. Of this total, *Aedes scapularis* and *Psorophora ferox* were the most abundant species, while *Haemagogus leucocelaenus*, the main vector of sylvatic YF in São Paulo state, was present in all sampled areas, but it was less abundant. The mosquito species considered the main vector of Yellow Fever Virus in Brazil, *Haemagogus janthinomys/capricornii*, was not observed in this study. In relation to species of genus *Sabethes*, at least three were



Fig. 2. Types of traps used in the collection of mosquitoes. a – CDC light trap in level at canopy; b – CDC light trap at level ground and c – Shannon trap.



Fig. 3. Proportion of forest cover, degree of conservation, and urban use in the sampled areas based on a buffer of 500 m around each collection point in the Cantareira State Park (CSP).

Table 1
Number of adult specimens, immature forms, and richness by sampled area.

Species	Code	Administration			Bica Trail			Pinheirinho Trail			Total number of specimens	
		DA	NA	I	DA	NA	I	DA	NA	I	TA	TI
<i>Aedes fluviatilis</i>	sp1	1	4	0	8	20	0	0	3	0	36	0
<i>Aedes scapularis</i>	sp2	0	44	0	7	154	0	1	83	0	289	0
<i>Aedes serratus</i>	sp3	0	1	0	0	0	0	2	1	0	4	0
<i>Aedes terreus</i>	sp4	0	14	0	4	11	0	7	16	0	52	0
<i>Aedes aegypti</i>	sp5	0	0	0	0	1	22	0	0	35	1	57
<i>Aedes albopictus</i>	sp6	0	4	8	8	12	0	0	4	31	28	39
<i>Haemagogus leucoceleus</i>	sp7	1	2	1	0	4	8	0	3	51	10	60
<i>Psorophora ferox</i>	sp8	0	5	0	3	5	0	61	24	3	98	3
<i>Sabethes undosus/fabrici/ignotus</i>	sp9	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3	0
<i>Sabethes purpureus</i>	sp10	1	1	0	1	0	0	5	10	3	18	3
<i>Sabethes melanosymphie</i>	sp11	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Sabethes sp</i>	sp12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Total		3	75	9	32	207	30	78	146	123	541	162
Number of species richness			8			9			12			

DA – Diurnal Adults; NA – Nocturnal Adults; I – Immature Forms, TA – Total Adults and TI – Total Immature Forms.

detected, with *Sabethes purpureus* as the most frequent (Table 1).

Among the species collected during the diurnal period, *Psorophora ferox* was the most abundant, with 64 specimens (56.6%) out of 113 individuals, representing approximately 80% of the total individuals collected in the Pinheirinho Trail and 9% in the Bica Trail (Fig. 4b). Concerning the nocturnal period, *Aedes scapularis* was the most abundant species, with 281 specimens (65.6%) out of 428 individuals, representing approximately 74% of the total individuals collected in the Bica Trail, 59% in Administration Sector and 56% in the Pinheirinho Trail (Fig. 4a). As for immature forms, *Hg. leucoceleus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. albopictus* were collected in larger numbers, with 60, 57, and 39 individuals, respectively (Table 1). Immature forms of *Hg. leucoceleus* were found in tree holes and exposed bamboo internodes. While *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* specimens were found predominantly in artificial breeding sites, some individuals were collected in epiphytic bromeliads and exposed bamboo internodes.

The area with the highest proportion of forest cover and highest degree of conservation, Pinheirinho Trail, exhibited greater species richness and abundance in the diurnal collections of adult mosquitoes,

with a predominance of *Ps. ferox*. In the same area, immatures forms were collected in larger numbers, with a predominance of *Hg. leucoceleus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. albopictus* (Table 1). Concerning nocturnal collections, the largest abundance of adult mosquitoes was observed along the Bica Trail, the area with the lowest proportion of forest cover and lowest degree of conservation (Fig. 4e). All sampled areas had a predominance of *Ae. scapularis* during the nocturnal collections (Fig. 4c, e and f). The species *Hg. leucoceleus* was also observed in all sampled areas during the nocturnal collections, of which three specimens were collected in crepuscular time (between 18:00 h and 19:00 h) in Shannon trap, while other six specimens were collected by CDC's traps throughout the night (Table 1).

As shown in Table 2, Pinheirinho Trail, the area with the greatest richness (12 species) and abundance of potential sylvatic YF vectors (347 individuals), exhibited the longest edge between forest area and anthropic area associated with forest (Edge AF x AAF) (5948 m of length), in addition to no edge between forest area and consolidated urban area (Edge AF X CUA). Meanwhile, the sampled area located in the park's administrative facilities, where we observed the lowest

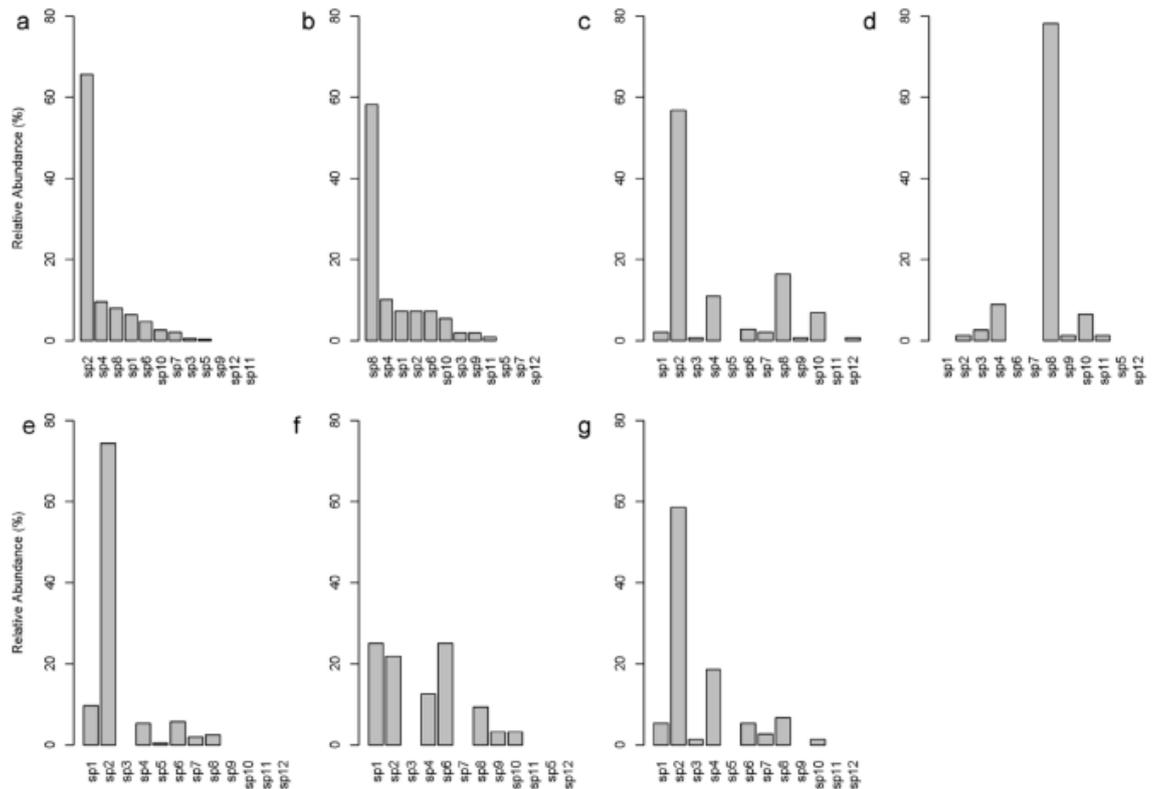


Fig. 4. Proportion of species dominance based on the three sampled areas in the Cantareira State Park. Nocturnal collections: a, c, e and g, Cantareira State Park, Pinheirinho Trail, Bica Trail and Administration, respectively. Diurnal collections: b, d and f, Cantareira State Park, Pinheirinho Trail and Bica Trail, respectively. sp1 - *Aedes fluviatilis*; sp2 - *Aedes scapularis*; sp3 - *Aedes serratus*; sp4 - *Aedes terreus*; sp5 - *Aedes aegypti*; sp6 - *Aedes albopictus*; sp7 - *Haemagogus leucocelaenus*; sp8 - *Psorophora ferox*; sp9 - *Sabethes undosus/fabricti/ignotus*; sp10 - *Sabethes pupureus*; sp11 - *Sabethes melanonymphe*, sp12 - *Sabethes sp.* The park's administrative area was removed of analysis of diurnal collections, due to its low sampling (only three during the entire period).

Table 2

Landscape metrics in a buffer of 500 m from the central point in each sampled area. FA. Forest area with intermediary and advanced degrees of plant conservation; CUA – Consolidated urban area, AAF – Anthropic area associated with forest area (built and recreational areas inside the park and high-rise apartment complex). LA – Lake areas, Edge FA x CUA – Edge length between forest area and consolidated urban area and Edge FA x AAF – Edge length between forest area and anthropic area associated with forest area.

Collection area	FA (m ²)	CUA (m ²)	AAF (m ²)	LA (m ²)	Edge FA x CUA (m)	Edge FA x AAF (m)
ADM	78,124	10,729	610	1001	1730	1310
BICA	60,479	28,372	4924	17,890	2014	4305
PINH	68,260	0	20,657	0	0	5948

richness (8 species) and abundance (87 individuals), has a shorter edge between forest area and anthropic area associated with forest (1310 m of length).

The permutational multivariate analysis of variance to adult mosquitoes collected during the diurnal period showed a statistically significant difference ($F = 4.6659$; $p = 0.001$) in species composition between the investigated environments. In relation to adult mosquitoes collected during the nocturnal period, a statistically significant difference ($F = 1.9907$; $p = 0.026$) species composition between sites was

Table 3

Permutational multivariate analysis of variance based on Bray–Curtis dissimilarity indices matrix. The significance test was performed using F-tests based on sequential sums of squares from 1000 permutations of the raw data.

Diurnal collections (adult mosquitoes)						
	degrees of freedom	sums of squares	mean squares	F	R-squared	p-value
Sites	1	1.4784	1.4784	4.6659	0.2059	0.001
Residuals	18	5.7032	0.3168		0.7941	
Total	19	7.1816			1	
Nocturnal collections (adult mosquitoes)						
	degrees of freedom	sums of squares	mean squares	F	R-squared	p-value
Sites	2	1.4052	0.7026	1.9907	0.0797	0.026
Residuals	46	16.2346	0.3529		0.9203	
Total	48	17.6398			1	
Total adults and immatures						
	degrees of freedom	sums of squares	mean squares	F	R-squared	p-value
Sites	2	1.6886	0.8443	2.3767	0.0838	0.002
Residuals	52	18.472	0.3552		0.9162	
Total	54	20.1606			1	

Table 4
Analysis of similarity percentage (SIMPER) showing the contribution of different mosquito species to the overall Bray–Curtis dissimilarity index. For each pair of compared sites are presented the four most important species.

Compared sites	Species	Average contribution to overall dissimilarity (decomposition of Bray-Curtis index)	Cumulative contribution (%)
Pinheirinho Trail and Bica Trail (diurnal collections)	<i>Psorophora ferox</i>	0.339	0.368
	<i>Aedes scapularis</i>	0.138	0.518
	<i>Aedes albopictus</i>	0.136	0.665
	<i>Aedes fluviatilis</i>	0.106	0.781
Pinheirinho Trail and Bica Trail (nocturnal collections)	<i>Aedes scapularis</i>	0.297	0.338
	<i>Psorophora ferox</i>	0.138	0.495
	<i>Aedes terreus</i>	0.112	0.623
	<i>Aedes fluviatilis</i>	0.105	0.743
Pinheirinho Trail and Administration (nocturnal collections)	<i>Aedes scapularis</i>	0.294	0.357
	<i>Aedes terreus</i>	0.185	0.546
	<i>Psorophora ferox</i>	0.145	0.723
	<i>Sabethes purpureus</i>	0.076	0.816
Bica Trail and Administration (nocturnal collections)	<i>Aedes scapularis</i>	0.362	0.449
	<i>Aedes terreus</i>	0.138	0.621
	<i>Aedes fluviatilis</i>	0.113	0.762
	<i>Aedes albopictus</i>	0.091	0.875
Pinheirinho Trail and Bica Trail (total adults and immatures)	<i>Aedes scapularis</i>	0.215	0.242
	<i>Psorophora ferox</i>	0.139	0.399
	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	0.128	0.542
	<i>Aedes aegypti</i>	0.111	0.668
Pinheirinho Trail and Administration (total adults and immatures)	<i>Aedes scapularis</i>	0.191	0.216
	<i>Psorophora ferox</i>	0.186	0.393
	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	0.130	0.541
	<i>Aedes albopictus</i>	0.102	0.657
Bica Trail and Administration (total adults and immatures)	<i>Aedes scapularis</i>	0.302	0.380
	<i>Aedes albopictus</i>	0.111	0.520
	<i>Aedes fluviatilis</i>	0.105	0.653
	<i>Aedes terreus</i>	0.104	0.784

observed. Considering the total of adult and immature mosquitoes a statistically significant difference ($F = 2.3767$; $p = 0.002$) in species composition between sites was also observed (Table 3). The SIMPER analysis points out that *Ae. scapularis* and *Ps. ferox* were the species that most contributed to the differences found in species composition based on the Bray–Curtis dissimilarity index (Table 4).

4. Discussion

The main vector of sylvatic YFV, *Hg. leucocelaenus*, was found in low abundance throughout the study period. Peak biting activity in this species tends to occur between 10:00 h and 15:00 h; however, almost all adult specimens of this mosquito collected in the current study were obtained from traps set at night, indicating an uncommon pattern for these mosquitoes. The occurrence of this species in all sampled areas indicates that differences found between site landscape metrics used in this study probably did not influence the species' occurrence.

Sabethes genus tends to be found more often in preserved forest areas (Dorville, 1996). The Pinheirinho Trail, characterized as the most preserved forest area in this study, apparently provides wider micro-habitat variability and availability for this group, which influenced the number of observed species from this genus.

Among the most abundant species, *Ps. ferox* exhibited higher abundance associated with areas with longer edges between forest areas and anthropic areas, in the vicinity of gated communities located inside the CSP, while *Ae. scapularis* was more abundant in areas with longer edges between forest areas and consolidated urban areas. Our data thus suggest a possible adaptive advantage for this species as a function of the edge effect. However, *Ps. ferox* apparently experiences lower success in areas with higher contrast of the landscape, when compared to *Ae. scapularis*. The fact that both species have been found naturally infected with YFV in Southeast Brazil (Moreno et al., 2011; Abreu et al., 2019) and the apparent pattern of abundance associated with edge length observed in this study suggest an eco-epidemiological scenario in which *Ps. ferox* and *Ae. scapularis* may be acting to spread YFV between

forest fragments. As demonstrated, mosquitoes have a flight range of 25 m–6 km (Verdonschot and Besse-Lototskaya, 2014). A longer flight range, in addition to this species' abundance pattern, might constitute a relevant factor in the dynamics of YFV spread, with an estimated displacement of four kilometres a day (Fioravante, 2018).

Concerning other species in this study, the observed variations in abundance between sampled areas suggest a possible response pattern influenced by intrinsic characteristics related to the species' ecology. In this sense, although less modified natural areas tend to have a high number of sylvatic YF vectors, their abundance and presence depend on how their populations respond to differences in environmental disturbances. Therefore, our data suggest and reinforce the relevance of knowledge and monitoring of abundance, richness, and composition of mosquito species involved in the transmission of sylvatic YF, as support for decision-making in prevention and control programs.

The increase in species diversity of mosquitoes related to increases in forest cover proportions and degrees of conservation in the sampled areas can be associated with greater variety and availability of natural breeding sites and food sources; on the other hand, smaller and more disturbed fragments are subject to reduced availability and variety of natural larval habitats (Loaiza et al., 2017; Medeiros-Sousa et al., 2017).

In relation to species dominance during nocturnal collections, *Ae. scapularis* occurred in large numbers throughout the study and exhibited high abundance in all sampled areas. Its presence in diverse areas has been observed in previous studies, evidencing its wide incidence both in sylvatic areas and around human dwellings (Forattini et al., 2000; Guimarães et al., 2000).

Psorophora ferox was the predominant species during the diurnal collections. Although this species accounted for about 80% of the total diurnal adult mosquitoes collected along the Pinheirinho Trail, the area with the most preserved forest area in the CSP, it did not show similar abundance on the Bica Trail, the area with the least forest cover and conservation. *Psorophora ferox* has been observed in dense forest areas (Guimarães et al., 2000) and gallery forests, or vegetation formed along

rivers (Lira-Vieira et al., 2013), usually found in larger quantities in low-vegetation strata and with females that do not show a predilection for specific blood sources, biting humans and other vertebrates according to their availability (Forattini, 2002; Lira-Vieira et al., 2013).

To date, *Ae. aegypti* is the only proven domiciled species responsible for transmitting YFV in urban areas in South America (Klitting et al., 2018). In our study, this species was found unexpectedly in both disturbed and intact forest areas. Although the Pinheirinho Trail was the sampled area with the highest degree of conservation, all the collected specimens in our study were found in artificial breeding sites (bottles, cans, and bowls with stored water) localized at the beginning of the trail, near residential areas, as well as along a roadway with considerable pedestrian and vehicle traffic. This observation reinforces the association of *Ae. aegypti* with the presence and proximity of humans.

Aedes albopictus was one of the most frequently collected species in immature forms and was also observed in its adult form in all sampled areas, although with low numbers. This species displays wide distribution, occurring in both rural and urban areas, and has been found in a wide variety of natural and artificial breeding sites (Higa, 2011). In addition, *Ae. albopictus* populations in Rio de Janeiro, Brazil, located in the Atlantic Forest, areas with recent YFV circulation, were shown to be highly competent in transmitting this virus in laboratory tests (Couto-Lima et al., 2017).

In the present study, *Hg. leucocephalus*, the main vector of sylvatic YFV in the South of Brazil (Vasconcelos, 2010), occurred in all sampled areas. The results thus corroborate previous studies (Lopes, 1997; Silva and Lozovei, 1999; Gomes et al., 2010), suggesting the species' ecological plasticity in disturbed areas, with its specimens found in Atlantic Forest fragments with different degrees of conservation and surrounding land use (Alencar et al., 2016). Concerning its contribution to the circulation and maintenance of YFV in the sampled areas, and considering both total collected specimens and recent YFV activity in the Cantareira State Park, evidenced by high mortality of NHPs with some 144 deaths in the region including the CSP (SES-SP, 2019), our data suggest that this vector alone is not able to sustain local YFV transmission. In this sense, we hypothesize the involvement of other culicids in YFV transmission in CSP, such as *Ae. scapularis* and *Ps. ferox*, which showed high abundance in this study.

5. Conclusion

The observed differences in patterns of distribution and abundance of culicids in the present study suggest that besides mosquitos of *Haemagogus* and *Sabethes* genera, species from other genera such as *Ae. scapularis* and *Ps. ferox* can contribute to the spread and maintenance of yellow fever virus in sylvatic areas. Furthermore, it was observed that the composition of potentially YFV vectors varied in sites with different landscape compositions and configurations. The alarming number of epizootics recorded in the Cantareira State Park, besides evidence of the wide circulation of YFV in the last YF outbreak, reinforces the importance of studies on mosquito fauna associated with the transmission of pathogens along with elements of the landscape associated with vector richness, composition, and abundance. Additionally, studies focusing on natural infectivity and vector capacity are necessary to better understand the role of these potential vectors in the dynamics of YFV circulation.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grants nos. 2014/50444-5 and 2014/10919-4. RWS was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) Ref. no. 2017/23127-7.

CRedit authorship contribution statement

Ramon Wilk-da-Silva: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft. Luis Filipe Mucci: Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. Walter Ceretti-Junior: Methodology, Writing - review & editing. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte: Writing - review & editing. Mauro Toledo Marrelli: Writing - review & editing. Antônio Ralph Medeiros-Sousa: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors hereby declare that they have no competing interests in this study.

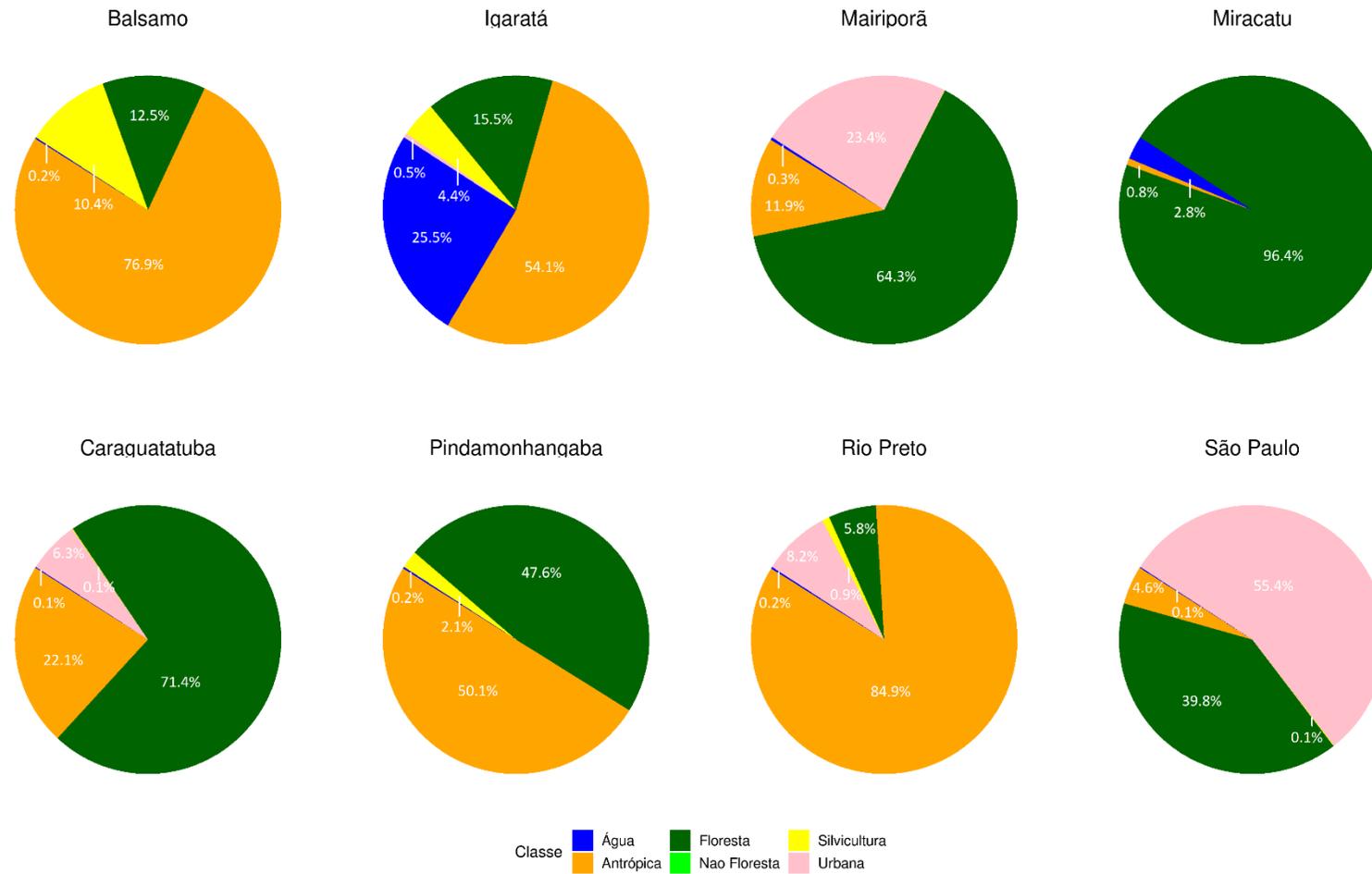
Acknowledgements

We would like to express our gratitude to the field and laboratory teams at the Superintendency for the Control of Endemic Diseases, São Paulo Zoonosis Control Center, and the School of Public Health, São Paulo University: João Carlos do Nascimento, Paulo Frugoli dos Santos, Luis Milton Bonafé, Antônio Waldomiro de Oliveira, Laércio Molinari, Gabriel Marcelino Neto, Luiz Sposito Jr, Renildo Souza Teixeira, Aristides Fernandez, Rafael Oliveira-Christe, Daniel Pagotto Vendrami, Gabriela Cristina de Carvalho, Eduardo Evangelista de Souza and Amanda Alves Camargo. We also express gratitude to Vladimir Arrais, Marcio Carvalho, and Aline Taminao from São Paulo Forestry Institute by logistics and permission to work in the park.

References

- Abreu, F.V.S., Ribeiro, I.P., Ferreira-de-Brito, A., Santos, A.A.C., Miranda, R.M., Bonelly, L.S., 2019. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg Microbes Infect.* 8, 218–231. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>.
- Alencar, J., Mello, C.F., Gil-Santana, L.F., Maia, H.R., Marcondes, D.A., Silva, C.B., et al., 2016. Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 351–356.
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral. Ecol.* 26, 32–46.
- Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27, 325–349.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral. J. Ecol.* 18, 117–143.
- Clements, A.N., 1992. *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction* 1. CAB International, London.
- Couto-Lima, D., Madec, V., Benoit, M.J., Campos, S.S., Motta, M.A., Santos, F.D.B., et al., 2017. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci. Rep.* 7, 1–12.
- Dorville, L.F.M., 1996. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in Southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in the literature. *Stud. Neotrop. Fauna* 31, 68–78.
- Emplasa, 2018. *Empresa de Planejamento Metropolitano da Grande São Paulo S/A. Região Metropolitana do Estado de São Paulo.* <https://www.emplasa.sp.gov.br/RMSP/> (accessed 14 April 2019).
- Ricravanti, C., 2018. O combate à febre amarela no estado de São Paulo: História, desafios e inovações. *CVE/SES*, São Paulo.
- Forattini, O., Kakitani, I., Santos, R.L.C., Kobayashi, K.M., Hueno, H.M., Fernandez, Z., et al., 2000. Adults *Aedes albopictus* and *Aedes scapularis* behavior (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil. *J. Publ. Health.* 34, 179–183.
- Forattini, O.P., 2002. *Culicidologia Médica* 2. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Freed, T.Z., Kesavaraju, B., Leisham, P.T., 2014. Effects of Competition and Predation by Native Mosquitoes on the North American Invasion of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 51, 1159–1167.
- Ganek, T., Kerkhove, M.D.V., Yactayo, S., Ronveaux, O., Lewis, R.F., et al., 2014. Yellow fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med.* 11, e1001638. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001638>.
- Gomes, A.C., Torres, M.A.N., Paula, M.B., Fernandez, A., Marassá, A.M., Corsales, C.A., et al., 2010. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizooticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde* 19, 101–113.
- Guimarães, A., Gentile, C., Lopes, C.M., Mello, R.P., 2000. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. III - Daily Biting Rhythms and Lunar Cycle Influence. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 95, 753–760.

- Haddad, N.M., Brudvig, L.A., Clobert, J., Davies, K.F., Gonzalez, A., Holt, R.D., et al., 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci. Adv.* 1, e1500052. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052>.
- Higgs, Y., 2011. Dengue Vectors and their Spatial Distribution. *Trop. Med. Health.* 39, 17–27.
- Kitting, R., Fischer, C., Dreder, J.F., Gould, E.A., Roiz, D., Paupy, C., et al., 2018. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (II). *Genes* 9, 425.
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., Rubel, F., 2006. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Z.* 15, 259–263.
- Lambin, E.F., Tran, A., Vanwambeke, S.O., Linard, C., Soti, V., 2010. Pathogenic landscapes: interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts. *Int. J. Health Geogr.* 9, 54.
- Lira-Vieira, A.R., Gurgel-Goncalves, R., Moreira, I.M., Yoshizawa, M.A.C., Coutinho, M.P., Prado, P.S., et al., 2013. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the gallery forest of Brasília National Park, Brazil, with an emphasis on potential vectors of yellow fever. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46, 566–574.
- Loaiza, J.R., Dutari, L.C., Rovira, J.R., Sanjur, O.L., Laporta, G.Z., Pecor, J., et al., 2017. Disturbance and mosquito diversity in the lowland tropical rainforest of central Panama. *Sci. Rep.* 7, 1–13.
- Lopes, J., 1997. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. V. Coleta de larvas em recipientes artificiais instalados em mata ciliar. *Rev. Saude Publ.* 31, 370–377. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101997000400006>.
- Medeiros-Sousa, A.R., Fernandes, A., Ceretti-Junior, W., Wilke, A.B.B., Marrelli, M.T., 2017. Mosquitoes in urban green spaces: using an island biogeographic approach to identify drivers of species richness and composition. *Sci. Rep.* 7, 17826.
- Momath, T.P., Vasconcelos, P.F.C., 2015. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 64, 160–173.
- Moreno, E.S., Rocco, I.M., Bergo, E.S., Brasil, R.A., Siciliano, M.M., Suzuki, A.S., et al., 2011. Reemergência de febre amarela: Detecção de transmissão no estado de São Paulo, Brasil, 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 290–296.
- MS, 2018. Ministério da Saúde. Monitoramento do período sazonal da febre amarela no Brasil 2017/2018. 2, 11. <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/21/a5Informe-febre-amarela-2c.pdf> (accessed 15 Jun 2019).
- Mucci, F.L., Medeiros-sousa, A.R., Ceretti-jr, W., Fernandes, A., Camargo, A.A., Evangelista, E., et al., 2016. *Haemagogus leucocelaenus* and other mosquitoes potentially associated with sylvatic yellow fever in Cantareira State Park in the São Paulo Metropolitan Area. *Braz. J. Am. Mosquito Contr.* 32, 329–332.
- Norris, D.E., 2004. Mosquito-borne diseases as a consequence of land use change. *EcolHealth* 1, 19–24.
- Okunnen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Sclymos, P., Wagner, H., 2019. 'vegan' Community Ecology Package. Version 2.5-5. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>.
- Possas, C., Lourenço-de-Oliveira, R., Tsaili, P.L., Pinheiro, F.P., Pissinatti, A., Cunha, R., Homma, A., et al., 2018. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 113 (10), 1–12. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180278>.
- R Development Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing [WWW Document]. URL: <https://www.r-project.org/> (accessed 10.11.19).
- SES-SP, 2019. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Boletim Epidemiológico Febre Amarela 3, 1–5. <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/homepage/destaques/febre-amarela-boletim-epidemiologica/> (accessed 2 Jun 2019).
- Silva, M.A.N., Lozovei, A.L., 1999. Ocorrência de *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar & Shannon) e *Toxorhynchites (Lynchella) thabaldi* (Dyar & Knab) em ocos de árvore em capão de mata, Curitiba, Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 16, 257–267.
- SMA, 2009. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Fundação Florestal. Plano de manejo: Parque Estadual da Cantareira. <http://fflorestal.sp.gov.br/pagina-inicial/planos-de-manejo/planos-de-manejo-concluidos/plano-de-manejo-peda-cantareira/> (accessed 2 Jun 2019).
- SMA, 2018. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Horto Florestal: Informações sobre a febre amarela. <http://fflorestal.sp.gov.br/informacoes-sobre-a-febre-amarela/> (accessed 5 Jun 2019).
- Trevelin, L.C., Port-Carvalho, M., Silveira, M., Morell, E., 2007. Abundance, habitat use and diet of *Callitricheus nigrifrons* Spix (Primates, Pitheciidae) in Cantareira State Park, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 24, 1071–1077.
- Tsurim, I., Silberbush, A., Ovadia, O., Blaustein, L., Margalith, Y., 2013. Inter- and intra-specific density-dependent effects on life history and development strategies of larval mosquitoes. *Plos One* 8, e57875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057875>.
- Vasconcelos, P.F., 2010. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev. Saude Publ.* 44, 1144–1149.
- Verdonschot, P.F.M., Besse-Lototskaya, A.A., 2014. Flight distance of mosquitoes (Culicidae): a meta-analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologia* 45, 69–79.



ANEXO 3. Configuração da paisagem obtida por meio de *buffers* de 5.700 metros, ao redor dos pontos de coleta, baseados na distância máxima de dispersão da espécie *Haemagogus leucocelaenus* (Causey et al., 1950).