

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

Marcela Mori Menzato

Atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de  
laboratório

São Paulo

2023

MARCELA MORI MENZATO

Atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de  
laboratório

Versão Revisada

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

Área de concentração: Saúde Pública.

Linha de pesquisa: Entomologia em Saúde  
Pública.

Sub-Linha de pesquisa: Taxonomia e  
Bioecologia de artrópodes vetores de doenças  
transmissíveis.

Orientadora: Prof. Dra. Tamara Nunes de  
Lima Camara.

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Catálogo da Publicação

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

Menzato, Marcela Mori  
Atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus*  
(Diptera: Culicidae) em condições de laboratório / Marcela Mori Menzato; orientador Tamara Nunes de Lima Camara. --  
São Paulo, 2023.  
63 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da  
Universidade de São Paulo, 2023.

1. *Culex quinquefasciatus*. 2. Atividade locomotora. 3.  
Ritmo circadiano. I. Camara, Tamara Nunes de Lima, orient.  
II. Título.

Nome: MENZATO, Marcela Mori

Título: Atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório.

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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Juliana Telles de Deus

Instituição: Instituto Pasteur

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

Profa. Dra. Regiane Maria Tironi de Menezes

Instituição: Instituto Pasteur

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

Profa. Dra. Tamara Nunes de Lima Camara

Instituição: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

Julgamento \_\_\_\_\_

Ao meu esposo, Mauricio Camargo Trida, com amor, a quem admiro e agradeço por todo companheirismo e apoio, não apenas durante a elaboração deste trabalho, mas por grande parte da minha vida profissional e acadêmica. Obrigada por fazer parte da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Tamara Nunes de Lima Camara, por todo o aprendizado, paciência, carinho e dedicação ao me orientar.

Ao Dr. Paulo Roberto Urbinatti e Rosa Maria Marques de Sá Almeida, por todo o apoio, disposição e conhecimento para a realização dos experimentos.

À Dra. Marcia Bicudo de Paula, pela disposição de discussões acadêmicas e consultoria em sua área de expertise.

Ao Prof. Dr. Lincoln Suesdek Rocha, pela disposição e fornecimento das larvas utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Daniel Cardoso Portela Câmara, pelo suporte e colaboração no desenvolvimento estatístico.

Ao Dr. Fredy Galvis Ovallos, pela disposição e fornecimento da alimentação sanguínea aos mosquitos, sem o qual não teria sido possível o desenvolvimento de parte deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887597162/2021-00

## RESUMO

MENZATO, M. M. Atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório. 2023. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

Ritmos biológicos de insetos vetores têm sido estudados com o objetivo de melhor compreender seus comportamentos e traçar estratégias de controle mais eficientes para reduzir a disseminação de patógenos. *Culex quinquefasciatus* possui competência vetorial para diversos patógenos de importância médica, como a filária causadora da Filariose Bancroftiana e o arbovírus *West Nile* (WNV). O presente trabalho tem como objetivo estudar a atividade locomotora de *Cx. quinquefasciatus* em diferentes condições fisiológicas, comparando machos, fêmeas virgens, fêmeas inseminadas, fêmeas alimentadas com sangue e fêmeas inseminadas e alimentadas com sangue. Além disso, comparamos a atividade locomotora de fêmeas inseminadas por cópula com machos com a de fêmeas inseminadas a partir da inoculação intratorácica de extrato de glândulas acessórias de seus machos coespecíficos. Nossos resultados mostraram que a atividade locomotora de machos e fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* é noturna, com pico pronunciado no apagar das luzes. Observamos que tanto as fêmeas virgens quanto as inseminadas, após alimentação sanguínea, apresentam redução da atividade locomotora durante a escotofase em comparação com os demais grupos, especialmente as inseminadas e alimentadas com sangue. Em contrapartida, as fêmeas inseminadas e não alimentadas apresentaram aumento significativo na atividade locomotora durante a escotofase em comparação aos demais grupos. Ao compararmos os grupos de fêmeas não injetadas - virgens e inseminadas - com os grupos das fêmeas injetadas, observamos que estas apresentaram menor atividade locomotora do que aquelas. Entre as não injetadas, fêmeas inseminadas apresentaram maior atividade locomotora do que as virgens, enquanto, entre os grupos das injetadas, as fêmeas virgens inoculadas com glândulas acessórias de machos coespecíficos apresentaram maior atividade do que as inseminadas injetadas com solução salina. Esse estudo fornece importantes informações acerca da atividade locomotora dessa espécie, que podem ajudar na compreensão da dinâmica de transmissão de patógenos, direcionar novas pesquisas, além de auxiliar na elaboração de estratégias de vigilância e controles.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*. Atividade locomotora. Ritmo circadiano.

## ABSTRACT

MENZATO, M. M. Locomotor activity of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. 2023. Dissertation (Master in Public Health – School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, 2023).

Biological rhythms of insect vectors have been studied for better understanding their behavior and designing more efficient control strategies to reduce the spread of pathogens. *Culex quinquefasciatus* has vector competence for several pathogens of medical importance, such as the filaria that causes Bancroftian Filariasis and the *West Nile* arbovirus (WNV). The present study aims to evaluate the locomotor activity of *Cx. quinquefasciatus* in different physiological conditions, comparing males, virgin females, inseminated females, blood-fed females and inseminated and blood-fed females. In addition, we compared the locomotor activity of females inseminated by mating with males with that of females inseminated by intrathoracic inoculation of accessory gland extract from their conspecific males. Our results showed that the locomotor activity of males and females of *Cx. quinquefasciatus* is nocturnal, with a pronounced peak at the lights-off. We observed that both virgin and inseminated females, after blood feeding, showed reduced locomotor activity during scotophase compared to the other groups, especially inseminated and blood fed females. In contrast, inseminated and unfed females showed a significant increase in locomotor activity during scotophase compared to the other groups. When comparing the groups of non-injected females - virgin and inseminated - with the groups of injected females, we observed that the latter showed lower locomotor activity than the former. Among non-injected females, inseminated females showed greater locomotor activity than virgin ones, whereas, among injected groups, virgin females inoculated with accessory glands from conspecific males showed greater activity than inseminated females injected with saline solution. This study provides important information about the locomotor activity of this species, which can help in understanding the dynamics of pathogen transmission, direct new research, and help in the development of surveillance and control strategies.

Keywords: *Culex quinquefasciatus*. Locomotor activity. Circadian rhythm.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> . .....	13
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Culex quinquefasciatus</i> . .....	15
Figura 3. Aspectos morfológicos de adultos de <i>Culex quinquefasciatus</i> . .....	16
Figura 4. Esquema do funcionamento da regulação genética de duas das três alças principais do relógio circadiano. ....	22
Figura 5. Bacia contendo larvas L4 e pupas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> . .....	26
Figura 6. Detalhe do recipiente de vidro contendo a pupa de <i>Cx. quinquefasciatus</i> individualizada. ....	27
Figura 7. Fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> realizando repasto sanguíneo em codorna anestesiada. ....	28
Figura 8. Par de glândula acessória de macho de <i>Culex quinquefasciatus</i> . ....	29
Figura 9. Local da injeção intratorácica em mosquitos, com a Fenda Anepisternal (FA) destacada em vermelho. ....	30
Figura 10. Injeção intratorácica de extrato de AG em fêmea de <i>Culex quinquefasciatus</i> . ..	30
Figura 11. Fêmea de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ingurgitada individualizada em tubo de vidro utilizado para atividade locomotora. ....	31
Figura 12. Monitor de atividade contendo 32 tubos com mosquitos individualizados. ....	32
Figura 13. Espermatecas inseminadas de fêmea de <i>Culex quinquefasciatus</i> . ....	33
Figura 14. Atividade locomotora de <i>Culex quinquefasciatus</i> . (Machos, fêmeas virgens, fêmeas inseminadas, fêmeas virgens alimentadas com sangue e fêmeas inseminadas alimentadas com sangue). ....	36-38
Figura 15. Atividade locomotora de <i>Culex quinquefasciatus</i> . (Fêmeas virgens, fêmeas inseminadas, fêmeas inseminadas e injetadas com solução salina e fêmeas virgens injetadas com glândula acessória de macho coespecífico). ....	42-43

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1. Análises estatísticas da atividade locomotora de fêmeas em diferentes condições fisiológicas e machos de *Culex quinquefasciatus*, em relação aos períodos de claro e escuro, fase clara, fase escura e picos de acender e apagar das luzes. ....39-42**

**Tabela 2. Análises estatísticas da atividade locomotora de fêmeas em diferentes condições fisiológicas, em relação aos períodos de claro e escuro, fase clara, fase escura e picos de acender e apagar das luzes. ....44-45**

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1. Estudos científicos abordando a competência vetorial de *Culex quinquefasciatus*. ....18-20**

## LISTA DE SIGLAS

WNV – *West Nile Virus*

SLEV – Vírus da Encefalite de Saint Louis

EEEV – Vírus da Encefalite Equina do Leste

WEEV – Vírus da Encefalite Equina do Oeste

VEEV – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

ZIKV – Vírus Zika

RVFV – *Rift Valley Fever Virus*

CHITV – *Chitoor Virus*

USUV – *Usutu virus*

CxFV – *Culex Flavivirus*

MAYV – *Mayaro Virus*

DTMUV – *Duck Tembusu Virus*

JEV – *Japanese Encephalitis Virus*

OROV – *Oropouche Virus*

EIP – Período de incubação extrínseco

MIB – Barreira de infecção do intestina médio

MEB – Barreira de escape do intestino médio

SGIBs – Barreira de infecção da glândula salivar

SGEBs – Barreira de escape da glândula salivar

Clk – gene *Clock*

cyc – gene *cycle*

per – gene *period*

tim – gene *timeless*

CLK – proteína CLOCK

CYC – proteína CYCLE

PER – proteína PERIOD

TIM – proteína TIMELESS

vri – gene *vrille*

VRI – proteína VRILLE

*Pdp1* – *PAR domain protein 1*

*cwo* – gene *clockwork Orange*

CWO – proteína CLOCKWORK ORANGE

**LD 12:12 – Light/Dark 12 horas:12 horas**

**DD – Dark/Dark**

**AG – glândula acessória**

**Mw – Média de Williams**

**ID – Identificação**

**df – desvio padrão**

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

**°C – Graus Celsius**

**L – Litro**

**μL - Microlitro**

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
1.1. Origem, distribuição nas Américas e Morfologia .....	14
1.2. Importância Médica de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	17
1.3. Ritmos Circadianos e Atividade de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	20
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
2.1. Geral .....	25
2.2. Específicos.....	25
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>26</b>
3.1. Obtenção e manutenção de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	26
3.2. Injeção intratorácica .....	28
3.3. Análise da atividade locomotora .....	31
<b>4. Análise dos dados</b> .....	<b>34</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>36</b>
<b>6. Discussão</b> .....	<b>46</b>
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>52</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>53</b>

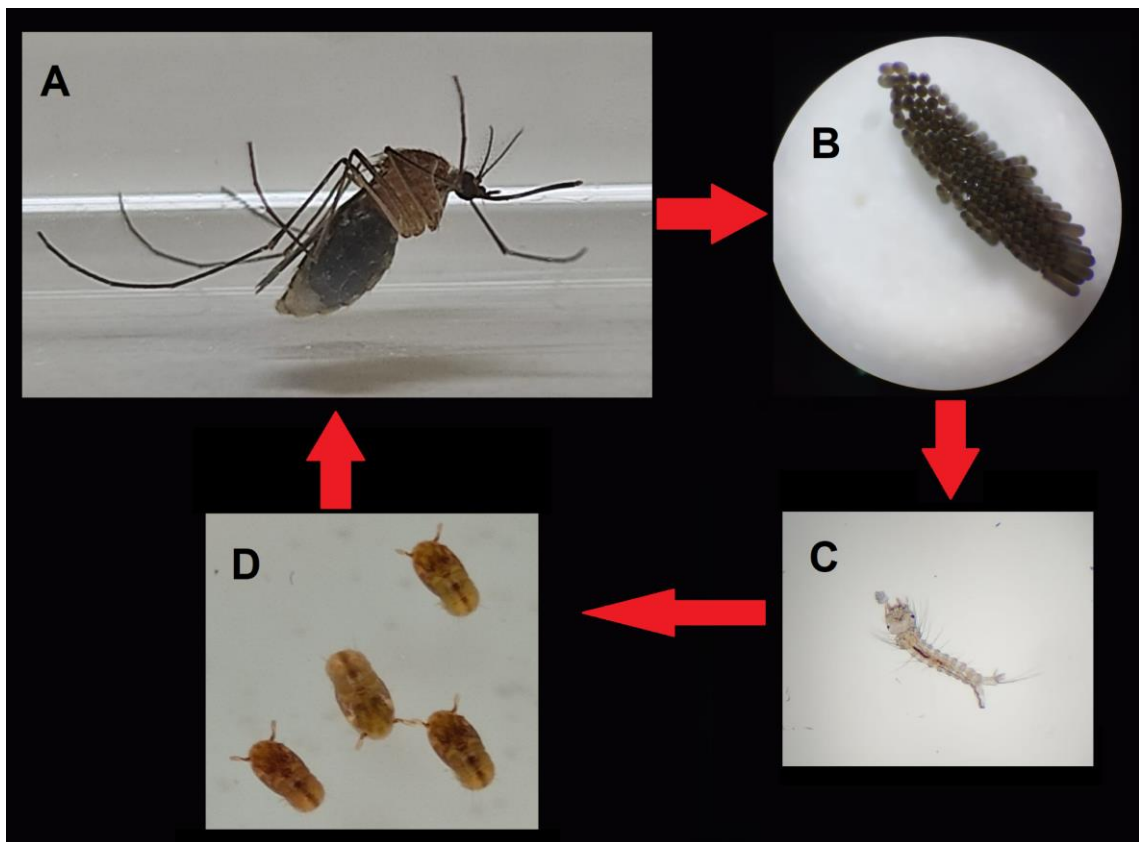
## 1. Introdução

A partir do momento em que o ser humano foi modificando o meio ambiente para uso próprio, formando novos ambientes, agora antropizados, observamos a ocorrência de desequilíbrios nessas áreas, muitas vezes forçando o deslocamento da fauna local. Porém, por vezes, ocorre que alguns animais, vertebrados e invertebrados, acabam se adaptando a esses novos ambientes e alguns não apenas se adaptam como também encontram condições mais favoráveis para a sua proliferação. É possível observar, por exemplo, em grandes centros urbanos, a existência abundante de ratos e diversas espécies de insetos que conseguiram obter, em profusão, abrigos e fontes de alimento nesses ambientes proporcionados pelo ser humano.

De acordo com a Instrução Normativa do Ibama Nº 141, de 19 de dezembro de 2006, é considerada fauna sinantrópica as espécies de animais silvestres, nativas ou exóticas, que utilizam recursos de áreas antrópicas de forma transitória ou permanente, como área de vida (Artigo 2, item IV). A fauna sinantrópica nociva é composta por espécies que interagem de forma negativa com a população humana, causando impactos econômicos ou ambientais significativos, ou mesmo representando riscos à saúde pública (Artigo 2, item V) (BRASIL, 2006). Entre esses animais considerados como parte da fauna sinantrópica nociva estão os mosquitos.

Mosquitos são insetos da ordem Diptera, subordem Nematocera, e representam a família Culicidae. Assim como todos os demais membros dessa família, apresentam desenvolvimento holometabólico, compreendendo os estágios de ovo (Figura 1B), larva (Figura 1C), com quatro estádios, pupa (Figura 1D) e adulto (Figura 1A). Os adultos apresentam peculiar importância epidemiológica, pois a maioria das fêmeas alimenta-se de sangue, ou seja, é hematófaga, podendo, dessa forma, infectar-se com algum agente etiológico e transmiti-lo para uma pessoa suscetível. É exatamente por meio desse mecanismo que se dá, por exemplo, a transmissão de arbovírus, protozoários e filárias de um indivíduo para o outro (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

**Figura 1. Ciclo de vida da espécie *Culex quinquefasciatus*. (A) Fêmea adulta ingurgitada; (B) Ovos em jangada; (C) Larva; (D) pupas.**



Fonte: MENZATO, 2023.

*Culex quinquefasciatus* é um mosquito com ampla distribuição geográfica, sendo predominantemente urbano e antropofílico, embora também encontrado em meios rurais e silvestres (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Grandes quantidades desse mosquito costumam estar associadas às áreas urbanas com deficiência de saneamento, onde há abundância na disponibilidade de criadouros, caracterizados por coleções de águas poluídas, ricas em matéria orgânica (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Machos e fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* se alimentam da seiva das plantas. As fêmeas, frequentemente já inseminadas, alimentam-se de sangue para a maturação dos ovos. Essa alimentação sanguínea pode ocorrer em seres humanos, mas não de forma exclusiva, já que também pode ocorrer em outros animais vertebrados, como aves, aumentando, assim, o risco da transmissão de patógenos causadores de zoonoses ao homem (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BHATTACHARYA; BASU, 2016).

Outro fator que pode aumentar a possibilidade de transmissão de patógenos pelo *Cx. quinquefasciatus* é a presença de discordância gonotrófica, ou seja, a ocorrência de mais de um

repasto sanguíneo em um único ciclo de maturação e postura de ovos, fazendo com que o mosquito tenha maior contato com o hospedeiro vertebrado (SANTANA et al., 2020; BRANDA et al., 2021). Em cada ciclo gonotrófico, fêmeas dessa espécie depositam, aproximadamente, 155 ovos, que podem variar de acordo com a idade do mosquito, fonte e volume de sangue ingerido (BHATTACHARYA; BASU, 2016). Uma fêmea pode ter de 2 a 8 ciclos gonotróficos durante sua vida, dependendo das condições ambientais, sendo que as estações mais quentes e chuvosas tendem a favorecer altas densidades populacionais desse mosquito (BHATTACHARYA; BASU, 2016).

*Culex quinquefasciatus* é considerado um fator de incômodo para a população, devido à sua grande abundância nas cidades e picadas, geralmente, ocorrendo à noite (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Além disso, é considerado vetor de diferentes patógenos, como os vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), Encefalite Equina do Leste (EEEV), Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e *West Nile* (WNV), bem como da filária *Wuchereria bancrofti*; (MORAIS et al., 2010; SAMY et al., 2016).

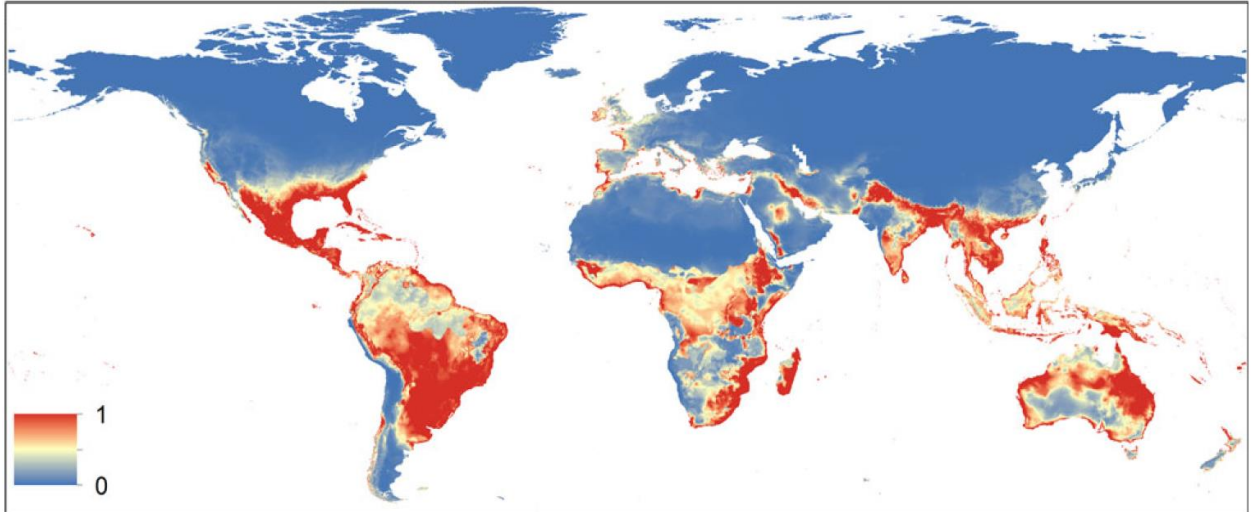
### **1.1. Origem, distribuição nas Américas e Morfologia**

*Culex quinquefasciatus* foi descrito pela primeira vez por Thomas Say, em 1823, e faz parte do complexo *Culex pipiens*, cujas espécies crípticas são amplamente distribuídas pelo mundo, nas faixas equatorial e tropical (MORAIS et al., 2010; BHATTACHARYA; BASU, 2016). Nas Américas, é encontrado da região sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). De acordo com Bhattacharya e Basu (2016), esse mosquito se originou no sudeste da Ásia, mas, posteriormente, acabou por colonizar o Novo Mundo por meio de navios que traziam pessoas da África para serem escravizadas. antes de 1800.

A presença de *Cx. quinquefasciatus* ocorre em regiões de clima equatorial, tropical e subtropical (MORAIS et al., 2010). Por meio de modelagem, utilizando algoritmos de máxima entropia, Alaniz e colaboradores (2019) estimaram a presença do *Culex. quinquefasciatus* no mundo. Na Figura 2, pode-se observar que a distribuição dessa espécie é bastante ampla, estando presente em todos os continentes ocorrendo por todo o globo, na faixa equatorial e tropical.



**Figura 2. Distribuição geográfica de *Culex quinquefasciatus*. As cores representam o nível de adequação ambiental para a presença de *Culex quinquefasciatus*, sendo 0 (azul) a menor adequação e 1 (vermelho) a maior adequação.**

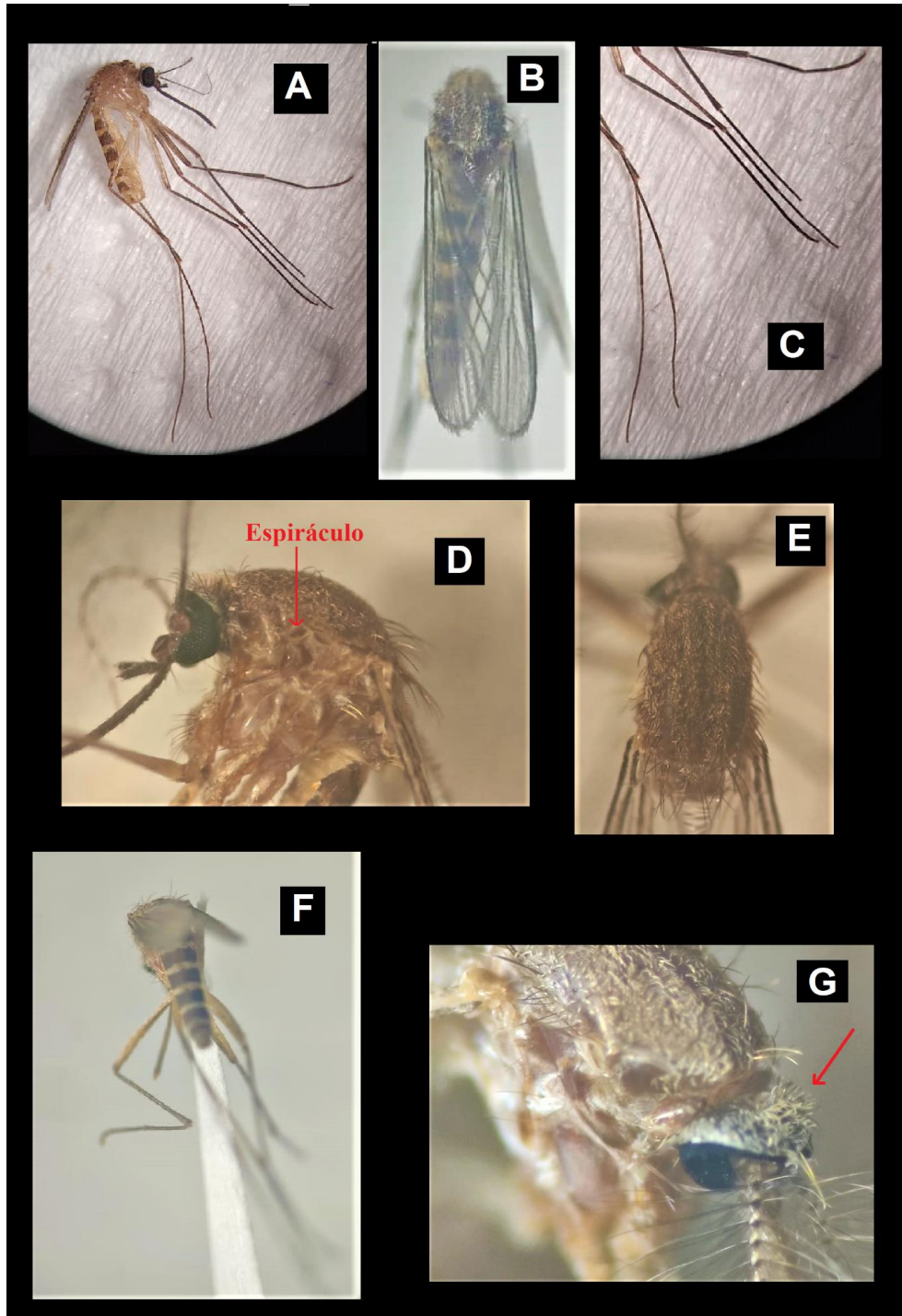


Fonte: ALANIZ et al., 2019.

Por vezes, *Cx. quinquefasciatus* coexiste com outras espécies do mesmo complexo, como, por exemplo, *Culex pipiens*. A existência de híbridos entre *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens* foi relatado nas regiões de La Plata – Argentina (latitude 34°-35° sul) (MORAIS et al., 2010) e Carolina do Sul – Estados Unidos (latitude 34° norte) (FONSECA et al., 2004). No Brasil, do complexo *Culex pipiens*, apenas a espécie *Culex quinquefasciatus* já foi detectada, sendo essa distribuída por todo o território (MORAIS et al., 2010; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os adultos de *Culex quinquefasciatus* (Figura 3A) são caracterizados por possuírem asas desprovidas de conjuntos de escamas claras de forma evidente (Figura 3B), tarsos sem marcação clara ou pouco evidente (Figura 3C), ausência de escamas pós-espíraculares (Figura 3D), escudo sem desenho (Figura 3E), tergitos escuros com manchas ou faixas claras na base (Figura 3F) e occípio com escamas eretas e forquilhadas, claras e escuras (Figura 3G). (FORATTINI, 2002). De acordo com Moraes et al. (2010) e Samy et al. (2016), não é possível diferenciar *Cx. quinquefasciatus* das outras espécies do complexo *Culex pipiens* utilizando apenas a morfologia, visto que, morfologicamente, eles são muito semelhantes, porém se diferem na genética, ecologia e comportamento.

**Figura 3. Aspectos morfológicos de adultos de *Culex quinquefasciatus*.** (A) aspecto geral; (B) asas sem escamas claras ou pouco evidentes; (C) tarsos sem marcações claras ou pouco evidentes; (D) região pós-espíracular com ausência de escamas; (E) escudo sem desenho; (F) tergitos com machas ou faixas claras na base; (G) occípito com escamas eretas e forquilhadas, claras e escuras.



Fonte: MENZATO e PAULA, 2023. Mosquitos da coleção do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública/ Culicidae.

## 1.2. Importância Médica de *Culex quinquefasciatus*

Conforme apontado anteriormente, *Cx. quinquefasciatus* é considerado um fator de incômodo, mas também vetor de agentes etiológicos, como arbovírus, e vermes. A competência vetorial é definida como a capacidade de um artrópode hematófago se infectar com um determinado patógeno e conseguir transmiti-lo com sucesso para um hospedeiro susceptível após um período de incubação extrínseco (EIP - tempo total transcorrido a partir da infecção do vetor, multiplicação do patógeno nos tecidos e chegada da forma infectante nas glândulas salivares ou outro local para a transmissão) (REIS et al., 2021). No caso dos mosquitos, para que o patógeno chegue às glândulas salivares e seja inoculado em um novo hospedeiro, ele deve ser capaz de, além de superar o sistema imunológico inato do vetor, transpor as barreiras mecânicas do vetor, que consistem na barreira de infecção de intestino médio (MIB), barreira de escape do intestino médio (MEB), barreiras de infecção da glândula salivar (SGIBs) e barreiras de escape da glândula salivar (SGEBs) (REIS et al., 2021). Por ser um mosquito predominantemente urbano, com elevada antropofilia, e também circular em ambientes rurais e silvestres, tendo como fonte de alimentação outros animais vertebrados, *Cx. quinquefasciatus* torna-se uma possível ponte entre potenciais reservatórios zoonóticos, facilitando a emergência e reemergência de doenças (BHATTACHARYA; BASU, 2016).

É conhecida a participação do *Cx. quinquefasciatus* no ciclo de algumas enzootias. Podemos citar para os arbovírus, por exemplo, o Myxoma vírus; para protozoários, o *Plasmodium relictum* e *Plasmodium cathemerium*; e para vermes nematóides, as espécies *Saurofilaria sp.* e *Oswaldofilaria sp.* (NEW ZEALAND BIOSECURE ENTOMOLOGY LABORATORY, 2008). Essa enorme variedade de organismos, mesmo que em um primeiro momento não represente riscos à população humana, mostra como *Cx. quinquefasciatus*, que é amplamente distribuído pelo globo e que se alimenta do sangue humano e de outros vertebrados, é uma espécie de mosquito de grande importância para a Saúde Pública.

O encontro de alguns agentes etiológicos em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* na natureza não significa necessariamente que essa espécie seja vetor desses patógenos (BHATTACHARYA; BASU, 2016). Por exemplo, recentemente surgiu a possibilidade do vírus Zika (ZIKV) ser transmitido pelo *Cx. quinquefasciatus* no Brasil, tendo havido, inclusive, o encontro de espécimes naturalmente infectados por esse arbovírus em Recife, Pernambuco (GUEDES et al., 2017). Guedes et al. (2017) também demonstraram que fêmeas dessa espécie de Recife, em condições de laboratório, eram competentes para transmitir o ZIKV e poderiam estar participando da disseminação desse vírus na região. Entretanto, a grande maioria dos

estudos realizados em laboratório demonstrou que essa espécie não tem competência vetorial para o ZIKV (BRADLEY et al., 2018; LIU et al., 2017; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2019; DODSON; RASGON, 2017; FERNANDES et al., 2020). Essa diferença nos resultados pode estar relacionada com as características específicas dos mosquitos da região e/ou da cepa do vírus utilizada.

A variação na competência vetorial é descrita para diversos patógenos, inclusive para alguns em que *Cx. quinquefasciatus* já é considerado um vetor. Fall et al. (2014) demonstraram que de três linhagens de *West Nile Virus* (WNV), os mosquitos *Cx. quinquefasciatus* de uma região de Senegal foram competentes para transmitir apenas uma. Outro exemplo semelhante foi o trabalho feito por Ndiaye et al. (2016) em que mosquitos *Cx. quinquefasciatus* do Senegal foram testados para três linhagens do *Rift Valley Fever Virus* (RVFV), dos quais foi demonstrada a competência vetorial apenas para uma. Recentemente, Reis e colaboradores (2023), verificaram em condições de laboratório, que mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus*, de origem da região Amazônica, são competentes para a transmissão do WNV, mostrando a importância da vigilância entomológica. O Quadro 1 mostra diversos estudos nos quais é demonstrada a competência vetorial de *Cx. quinquefasciatus* para diferentes patógenos.

**Quadro 1. Estudos científicos abordando a competência vetorial de *Culex quinquefasciatus*.**

Patógeno	Competência	Local/ origem da população	Fonte
<i>Dirofilaria immitis</i>	Sim*	Brasil/ de campo	AHID; VASCONSELOS; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2000
<i>Dirofilaria immitis</i>	Sim	Brasil/ laboratório	CARVALHO et al., 2008
<i>Chittoor Virus</i> (CHITV)	Sim	Índia/ laboratório	SUDEEP et al., 2018
<i>Setaria digitata</i>	Sim	China/ laboratório	TUNGA et al., 2004

<i>Usutu Virus</i> (USUV)	Sim	Estados Unidos/ laboratório	COOK et al., 2018
<i>Rift Valley Fever Virus</i> (RVFV)	Sim**	Quênia/ selvagem; França/ laboratório	TURELL et al., 2007; ATYAME et al., 2019
<i>West Nile Virus</i> (WNV)	Sim	Estados Unidos/ laboratório; França/ laboratório	ROMO et al., 2018; ATYAME et al., 2019
<i>West Nile Virus</i> (WNV)	Sim***	Equador/ de campo	EASTWOOD et al., 2011
<i>West Nile Virus</i> (WNV)	Sim****	Estados Unidos/ de campo	LAPORTE et al., 2009
<i>West Nile Virus</i> (WNV) + <i>Culex flavivirus</i> (CxFV) <i>Izabal</i>	Sim*****	Estados Unidos/ laboratório	KENT; CRABTREE; MILLER, 2010
<i>West Nile Virus</i> (WNV)	Sim	Brasil/ de campo	REIS et al., 2023
<i>West Nile Virus</i> (WNV)	Sim****	Índia/ laboratório	SUDEEP et al., 2015
<i>Mayaro Virus</i> (MAYV)	Não	Brasil/ de campo	PEREIRA et al., 2020
<i>Duck Tembusu Virus</i> (DTMUV)	Não	Tailândia/ laboratório	SANISURIWONG et al., 2021

<i>Chikungunya Virus</i> (CHIKV)	Sim	Quênia/ de campo	LUTOMIA et al., 2021
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Sim****	Haiti/ laboratório	JANOUSEK; LOWRIE. 1989
<i>Japanese Encephalitis Virus</i> (JEV)	Sim	Estados Unidos/ de campo	HUANG et al., 2015
<i>Oropouche Virus</i> (OROV)	Sim**	Estados Unidos/ laboratório	MCGREGOR; CONNELLY; KENNY, 2021
<i>Oropouche Virus</i> (OROV)	Não	Brasil/ laboratório	MENDONÇA et al., 2021

\*Vetor secundário / \*\*Vetor ineficiente / \*\*\*Vetor menos eficiente do que as linhagens norte-americanas / \*\*\*\*Vetor muito competente / \*\*\*\*\*CxFV não interferiu na competência

O mosquito ser competente para transmitir um patógeno não significa que ele é um vetor capaz. Vale ressaltar que a capacidade vetorial pode variar de acordo com uma série de fatores, como densidade da população do vetor, longevidade, discordância gonotrófica, fatores ambientais, entre outros. Isso faz com que a relevância do vetor para a disseminação de diferentes patógenos varie em diferentes localidades, mesmo sendo uma espécie comprovadamente competente (KRAMER; CIOTA, 2015; MCMILLAN et al., 2018).

### 1.3. Ritmos Circadianos e Atividade de *Cx. quinquefasciatus*

Sabemos que praticamente todos os seres vivos têm seus ritmos biológicos ajustados aos tempos de translação e rotação do planeta, movimentos planetários responsáveis pela ocorrência da periodicidade das estações em cerca de um ano. Esses ciclos ambientais envolvem elementos como luz, temperatura e umidade, capazes de sincronizar os ritmos biológicos, sendo assim chamados de agentes sincronizadores. Na Cronobiologia, esses elementos foram denominados como *Zeitgeber* que, em alemão, significa fornecedor de tempo, sendo responsáveis pela sincronia dos ritmos de atividade dos seres vivos com os ciclos do ambiente (MENNA-BARRETO; MARQUES, 2002). Isso quer dizer que animais de hábitos diurnos

tendem a acompanhar a disponibilidade de luz mantendo-se mais ativos durante o dia e em repouso durante a noite. Já foram observados ciclos temporais de diferentes durações como, por exemplo, cerca-anoais (período aproximado de um ano), ultradianos (menor de 24 horas), circadianos (aproximadamente 24 horas) e infradianos (maior de 24 horas) (JANSEN et al., 2007). Os ritmos circadianos englobam padrões diários que, para mosquitos, incluem atividades de voo, cópula, alimentação, dentre outros (CLEMENTS, 1999).

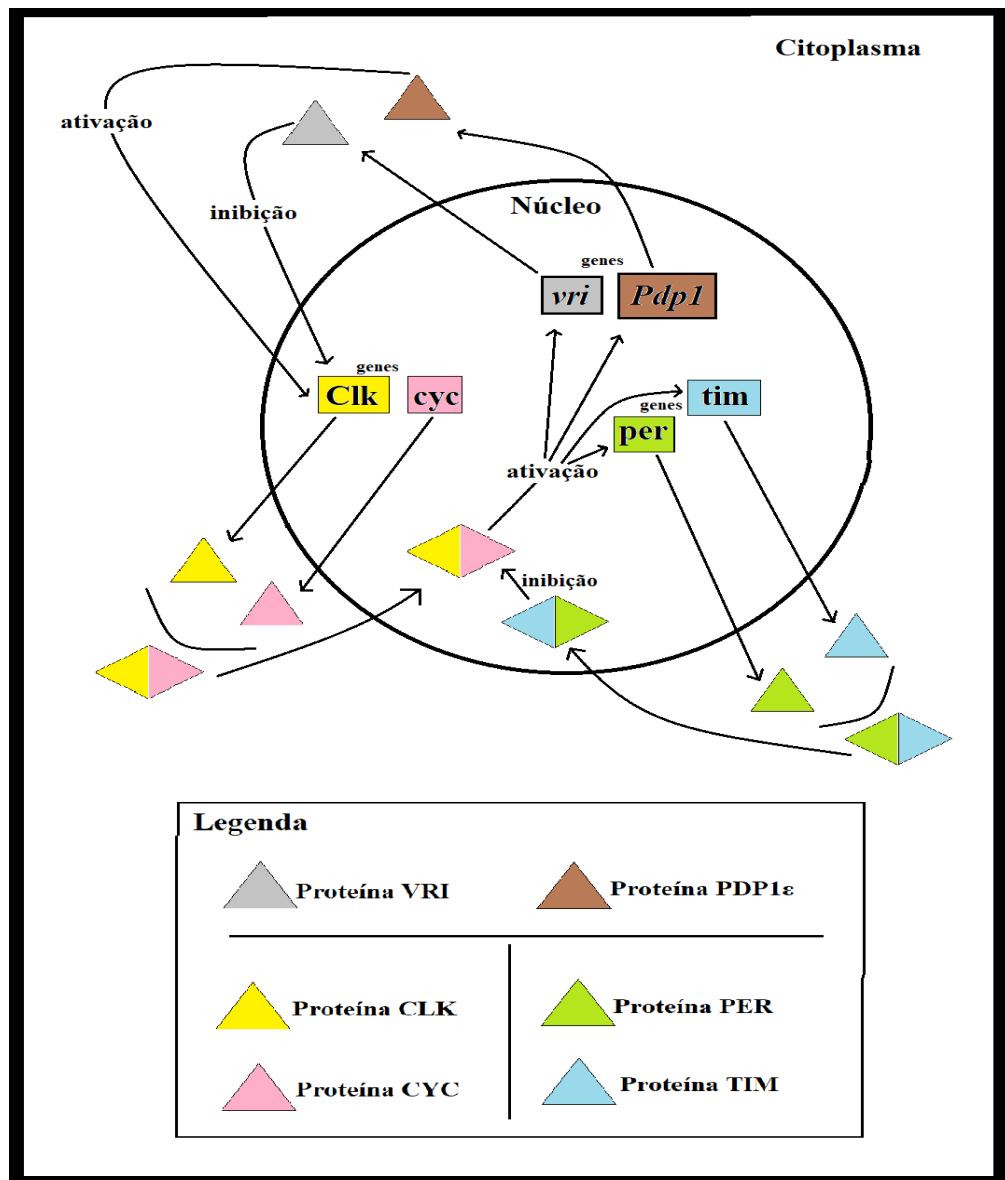
Inicialmente, as primeiras interpretações sobre os ritmos circadianos eram de que representavam respostas passivas frente às oscilações ambientais (ROTENBERG; MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997). Entretanto, em 1729, o astrônomo francês Jean-Jacques d'Ortous de Mairan realizou o primeiro experimento que indicava que os ritmos diários tinham controle endógeno. De Mairan registrou a movimentação das folhas da planta *Mimosa pudica* que, em condições normais, se abriam durante o dia e se fechavam durante a noite. Em seguida, o astrônomo privou a planta de luz e observou que o padrão de movimentação se manteve, demonstrando um fator endógeno de marcação de tempo (JANSEN et al., 2007). Inúmeros outros experimentos foram realizados por outros pesquisadores, utilizando a mesma planta ou outros seres vivos, em diferentes condições, tendo sempre como resultado a indicação de um controle endógeno dos ritmos circadianos (ROTENBERG; MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997).

Mais tarde, com o avanço do estudo da genética, começou a ser desvendada parte dos mecanismos do controle interno da marcação de tempo, a partir de experimentos com a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, que apresentava alterações no gene *period* (Per), impactando a periodicidade de sua atividade locomotora (KONOPKA; BENZER, 1971). A partir de então, começaram a ser descobertos novos genes e os mecanismos de interação entre eles, estabelecendo assim o modelo de *feedback* negativo (WULUND; REDDY, 2015).

Até o momento, já foram identificadas três alças de regulação gênica dos ritmos circadianos, sendo uma central e duas interligadas (HARDIN, 2011). Na alça principal (Figura 4), temos a participação dos genes que atuam em pares, como *Clock-cycle* (Clk/cyc) e *period-timeless* (per/tim). Os genes *Clock* e *cycle* são transcritos e traduzidos em suas respectivas proteínas específicas (CLK/CYC), que promovem a transcrição dos genes *per* e *tim* no núcleo da célula. Os RNAs de *per* e *tim* são traduzidos nas proteínas PER e TIM, que se acumulam no citoplasma durante a fase escura. O aumento das concentrações de PER e TIM no citoplasma permite sua dimerização (PER/TIM) que migra para o núcleo e interage com o heterodímero CLK/CYC, reprimindo-o, num mecanismo de autorregulação negativa. Na segunda alça, também temos a participação do heterodímero CLOCK/CYCLE (CLK/CYC), bem como dos

genes *vri* (*vri*), que gera a proteína VRI, que atua como repressor da transcrição de *Clk* e *PAR domain protein 1* (*Pdp1*), que gera a proteína PDP1 $\epsilon$ , que atua como ativador da transcrição de *Clk*. A terceira alça, mais recentemente descrita, tem a participação do gene *clockwork orange* (*cwo*), que gera a proteína CWO (HARDIN. 2011; RIVAS, 2012; RIVAS et al., 2018). Recentemente, Rivas et al. (2021) realizaram um estudo em *Drosophila* e observaram que a proteína CWO participa da repressão da expressão de *PER* e *TIM*, ao inibir a expressão de *CLK* e *CYC*, mas também participa na promoção da transcrição de *CLK* e *CYC*. No entanto, os mecanismos ainda carecem de mais estudos para melhor elucidação (RIVAS et al., 2021).

**Figura 4. Esquema do funcionamento da regulação genética de duas das três alças principais do relógio circadiano.**





Um nome importante no estudo de ritmos circadianos é Colin Pittendrigh, que publicou inúmeros estudos acerca do funcionamento dos relógios biológicos, de moscas do gênero *Drosophila* (PITTENDRIGH, 1967; PITTENDRIGH; TAKAMURA, 1987; PITTENDRIGH; KYNER; TAKAMURA, 1991). Seus resultados foram cruciais para o conhecimento atual das propriedades dos relógios circadianos.

É bem fundamentado que os relógios circadianos apresentam 3 propriedades principais. A primeira é sua capacidade de sincronizar com o ambiente externo, demonstrando periodicidade de 24 horas. Os principais sincronizadores dos relógios circadianos são a luz e a temperatura. A segunda propriedade está relacionada com o caráter endógeno de seu funcionamento, o que significa que, mesmo em condições constantes de luz e temperatura, o relógio circadiano mantém seu funcionamento, com uma periodicidade aproximada de 24 horas (representada pela letra grega *tau*). Esse período endógeno dos relógios circadianos, expresso em livre-curso, de modo geral, possui uma compensação de temperatura, que é a terceira propriedade, na qual a variação de temperatura, dentro de um intervalo adequado ao organismo, é compensada fisiologicamente (PITTENDRIGH, 1967; PITTENDRIGH; TAKAMURA, 1987; PITTENDRIGH; KYNER; TAKAMURA, 1991).

Além de sua importância como vetores de diversos agentes etiológicos, os mosquitos são insetos de fácil manipulação e manutenção em laboratório. Com isso, muitos têm seus ritmos biológicos estudados em condições de campo e de laboratório (CLEMENTS, 1999). Assim como outros organismos, geralmente restringem suas atividades a determinados momentos do ciclo diário, podendo ser considerados diurnos, noturnos ou crepusculares (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; CLEMENTS, 1999). As atividades diárias de *Cx. quinquefasciatus* ocorrem durante à noite, sendo considerado, assim, um mosquito noturno (GENTILE et al., 2009).

Alguns estudos já demonstraram que mosquitos vetores infectados ou parasitados podem apresentar alterações nas atividades de voo, locomoção, alimentação, entre outras (HAMER et al., 2022). Newman e colaboradores (2016), por exemplo, verificaram um decréscimo da atividade de voo de *Cx. pipiens* infectado com *Culex flavivirus* (CxFV). O mesmo foi observado por Hamer et al. (2022) em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* parasitadas por *Plasmodium relictum*, embora tenha ocorrido um aumento de atividade nos primeiros 30 minutos após a transição do claro para o escuro (NEWMAN C M; ANDERSON T K; GOLDBERG T L., 2016; HAMER et al., 2022).

Para o mosquito *Aedes aegypti*, já foi demonstrado que a infecção pela bactéria *Wolbachia pipientis* causa um aumento da atividade (EVANS et al., 2009), ao passo que a

infecção pelo vírus Zika e o parasita *Brugia pahangi*, causaram uma diminuição (PADILHA et al., 2018; ROWLAND; LINDSAY, 1986).

Também para *Ae. aegypti*, já foi verificado que a inseminação e alimentação sanguínea podem afetar as atividades locomotora e de voo em condições de laboratório (JONES, 1981; LIMA-CAMARA et al., 2013; LIMA-CAMARA et al., 2014). Fêmeas de *Ae. aegypti* inseminadas, alimentadas e inseminadas/alimentadas, por exemplo, apresentam atividade locomotora menor do que fêmeas virgens e não alimentadas da mesma espécie (LIMA-CAMARA et al., 2014).

Já foi demonstrado que a glândula acessória dos machos contém substâncias que são naturalmente transferidas para as fêmeas durante a cópula e que alteram a fisiologia e o comportamento das fêmeas (GILLOTT, 2003). Alguns trabalhos evidenciaram o efeito da inseminação, tanto de forma natural quanto por injeção intratorácica de glândula acessória de macho, na atividade locomotora de fêmeas de diferentes espécies (JONES, 1981; JONES, 1982; JONES; GUBBINS, 1979). Para *Cx. quinquefasciatus*, as fêmeas virgens foram ativas durante o crepúsculo, durante o final da fase escura e ao amanhecer, sob condições de LD 12:12, enquanto as fêmeas inseminadas foram menos ativas durante o crepúsculo e ao amanhecer, além de terem sido mais ativas na primeira metade da fase escura (JONES; GUBBINS, 1979). Comportamento similar ao das fêmeas inseminadas foi apresentado pelas fêmeas injetadas com glândula acessória, demonstrando que a atividade locomotora de *Cx. quinquefasciatus* é alterada de acordo com o estado fisiológico da fêmea (JONES; GUBBINS, 1979).

Apesar de alguns estudos já terem sido realizados acerca dos ritmos diários de mosquitos vetores, especialmente de *Ae. aegypti*, pouco é sabido sobre o padrão de atividade locomotora de *Cx. quinquefasciatus*. Há uma grande lacuna de informação acerca do efeito da inseminação e da alimentação sanguínea na atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, apesar da importância dessa espécie para a Saúde Pública.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Geral**

Analisar a atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus* em condições de laboratório.

### **2.2. Específicos**

- Avaliar o padrão de atividade locomotora de machos de *Cx. quinquefasciatus*;
  
- Avaliar o padrão de atividade locomotora de fêmeas virgens, inseminadas, virgens e alimentadas com sangue, e inseminadas e alimentadas com sangue de *Cx. quinquefasciatus*;
  
- Comparar o padrão de atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* inseminadas com as injetadas intratoracicamente com glândula acessória de machos de *Cx. quinquefasciatus*.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Obtenção e manutenção de *Culex quinquefasciatus*

As larvas no estágio L3 de *Cx. quinquefasciatus* foram obtidas a partir de colônias mantidas no Laboratório de Parasitologia, do Instituto Butantan, em colaboração com o pesquisador Dr. Lincoln Suesdek. A colônia foi originada a partir de indivíduos coletados às margens do Rio Pinheiros, em São Paulo-SP, em 1995. As larvas foram mantidas em bacias plásticas, contendo 1 L de água e 0,5 g de ração para peixe Tetramin®. Foram mantidas cerca de 400 larvas em cada bacia, a fim de evitar competição entre elas (Figura 5). As pupas formadas foram individualizadas em pequenos recipientes de vidro contendo apenas água e lá mantidas até a emergência dos adultos, garantindo, dessa forma, machos e fêmeas virgens para os experimentos (Figura 6).

**Figura 5.** Bacia contendo larvas L4 e pupas de *Cx. quinquefasciatus*.



Fonte: MENZATO, 2023.

**Figura 6. Detalhe do recipiente de vidro contendo a pupa de *Cx. quinquefasciatus* individualizada.**



Fonte: MENZATO, 2023.

Todas as fêmeas e machos virgens foram mantidos em gaiolas entomológicas separadas e identificadas até o momento do experimento de atividade locomotora. Foram mantidas 6 gaiolas, sendo 2 contendo cerca de 120 machos virgens em cada e 4 contendo cerca de 80 fêmeas virgens em cada. Em todas as gaiolas, havia um algodão embebido com solução açucarada a 15% para alimentação dos adultos. Duas das gaiolas de fêmeas foram destinadas para a inseminação com machos.

Para experimentos com fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* inseminadas, cerca de 100 machos foram transferidos para uma gaiola com cerca de 80 fêmeas virgens e deixados para copular por 48 horas. Esse procedimento foi realizado em duas gaiolas de fêmeas virgens para atender aos grupos das fêmeas inseminadas e fêmeas inseminadas e alimentadas com sangue. Após o período das 48 horas de cópula, uma codorna anestesiada foi deixada em uma gaiola contendo fêmeas inseminadas e também uma outra codorna anestesiada foi deixada dentro de uma gaiola contendo fêmeas virgens (Figura 7). Esse procedimento da alimentação sanguínea foi feito em colaboração com o Dr. Fredy Galvis Ovallos, do laboratório LESP/Phlebotominae, sob o número de registro 026/2018 da Comissão de ética no uso de animais. É importante ressaltar que, para o sucesso da alimentação sanguínea nas codornas, as fêmeas de ambas as gaiolas foram previamente privadas da alimentação com a solução açucarada por 24 horas. O experimento de atividade locomotora foi realizado no mesmo dia da alimentação sanguínea, quando os mosquitos estavam com cerca de 4 a 5 dias de vida.

**Figura 7. Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* realizando repasto sanguíneo em codorna anestesiada.**



Fonte: OVALLOS, 2022.

### **3.2. Injeção Intratorácica**

Para os experimentos com fêmeas injetadas com glândulas acessórias de machos de *Cx. quinquefasciatus*, foram realizados alguns procedimentos específicos. Inicialmente, foram dissecadas glândulas acessórias (AG) de 25 machos de *Cx. quinquefasciatus* (Figura 8), segundo a técnica proposta por Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Após adormecidos em gelo, os machos foram colocados em uma lâmina contendo uma gota de solução salina a 0,9%, e esta levada à lupa. Com 2 estiletos entomológicos, um posicionado no tórax e o outro no final do abdome do macho, as AGs foram puxadas para a solução salina. Ao total, foram dissecados 25 pares de AG, que foram armazenados em 50  $\mu$ L de solução salina, na proporção de 1AG/ $\mu$ L.

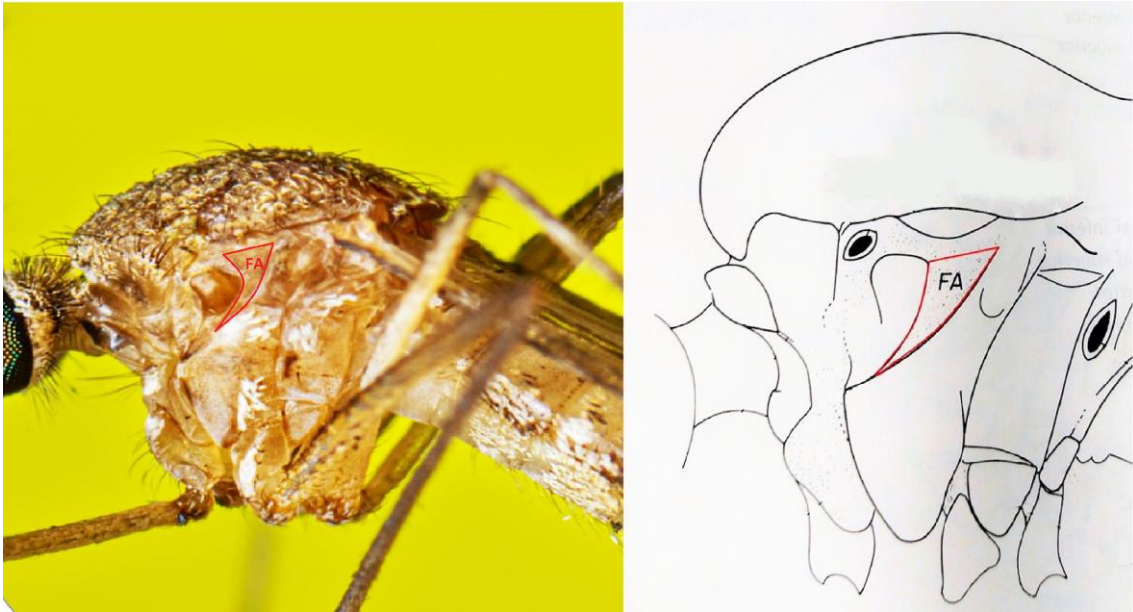
**Figura 8. Par de glândula acessória de macho de *Culex quinquefasciatus*.**



Fonte: MENZATO, 2023.

Para a injeção intratorácica (Figuras 9 e 10), cerca de 50 de fêmeas virgens de *Cx. quinquefasciatus*, com 4 a 5 dias de vida, foram injetadas intratoracicamente com 0,28  $\mu$ L de AG de machos de *Cx. quinquefasciatus* utilizando o Nanoject microinjector (Drummond Scientific). Antes das injeções, a solução contendo as AGs dos machos foram sonicadas por 1 minuto e centrifugadas por 1 hora a 13.000 g (LIMA-CAMARA et al., 2013). O segundo grupo foi composto por 50 fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* inseminadas naturalmente, conforme descrito no item anterior, enquanto que o terceiro grupo foi composto por 50 fêmeas virgens de *Cx. quinquefasciatus*. Houve ainda um quarto grupo, composto por fêmeas inseminadas naturalmente e injetadas intratoracicamente com solução salina 0,9%.

**Figura 9. Local da injeção intratorácica em mosquitos, com a Fenda Anepisternal (FA) destacada em vermelho.**



Fonte: Edição MENZATO, 2023 (Imagens retiradas de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e Forattini, 1996, p. 365).

**Figura 10. Injeção intratorácica de extrato de AG em fêmea de *Culex quinquefasciatus*.**



Fonte: MENZATO e LIMA-CAMARA, 2023.



### 3.3. Análise da atividade locomotora

O sistema de análise de atividade que foi utilizado é o *Drosophila* Activity Monitor (Trikinetics), que foi desenvolvido inicialmente para estudos com moscas do gênero *Drosophila*, mas que vem se mostrando muito eficiente também nos estudos de ritmos circadianos de mosquitos (LIMA-CAMARA et al., 2013; FEITOZA et al., 2020). Assim, os mosquitos foram colocados individualmente em tubos de vidro, com 10 mm de diâmetro e 7 cm de comprimento, tendo, em uma das extremidades, um pequeno algodão embebido com solução açucarada 15%. Após a colocação do mosquito, ambas as extremidades do tubo foram vedadas com “parafilme” (Figura 11).

**Figura 11. Fêmea de *Cx. quinquefasciatus* ingurgitada individualizada em tubo de vidro utilizado para atividade locomotora.**

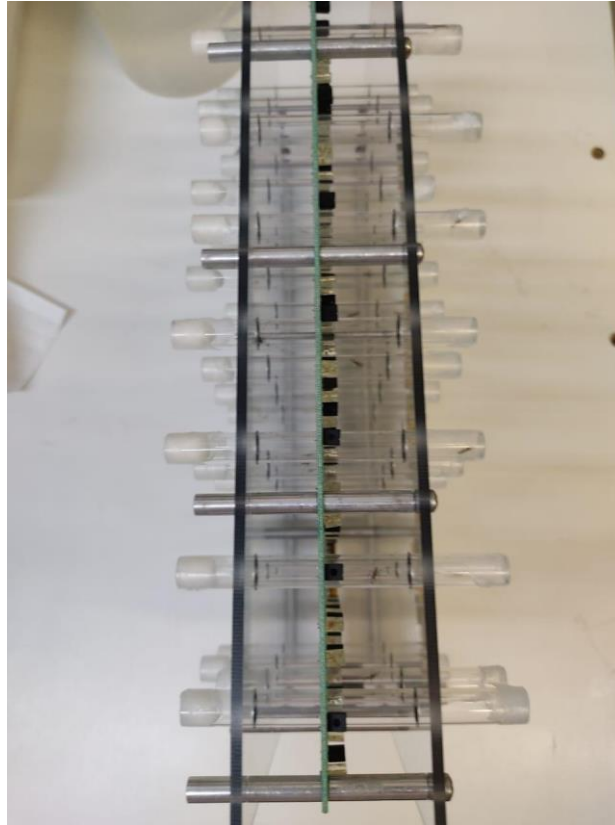


Fonte: MENZATO, 2023.

Os tubos foram organizados em monitores de atividade contendo 32 canais cada. Cada tubo contendo um mosquito ficou localizado em um canal (unidade de monitoramento individual) e sua movimentação foi detectada e registrada cada vez que o indivíduo atravessou o feixe infravermelho localizado no meio do tubo (Figura 12). Os monitores contendo 32 tubos cada foram colocados dentro de uma incubadora, com temperatura e fotoperíodo controlados, e conectados a um computador por cabos. Para quantificação da atividade, foi utilizado o programa “*DAMSystem data collection*”, que registrou, em intervalos regulares de 30 minutos, o número de vezes que cada mosquito interrompeu o feixe de luz infravermelho. Todos os monitores foram colocados dentro de uma incubadora BOD, sob fotoperíodo de 12 horas claro

e 12 horas escuro (LD 12:12) e temperatura de 25 °C. Em todos os monitores, o primeiro tubo foi deixado vazio para controle da leitura da atividade locomotora.

**Figura 12. Monitor de atividade contendo 32 tubos com mosquitos individualizados.**



Fonte: MENZATO, 2023.

A leitura da atividade locomotora foi realizada por um período de 6 dias. Ao final dos experimentos, além do registro dos espécimes vivos ou mortos, as fêmeas consideradas inseminadas tiveram suas espermatecas dissecadas para confirmação da cópula prévia.

**Figura 13. Espermatecas inseminadas de fêmea de *Culex quinquefasciatus*.**



Fonte: MENZATO, 2023.

#### 4. Análise dos dados

Para a montagem dos gráficos e para as análises estatísticas, utilizamos os dados obtidos da primeira leitura da fase clara do dia seguinte ao início do registro dos monitores, até a última leitura da fase escura do quarto dia após o início, totalizando 3 dias (ciclos de claro/escuro) completos. Os dados de atividade do quinto dia após o início da leitura também foram observados, mas para nos certificarmos de que os mosquitos analisados até o quarto dia estavam vivos e, conseqüentemente, sem interferência em seus movimentos.

Os dados foram organizados em planilhas do Excel e normalizados por transformação logarítmica ( $\text{Log } N+1$ ), para deixar a distribuição mais restrita, considerar os valores iguais a zero e evitar que os valores muito altos ou muito baixos mascarassem os resultados (PADILHA et al., 2018; FEITOZA et al., 2020). Para as análises estatísticas, também foram utilizados os valores de atividade locomotora transformados em  $\text{Log } (N+1)$ . Para a montagem dos gráficos de atividade locomotora, foi utilizada a Média geométrica de Williams (HADDOW, 1960), que fornece uma estimativa da média da atividade locomotora do grupo de mosquitos em cada intervalo de leitura, sendo, nesse caso, de 30 minutos.

Para compararmos a atividade locomotora de fêmeas em diferentes status fisiológicos e machos de *Cx. quinquefasciatus*, foram utilizados os seguintes índices: (1) Atividade diurna; (2) Pico do acender das luzes, que corresponde à primeira leitura da fase clara, quando as luzes se acendem; (3) Atividade noturna; e (4) Pico do apagar das luzes, que corresponde à primeira leitura da fase escura, quando as luzes se apagam.

Pelas medidas repetidas coletadas sequencialmente para cada mosquito analisado durante os três dias avaliados e por esses dados ferirem o pressuposto de independência de observações, optamos por utilizar modelos lineares generalizados mistos gaussianos (GLMM), que levam em consideração a não-independência dos dados. Essa mesma opção já foi utilizada em pesquisas anteriores com atividade locomotora de mosquitos vetores (FEITOZA et al., 2020; LIMA-CAMARA et al., 2022). Os efeitos aleatórios foram o ID do mosquito e a hora de coleta, enquanto os efeitos fixos incluídos foram o experimento, sendo o experimento 1 utilizado como base de comparação, e o status do mosquito, sendo machos utilizados como base de comparação na primeira parte e fêmeas virgens na segunda parte. Também foram incluídos os fotoperíodos, sendo a fase clara utilizada como base de comparação, uma vez que a espécie é noturna, e o efeito da interação entre status e fotoperíodo. Foi construído, analisado e validado um modelo com experimento, status, fotoperíodo e a interação entre status e fotoperíodo.

O resultado da análise de variância foi um teste F (com o método Satterwaite) para verificar a significância da inclusão dos efeitos fixos no modelo, sob a hipótese nula de que sua inclusão não melhora a explicabilidade da variância do modelo. A checagem de pressupostos se deu com o método visual, quando procuramos observar um padrão no gráfico de dispersão dos resíduos do modelo *versus* os valores ajustados. Todos os modelos foram testados utilizando o programa R e R studio.

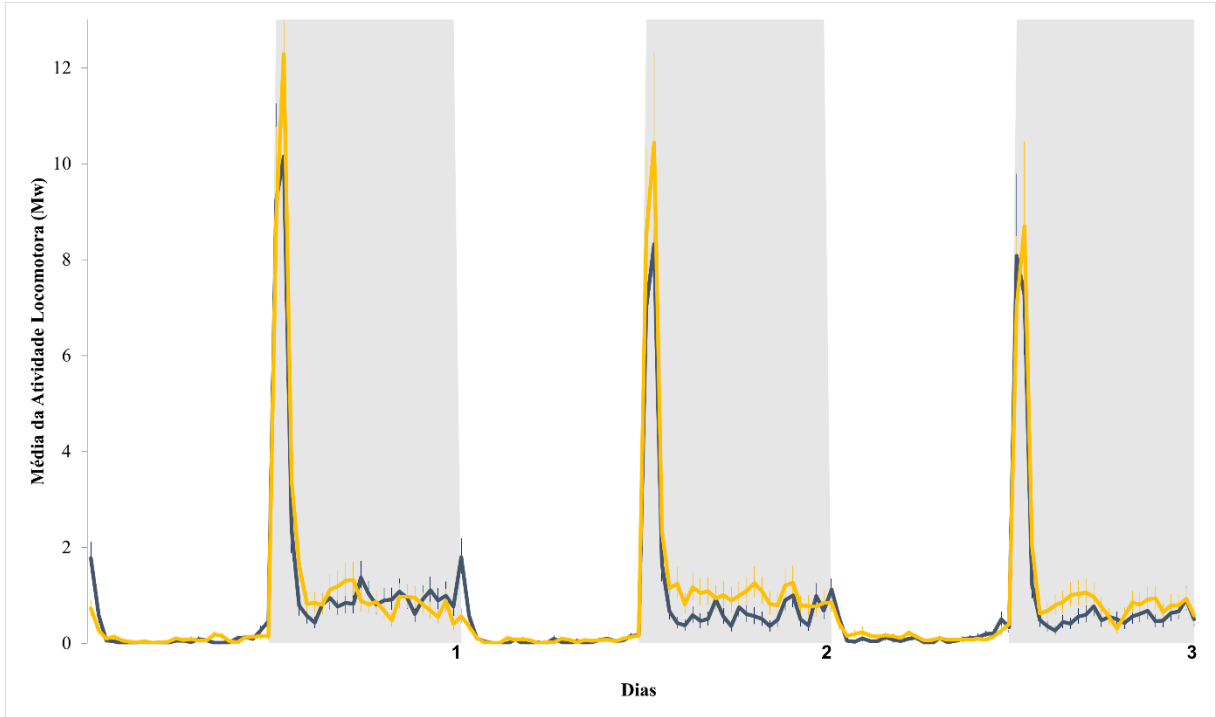
## 5. Resultados

A Figura 14A apresenta a atividade locomotora de machos (linha azul) e de fêmeas virgens (linha laranja) de *Cx. quinquefasciatus* enquanto a Figura 14B mostra a atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* em diferentes condições fisiológicas, a saber: virgens (linha laranja), inseminadas (linha azul), virgens e alimentadas com sangue (linha vermelha) e inseminadas e alimentadas com sangue (linha verde). A Figura 14 apresenta a atividade locomotora durante 3 dias de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD 12:12), a 25°C.

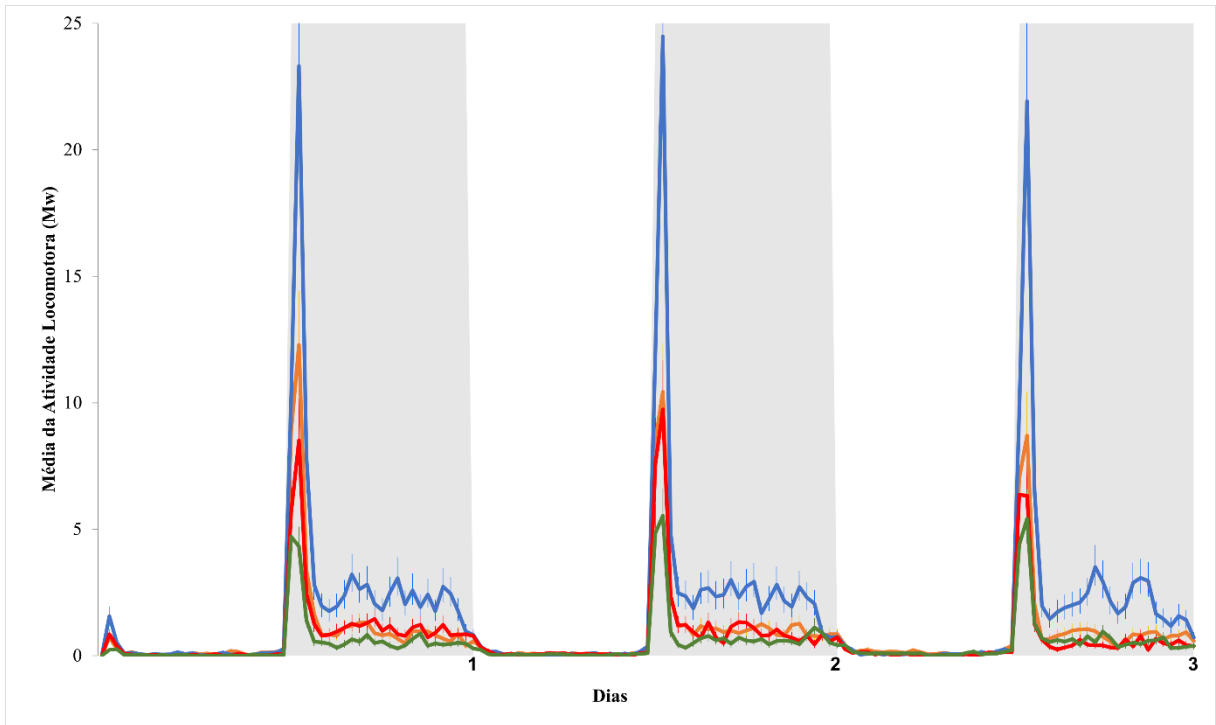
É possível perceber que os machos de *Cx. quinquefasciatus* apresentaram padrão noturno de atividade, com o pico de transição entre as fases clara e escura (*light-off*) bem pronunciado (Figura 14A). O mesmo padrão foi observado para todos os grupos de fêmeas testados (Figura 14B). Também podemos observar que, entre os grupos avaliados, as fêmeas inseminadas e não alimentadas com sangue (linha azul claro; n=99) apresentam uma maior atividade locomotora noturna em comparação aos demais grupos, inclusive em relação ao pico de *light-off*. Já as fêmeas inseminadas e alimentadas com sangue apresentaram os menores picos de *light-off* nos três dias testados (Linha verde; n=89) (Figura 14B e C).

**Figura 14. Atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus*. (A) Atividade locomotora de machos (linha azul escuro; n=96) e fêmeas virgens (linha laranja; n=103) expostos a 3 dias de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD 12:12), a 25 °C. (B) Atividade locomotora de fêmeas virgens (linha laranja; n=103), inseminadas (linha azul claro; n=99), virgens e alimentadas com sangue (linha vermelha; n=90) e inseminadas e alimentadas com sangue (linha verde; n=89) expostas a 3 dias de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD 12:12), a 25 °C. (C) Redução da escala para a visualização da atividade locomotora de fêmeas virgens (linha laranja; n=103), inseminadas (linha azul claro; n=99), virgens e alimentadas com sangue (linha vermelha; n=90) e inseminadas e alimentadas com sangue (linha verde; n=89) expostas a 3 dias de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD 12:12), a 25 °C. Valores dos picos acima da escala a=23,31; b=24,48; c=21,92.**

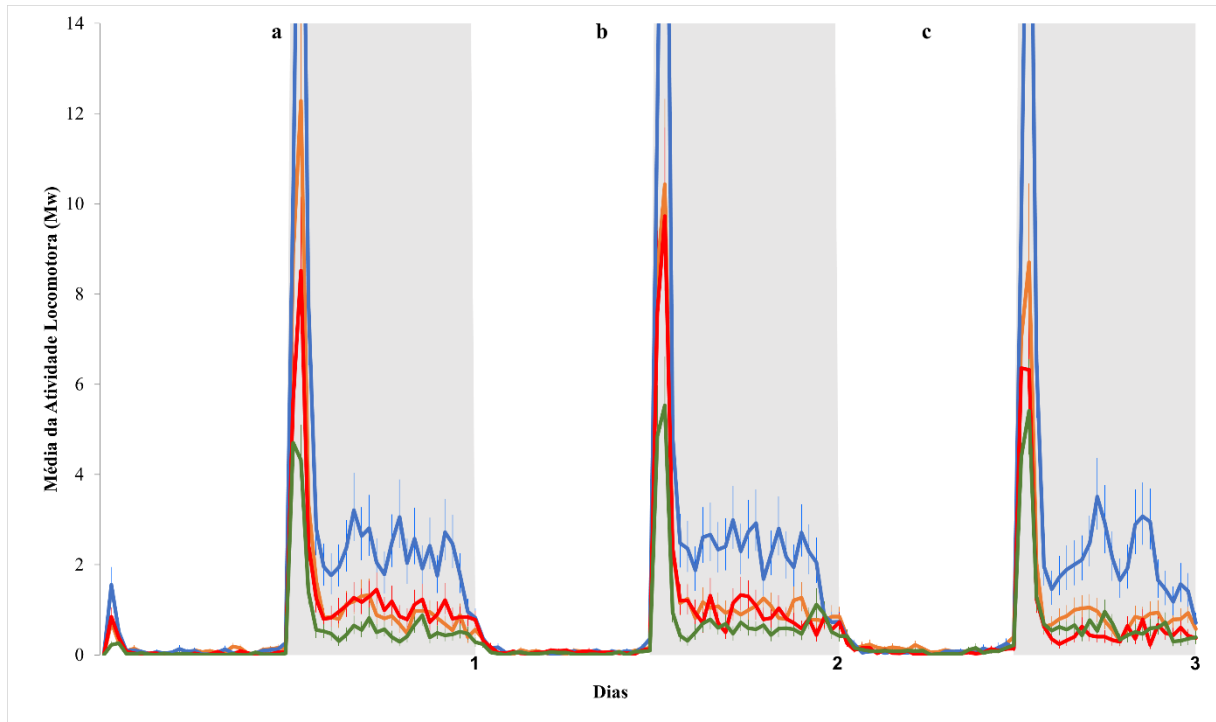
A



B



C



As análises estatísticas mostraram que todos os grupos de *Cx. quinquefasciatus* testados foram significativamente noturnos, com mais atividade locomotora durante a escotofase do que na fotofase (Tabela 1;  $p < 0,001$  em todos os grupos testados). Quando comparamos as fases claras, observamos que não houve diferença significativa entre os grupos testados (Tabela 1). Já quando comparamos o pico do acender das luzes (*light-on*), notamos que houve diferença significativa entre os machos e todos os grupos de fêmeas testados, sendo que o pico do acender das luzes foi significativamente maior nos machos (Tabela 1;  $p < 0,001$ ).

Entre os grupos das fêmeas, as virgens apresentaram pico de *light-on* significativamente maior do que o das fêmeas inseminadas e alimentadas (Tabela 1;  $p = 0,001$ ), mas sem diferença significativa comparadas com as inseminadas e virgens alimentadas (Tabela 1;  $p = 0,679$  e  $p = 0,287$ , respectivamente). As fêmeas inseminadas e as fêmeas virgens alimentadas apresentaram pico de *light-on* significativamente maior do que as fêmeas inseminadas e alimentadas (Tabela 1;  $p < 0,001$  e  $p = 0,038$ , respectivamente)

Para o pico do apagar das luzes (*light-off*), foi observado que os machos, comparados com os grupos de fêmeas virgens e fêmeas virgens e alimentadas, não apresentaram diferença estatística (Tabela 1;  $p = 0,980$  e  $p = 0,094$ , respectivamente). Entre os grupos das fêmeas, é possível observar que o grupo que apresenta o maior pico do apagar das luzes é o das fêmeas inseminadas (Tabela 1;  $p < 0,001$ ) e o menor é o das fêmeas inseminadas e alimentadas (Tabela



1;  $p < 0,001$ ). O grupo das fêmeas virgens, comparado com o das fêmeas virgens e alimentadas, não apresentou diferença estatística para o pico do apagar das luzes (Tabela 1;  $p = 0,083$ ).

Na escotofase, comparando o grupo dos machos com os demais, observamos que o grupo das fêmeas virgens e alimentadas apresentou atividade semelhante (Tabela 1;  $p = 0,156$ ), o das fêmeas inseminadas e alimentadas foi o único que apresentou atividade menor que os machos (Tabela 1;  $p < 0,001$ ) e os das fêmeas virgens e fêmeas inseminadas apresentaram atividade locomotora estatisticamente maior (Tabela 1;  $p < 0,001$ ). Entre as fêmeas, os grupos que apresentaram a maior e a menor atividade foram o das inseminadas e das inseminadas e alimentadas, respectivamente (Tabela 1;  $p < 0,001$ ). Ao compararmos os grupos das fêmeas virgens e das fêmeas virgens e alimentadas, notamos que as alimentadas apresentam menor atividade (Tabela 1;  $p = 0,034$ ).

**Tabela 1. Análises estatísticas da atividade locomotora de fêmeas em diferentes condições fisiológicas e machos de *Culex quinquefasciatus*, em relação aos períodos de claro e escuro, fase clara, fase escura e picos de acender e apagar das luzes. Valores de p menores que 0,05 estão destacados em negrito.**

Grupos	Estimate	df	P
Comparação entre claro e escuro (Fotofase-Escotofase)			
Machos	-0,212	191,336	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas Virgens	-0,260	186,005	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas	-0,488	188,554	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens e alimentadas	-0,242	195,196	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas e alimentadas	-0,186	196,024	<b>&lt;0,001</b>
Comparação entre grupos na fotofase			
Machos - Fêmeas Virgens	-0,008	587,185	0,603
Machos - Fêmeas Inseminadas	-0,005	587,187	0,763

Machos - Fêmeas virgens e alimentadas	0,007	587,115	0,654
Machos - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,013	586,993	0,416
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	0,003	587,179	0,827
Fêmeas virgens - Fêmeas virgens e alimentadas	0,015	587,142	0,332
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,021	586,928	0,180
Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens e alimentadas	0,012	587,094	0,453
Fêmeas inseminadas - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,018	587,018	0,263
Fêmeas virgens alimentadas - Fêmeas inseminadas alimentadas	0,006	586,696	0,717

Comparação entre os grupos no pico do acender das luzes (*light-on*)

Machos - Fêmeas Virgens	0,205	14793,463	<b>&lt;0,001</b>
Machos - Fêmeas Inseminadas	0,191	14793,867	<b>&lt;0,001</b>
Machos - Fêmeas virgens e alimentadas	0,245	14782,088	<b>&lt;0,001</b>
Machos - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,324	14761,993	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	-0,015	14792,537	0,679
Fêmeas virgens - Fêmeas virgens e alimentadas	0,039	14786,421	0,287
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,118	14751,402	<b>0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens e alimentadas	0,054	14778,604	0,146
Fêmeas inseminadas - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,133	14766,142	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens alimentadas - Fêmeas inseminadas alimentadas	0,079	14713,425	<b>0,038</b>

Comparação entre os grupos no pico do apagar das luzes (*light-off*)

Machos - Fêmeas Virgens	-0,001	14793,463	0,980
Machos - Fêmeas Inseminadas	-0,167	14793,867	<b>&lt;0,001</b>
Machos - Fêmeas virgens e alimentadas	0,063	14782,088	0,094
Machos - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,249	14761,993	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	-0,167	14792,537	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas virgens e alimentadas	0,064	14786,421	0,083
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,250	14751,402	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens e alimentadas	0,230	14778,604	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,417	14766,142	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens alimentadas - Fêmeas inseminadas alimentadas	0,187	14713,425	<b>&lt;0,001</b>

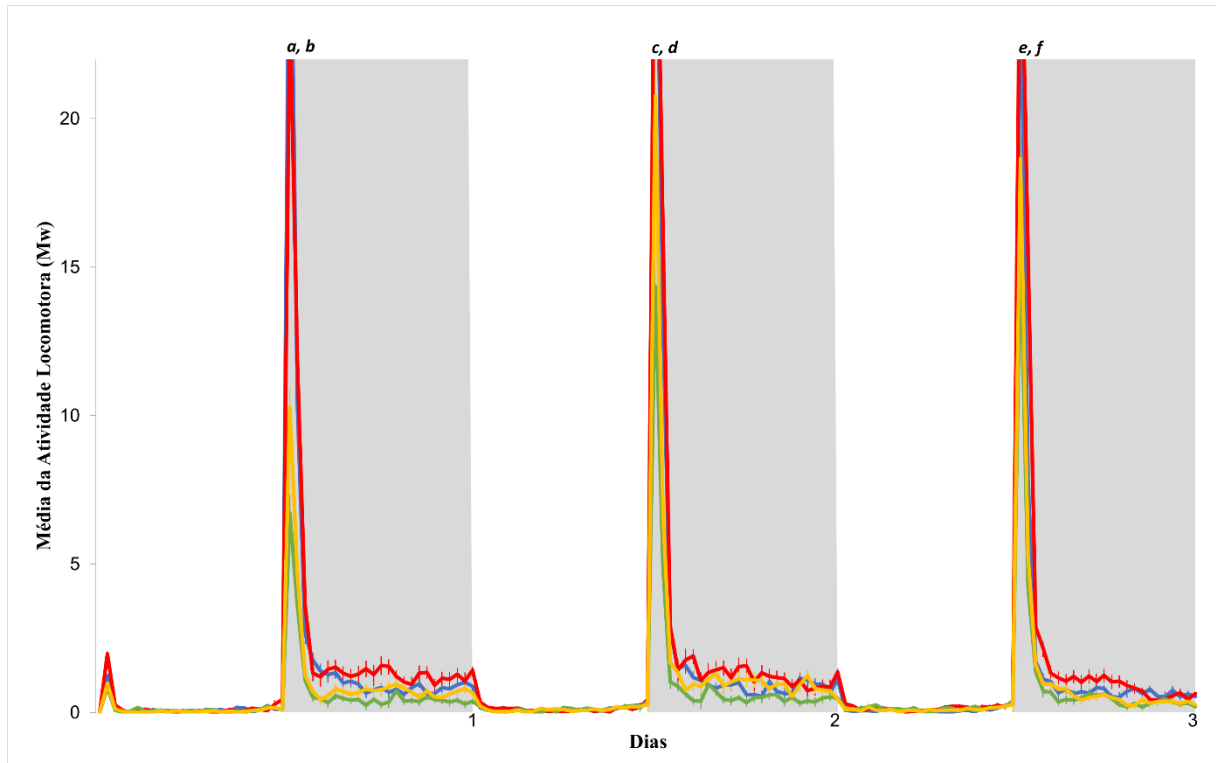
Comparação entre os diferentes grupos na escotofase

Machos - Fêmeas Virgens	-0,056	587,185	<b>&lt;0,001</b>
Machos - Fêmeas Inseminadas	-0,280	587,187	<b>&lt;0,001</b>
Machos - Fêmeas virgens e alimentadas	-0,023	587,115	0,156
Machos - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,039	586,993	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	-0,224	587,179	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas virgens e alimentadas	0,033	587,142	<b>0,034</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,095	586,928	<b>&lt;0,001</b>

Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens e alimentadas	0,258	587,094	<0,001
Fêmeas inseminadas - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,319	587,018	<0,001
Fêmeas virgens e alimentadas - Fêmeas inseminadas e alimentadas	0,062	586,696	<0,001

A Figura 15 apresenta a atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* em diferentes condições fisiológicas, sendo a linha azul para fêmeas virgens, vermelha para inseminadas, verde para inseminadas e inoculadas com solução salina 0,9% e amarela para virgens inoculadas com glândula acessória. A Figura 15 apresenta a atividade locomotora desses grupos durante 3 dias de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD 12:12), a 25 °C. É possível perceber que todos os grupos apresentaram padrão noturno de atividade, com o pico de transição entre as fases clara e escura (*light-off*) bem pronunciado. Também podemos observar que, entre os grupos avaliados, as fêmeas inseminadas (linha vermelha; n=124) apresentam uma maior atividade locomotora noturna em comparação aos demais grupos.

**Figura 15. Atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus*. Atividade locomotora de fêmeas virgens (linha azul; n=131), inseminadas (linha vermelha; n=124), inseminadas e inoculadas com solução salina 0,9% (linha verde; n=102) e virgens inoculadas com glândula acessória (linha amarela; n=119) expostas a 3 dias de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD 12:12), a 25 °C. Valores dos picos acima da escala  $a=30,39$  (azul);  $b=23,90$  (vermelho);  $c=30,39$  (azul);  $d=31,05$  (vermelho),  $e=25,30$  (azul);  $f=28,54$  (vermelho).**



Na Tabela 2, observamos que todos os grupos testados foram significativamente mais ativos durante a escotofase, quando comparados com a fotofase (Tabela 2;  $p < 0,001$  em todos os grupos testados). Quando comparamos as fases claras, observamos que não houve diferença significativa entre os grupos testados (Tabela 2). Já quando comparamos o pico do acender das luzes (*light-on*), notamos que houve diferença significativa entre as fêmeas virgens e os outros grupos (Tabela 2;  $p < 0,05$ ), sendo que apenas as fêmeas inseminadas apresentaram maior atividade nesse pico (Tabela 2;  $p = 0,002$ ). Entre os grupos das fêmeas injetadas, não houve diferença estatística (Tabela 2;  $p = 0,276$ ).

Para o pico de apagar as luzes (*light-off*), as fêmeas virgens e as fêmeas inseminadas não apresentaram diferença estatística (Tabela 2;  $p = 0,619$ ). Porém, os grupos das fêmeas virgens e das fêmeas inseminadas, comparados com ambos os grupos de fêmeas injetadas, apresentaram maior atividade (Tabela 2;  $p < 0,001$ ). Quando comparamos os grupos injetados, observamos que as fêmeas virgens injetadas com glândula acessória foram mais ativas do que as fêmeas inseminadas e injetadas com solução salina 0,9% (Tabela 2;  $p < 0,001$ ).

Na escotofase, o grupo que apresentou maior atividade foi o das fêmeas inseminadas (Tabela 2;  $p < 0,001$ ), seguido do grupo das fêmeas virgens (Tabela 2;  $p < 0,001$ ). Entre os grupos das injetadas, observamos que as fêmeas virgens injetadas com glândula acessória apresentaram

maior atividade do que as fêmeas inseminadas injetadas com solução salina 0,9% (Tabela 2;  $p < 0,001$ ).

**Tabela 2. Análises estatísticas da atividade locomotora de fêmeas em diferentes condições fisiológicas, em relação aos períodos de claro e escuro, fase clara, fase escura e picos de acender e apagar das luzes. Valores de p menores que 0,05 estão destacados em negrito.**

Grupos	Estimate	df	P
Comparação entre claro e escuro (Fotofase-Escotofase)			
Fêmeas virgens	-0,274	45,928	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas	-0,326	46,079	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas+solução salina 0,9% (insem+sal)	-0,147	46,694	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens+glândula acessória (virgens+gld)	-0,227	46,199	<b>&lt;0,001</b>
Comparação entre grupos na fotofase			
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	-0,013	572,863	0,325
Fêmeas virgens - Fêmeas insem+sal	-0,007	572,863	0,602
Fêmeas virgens - Fêmeas virgens+gld	0,001	572,863	0,964
Fêmeas inseminadas - Fêmeas insem+sal	0,006	572,863	0,684
Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens+gld	0,014	572,863	0,315
Fêmeas insem+sal - Fêmeas virgens+gld	0,008	572,863	0,581
Comparação entre os grupos no pico do acender das luzes ( <i>light-on</i> )			
Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	-0,093	12816,255	<b>0,002</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas insem+sal	0,125	12816,255	<b>&lt;0,001</b>

Fêmeas virgens - Fêmeas virgens+gld	0,090	12816,255	<b>0,003</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas insem+sal	0,218	12816,255	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens+gld	0,183	12816,255	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas insem+sal - Fêmeas virgens+gld	-0,035	12816,255	0,276

Comparação entre os grupos no pico do apagar das luzes (*light-off*)

Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	0,015	12816,255	0,619
Fêmeas virgens - Fêmeas insem+sal	0,373	12816,255	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas virgens+gld	0,243	12816,255	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas insem+sal	0,358	12816,255	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens+gld	0,228	12816,255	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas insem+sal - Fêmeas virgens+gld	-0,129	12816,255	<b>&lt;0,001</b>

Comparação entre os diferentes grupos na escotofase

Fêmeas virgens - Fêmeas inseminadas	-0,065	572,863	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas insem+sal	0,120	572,863	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas virgens - Fêmeas virgens+gld	0,047	572,863	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas insem+sal	0,185	572,863	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas inseminadas - Fêmeas virgens+gld	0,113	572,863	<b>&lt;0,001</b>
Fêmeas insem+sal - Fêmeas virgens+gld	-0,073	572,863	<b>&lt;0,001</b>

Nota: insem =inseminadas; sal= salina e gld= glândula acessória

## 6. Discussão

Em nosso trabalho, verificamos a atividade locomotora de machos e fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* em condições de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, a 25 °C. Apesar de ser uma espécie amplamente distribuída pelo mundo e com importância epidemiológica, existem poucos estudos acerca de seus ritmos circadianos.

Nossos resultados reafirmam algo que pode ser facilmente observado de forma empírica: trata-se de uma espécie predominantemente de hábitos noturnos. Esses resultados corroboram as observações feitas por Rivas et al. (2018), que estudaram os efeitos da variação de luz e temperatura na atividade locomotora de fêmeas virgens de *Cx. quinquefasciatus*. Neste estudo, foi possível notar que, em regime de LD 12:12, sob temperaturas de 30 °C (fase clara) e 20 °C (fase escura), os mosquitos apresentaram um padrão de atividade locomotora predominantemente noturno. Além disso, quando os autores expuseram fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* a regime de escuro constante, a variação de temperatura (30 °C na fase clara e 20 °C na fase escura) como único marcador temporal foi suficiente para manter o ritmo biológico muito próximo do normal. Já em regime de claro constante, a atividade das fêmeas foi arritmica, apesar de a 20 °C ainda apresentarem mais atividade, demonstrando que, embora a variação de temperatura também sirva como marcador temporal, essa espécie é fortemente sensível à luminosidade (RIVAS et al., 2018).

Gentile e colaboradores (2009), ao estudarem a atividade locomotora de fêmeas virgens de *Cx. quinquefasciatus* em regime LD 12:12 por dois dias seguidos e de cinco dias em escuro constante, em temperatura constante de 25 °C, também observaram que são mosquitos predominantemente noturnos e que não há alteração no padrão da atividade em condições de escuro constante. O padrão noturno de atividade de *Cx. quinquefasciatus* explica o fato dessa espécie ser considerada, no Brasil, um fator de incômodo, uma vez que suas picadas durante o período da noite podem afetar a qualidade de vida da população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Adicionalmente, o fato de *Cx. quinquefasciatus* possuir atividade noturna torna essa espécie eficaz na transmissão do patógeno causador da Filariose Bancroftiana, *Wuchereria bancrofti*, uma vez que já foi confirmado que as microfilárias possuem o pico de densidade no sangue periférico das pessoas infectadas durante as horas da noite em áreas endêmicas do Brasil (DREYER et al., 1996; FONTES et al., 2000).

Nosso estudo comparou a atividade locomotora de machos e fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* em diferentes estados fisiológicos, como virgens, inseminadas, virgens/alimentadas com sangue e inseminadas/alimentadas com sangue. Entre os grupos, as



fêmeas inseminadas apresentaram maior atividade durante toda a escotofase (Tabela 1), ao passo que as fêmeas inseminadas e alimentadas apresentaram menor atividade durante toda a escotofase e nos picos de *light-on* e *light-off* (Tabela 1). Os picos do *light-on* foram significativamente similares para os grupos de fêmeas virgens e virgens/alimentadas e, na escotofase, a atividade das fêmeas virgens/alimentadas se assemelhou a dos machos (Tabela 1).

Na Figura 14A, observamos que a maior movimentação dos machos ocorreu na transição entre fases (picos de *light-off* e de *light-on*). Essa maior amplitude observada nos momentos de transição, tanto nos machos quanto nos demais grupos, pode estar relacionada a uma “resposta de sobressalto”, devido à diferença abrupta de luminosidade, assim como também foi descrito no estudo feito com *Ae. aegypti* por Gentile e colaboradores (2006).

Jones e Gubbins (1979) observaram padrões de atividade de voo semelhantes para fêmeas virgens e machos de *Cx. quinquefasciatus* e sugeriram que essa semelhança pode estar associada ao comportamento de enxameação, que costuma ocorrer ao anoitecer e ao amanhecer. Em nossos resultados, apesar de, estatisticamente, as virgens terem apresentado mais atividade do que os machos durante a escotofase (Tabela 1), o padrão de atividade de ambos os grupos foi bastante similar (Figura 14A), corroborando a hipótese de Jones e Gubbins (1979).

Para as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, Jones e Gubbins (1979) observaram que, sob fotoperíodo de LD 12:12, as inseminadas tiveram menos atividade de voo durante a escotofase, quando comparadas com as virgens. Esses dados vão de encontro com os que observamos em nossos experimentos, pois as fêmeas inseminadas foram significativamente mais ativas do que as fêmeas virgens durante toda a escotofase (Figuras 14B e 14C). Essa diferença de resultados pode ser explicada pela diferente linhagem de *Cx. quinquefasciatus*, uma vez que Jones e Gubbins (1979) utilizaram fêmeas de origem africana, pela diferença de método utilizado para avaliação da atividade, visto que esses autores utilizaram o actograma acústico para quantificar a atividade de voo e não atividade locomotora e pelo tempo de observação de apenas 24 horas em regime de LD 12:12 (JONES; GUBBINS, 1979). Por outro lado, quando expostas a regime de escuro constante (DD), os autores observaram um aumento gradativo da atividade de voo das fêmeas inseminadas durante 4 dias de experimento, sendo que, no último dia, a atividade havia praticamente dobrado em comparação com o início do experimento (JONES; GUBBINS, 1979).

O padrão de atividade locomotora de fêmeas inseminadas também já foi reportado para outras espécies de mosquitos. Por exemplo, Lima-Camara e colaboradores (2014) avaliaram a atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* e fêmeas de *Ae. albopictus* em diferentes condições fisiológicas e observaram que as fêmeas de *Ae. aegypti* inseminadas apresentaram

menor atividade comparadas às virgens da mesma espécie, enquanto que as fêmeas inseminadas de *Ae. albopictus* não apresentaram diferença significativa comparadas às virgens da mesma espécie. Jones (1981) também verificou que fêmeas inseminadas de *Ae. aegypti* apresentam redução na atividade locomotora em comparação com as fêmeas virgens. O oposto foi reportado para a espécie *Anopheles gambiae*, que teve fêmeas inseminadas apresentando mais atividade de voo do que as não inseminadas (JONES; GUBBINS, 1978). Esses resultados apontam que a atividade locomotora de fêmeas inseminadas pode ter padrões diferentes dependendo da espécie estudada (JONES; GUBBINS, 1978; JONES, 1981; LIMA-CAMARA et al., 2014).

Nossos dados também mostraram que ambos os grupos de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* alimentadas com sangue - virgens e inseminadas - apresentaram atividade locomotora reduzida quando comparados aos grupos das fêmeas não alimentadas com sangue (Tabela 1). O grupo das fêmeas inseminadas e alimentadas foi o que apresentou menor atividade locomotora (Tabela 1;  $p < 0,001$ ). Uma hipótese para essa diferença pode ser o maior peso corporal das fêmeas alimentadas, devido ao volume de sangue ingerido, uma vez que as análises dos experimentos começaram 24h após a realização do repasto sanguíneo. Outra hipótese estaria relacionada à biologia da espécie, cuja dispersão em busca de hospedeiro varia de 0,6 a 1 km por dia (REISEN et al., 1991). Sendo assim, as fêmeas alimentadas já não necessitam ir em busca de um hospedeiro e tornam-se menos ativas, especialmente se também já estiverem inseminadas.

Em relação a outras espécies de mosquito, Lima-Camara et al. (2014) observaram comportamento semelhante para as fêmeas inseminadas e alimentadas de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*, que também foram significativamente menos ativas quando comparadas com as fêmeas virgens e não alimentadas de suas respectivas espécies. Para as fêmeas virgens e alimentadas, os autores também observaram redução significativa na atividade locomotora em comparação com as fêmeas virgens e não alimentadas de *Ae. aegypti*, mas o mesmo não foi reportado para fêmeas de *Ae. albopictus* (LIMA-CAMARA et al., 2014). A atividade de voo de fêmeas inseminadas e alimentadas de *Ae. aegypti*, observada por Jones (1981), também foi significativamente menor em relação às fêmeas virgens e não alimentadas (JONES, 1981). Uma vez que, na natureza, a inseminação de uma fêmea precede a sua busca por um hospedeiro vertebrado para realizar o repasto sanguíneo, é esperado que a atividade de fêmeas inseminadas e alimentadas com sangue seja menor do que a das fêmeas virgens e não alimentadas (JONES, 1981; LIMA-CAMARA et al., 2014).

É importante destacar que Gentile et al. (2013) realizaram um estudo com fêmeas de *Ae. aegypti* e observaram que a alimentação sanguínea modifica a expressão gênica do relógio

circadiano, havendo uma regulação negativa dos genes *per*, *tim*, *cyc* e *Clk*. Outro estudo de expressão dos genes do relógio circadiano de *Anopheles gambiae* indicou que não só eles podem controlar a busca pela alimentação sanguínea por parte das fêmeas, como também têm a expressão alterada após a realização do repasto sanguíneo (DAS; DIMOPOULOS, 2008). Em nosso levantamento bibliográfico, não foram encontrados trabalhos descrevendo a atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, virgens ou inseminadas, alimentadas com sangue. Dessa forma, são necessários mais estudos sobre os ritmos circadianos de *Cx. quinquefasciatus* em laboratório, inclusive comparando o padrão de expressão dos genes de relógio em fêmeas em diferentes estados fisiológicos.

Nos experimentos que avaliaram a atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* inseminadas e das que foram inoculadas intratoracicamente com glândulas acessórias dos machos coespecíficos, novamente observamos mais atividade nas fêmeas naturalmente inseminadas em comparação com as virgens (Tabela 2;  $p < 0,001$ ). Com base nessas observações, era de se esperar que as fêmeas inseminadas e injetadas com solução salina 0,9% e as fêmeas injetadas com AG também apresentassem comportamento semelhante ao das fêmeas naturalmente inseminadas, o que não ocorreu, visto que ambos os grupos injetados apresentaram menor atividade locomotora comparados com as fêmeas inseminadas.

Jones e Gubbins (1979) realizaram um estudo semelhante com *Cx. quinquefasciatus*, no qual observaram que as fêmeas virgens injetadas com solução salina apresentaram uma redução da atividade de voo quando comparadas com as fêmeas virgens intactas (não injetadas), demonstrando que houve um prejuízo na atividade em decorrência da injeção intratorácica. Essa redução na atividade de voo de fêmeas virgens de *Cx. quinquefasciatus* injetadas com solução salina foi observada tanto sob regime de LD 12:12, corroborando nossos resultados, quanto em condições de escuro constante. Os autores também injetaram AGs de machos em fêmeas virgens de *Cx. quinquefasciatus* e verificaram que, a cada dia, a atividade de voo ficava maior em comparação com as fêmeas virgens, semelhante ao que foi observado nas fêmeas inseminadas por cópula (JONES; GUBBINS, 1979), diferindo dos nossos resultados. É importante ressaltar que, para esses grupos, Jones e Gubbins (1979) utilizaram, na maioria dos dias, um fotoperíodo distinto do testado em nossos experimentos, o que pode explicar a diferença nos resultados: enquanto só utilizamos fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, os autores submeteram as fêmeas a 1 dia de LD 12:12 e o restante dos dias a escuro constante (DD). Em nossos experimentos com os grupos injetados, observamos que a injúria da injeção pode ter contribuído para diminuir significativamente a atividade locomotora (Tabela

2), sugerindo, que essa técnica pode não ser adequada para *Cx. quinquefasciatus*, quando o objetivo é voltado para o estudo de seus ritmos circadianos.

Lima-Camara et al. (2013) avaliaram a atividade locomotora de fêmeas virgens de *Ae. aegypti* injetadas com solução salina ou com AGs de machos coespecíficos. Os autores observaram que as fêmeas virgens injetadas com AGs apresentaram menos atividade locomotora em comparação com as fêmeas virgens injetadas com salina (LIMA-CAMARA et al., 2013). Esse resultado indica que as substâncias presentes nas AGs dos machos induzem uma alteração no comportamento das fêmeas de *Ae. aegypti* que, no caso, foi a redução da atividade locomotora. Similarmente, nossos resultados também sugerem que as substâncias das AGs dos machos de *Cx. quinquefasciatus* induzem alteração no comportamento das fêmeas coespecíficas, uma vez que as fêmeas naturalmente inseminadas apresentaram mais atividade locomotora em comparação com todos os outros grupos testados (Tabelas 2 e 3). O fato de o grupo das fêmeas injetadas com AGs apresentarem mais atividade locomotora quando comparado com o grupo das fêmeas inseminadas injetadas com solução salina sugere que essa alteração de comportamento pode ser dose-dependente, visto que a quantidade de AG injetada é superior ao que ocorre na inseminação natural (LIMA-CAMARA et al., 2013).

Nosso estudo avaliou comparativamente, pela primeira vez, a atividade locomotora de fêmeas em diferentes estados fisiológicos e machos de *Cx. quinquefasciatus* sob condições de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, a 25 °C. Também realizamos a comparação da atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* inseminadas naturalmente e injetadas com AGs de machos coespecíficos, sob as mesmas condições de fotoperíodo e temperatura.

O mosquito *Cx. quinquefasciatus* tem importância epidemiológica em diferentes partes do mundo, sendo considerado o principal responsável pela transmissão dos agentes etiológicos de algumas doenças como, por exemplo, o WNV no sudeste dos Estados Unidos (NOORI, 2022), além de desempenhar um papel relevante na transmissão de outros patógenos pelo mundo. No Brasil, a filariose bancroftiana está, atualmente, em processo de verificação da eliminação como problema de Saúde Pública, e o único estado que ainda é considerado endêmico para essa doença é Pernambuco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). O mosquito *Cx. quinquefasciatus* tem importância epidemiológica nessa região, onde atua como principal vetor do agente etiológico da filariose linfática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021), além de ser considerado um fator de incômodo para a população, especialmente por suas picadas à noite (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Além disso, trata-se de uma espécie com grande potencial para transmitir diversos patógenos, tanto pela sua abundância em grandes centros urbanos,

quanto por sua característica eclética em relação às fontes de alimentação (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BHATTACHARYA; BASU, 2016).

Recentemente, um estudo com populações de *Cx. quinquefasciatus* da região Amazônica verificou a competência vetorial dessa espécie para a transmissão de WNV em condições de laboratório. Os resultados indicaram que essas populações são competentes para transmissão de WNV, evidenciando a importância de se manter uma vigilância entomológica ativa desse mosquito no país (REIS et al., 2023). Dessa forma, são necessários mais estudos acerca da biologia e do comportamento de *Cx. quinquefasciatus*, tanto em condições naturais como de laboratório, a fim de melhor compreendermos seu papel como vetor em ciclos de transmissão de patógenos de importância médica. Os padrões dos ritmos circadianos dessa espécie, incluindo a expressão dos genes do relógio, também se torna essencial para a compreensão do comportamento desse mosquito, vetor de diferentes patógenos em nível mundial.

## 7. Conclusões

- O padrão de atividade locomotora de machos de *Cx. quinquefasciatus* se mostrou consistente com o observado na natureza, sendo um mosquito de hábitos predominantemente noturno.
  
- Com a observação do padrão de atividade locomotora de fêmeas virgens, inseminadas, virgens e alimentadas com sangue, e inseminadas e alimentadas com sangue de *Cx. quinquefasciatus*, concluímos que, durante a escotofase:
  - Comparado com as fêmeas virgens não alimentadas, as fêmeas inseminadas são mais ativas e as inseminadas e alimentadas são menos ativas.
  - A alimentação sanguínea, tanto em fêmeas virgens quanto em inseminadas, leva à uma redução na atividade locomotora.
  
- A comparação do padrão de atividade locomotora de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* inseminadas com as injetadas intratoracicamente com glândulas acessórias de machos coespecíficos, demonstrou que a injúria ocasionada pela injeção foi capaz de diminuir significativamente a atividade locomotora nessa espécie, o que torna a utilização dessa técnica não aconselhável quando o objetivo é o estudo dos ritmos biológicos.

## 8. Referências Bibliográficas

AHID S. M. M.; VASCONSELOS P. S. S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* Say from Different Regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95(6), p. 769-775, Nov./Dec. 2000.

ALANIZ A. J. et al. Global spatial assessment of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*: a scenario of Zika virus exposure. **Epidemiology and Infection** 147, e 52, p. 1-11. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268818003102>  
Acesso em: 08/12/2022.

ATYAME C. M. et al. Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286. Jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.2273>  
Acesso em: 01/02/2022.

BRASIL. **Instrução Normativa IBAMA** nº 141, de 19 de dezembro de 2006. 2006. Disponível em:  
<https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&legislacao=112966>  
Acesso em: 07/02/2023.

BHATTACHARYA S.; BASU P. The Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. **Jornal of entomology and zoology studies**, v.4(2), p. 73-81, Fev. 2016.

BRADLEY M. J. et al. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex tarsalis*, and *Culex quinquefasciatus* from California for Zika virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12(6), Jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006524>  
Acesso em: 01/02/2022.

BRANDA M. F. et al. Gonoactivity of *Culex (Culex)* (Diptera:Culicidae) Mosquitoes During Winter in Temperate Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n. 3, p. 1454–1458. 2021. DOI: 10.1093/jme/tjaa295

CARVALHO G. A. et al. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 exposed to different densities of microfilariae of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52(4), p. 658-662, Dez. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). Disponível em: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/gallery/culex/index.html>

Acesso em: 18/11/2022.

CLEMENTS A. N. Adult circadian rhythms. **The biology of mosquitoes: v. 2**, Sensory reception and behaviour. UK: CABI publishing. 1999.

CONSOLI R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.

COOK C. L. et al. North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12(8), Ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006732>

Acesso em: 01/02/2022.

DAS S.; DIMOPOULOS G. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. **BMC Physiol**, 8:23. 2008.

DREYER G. et al. Studies on the periodicity and intravascular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife, Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, 1: p. 264-272. 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.1996.tb00037.x>

Acesso em: 29/05/2023.

DODSON B. L.; RASGON J. L. Vector competence of *Anopheles* and *Culex* mosquitoes for Zika virus. **PeerJ**, v. 5, Mar. 2017. DOI: 10.7717/peerj.3096



EASTWOOD G. et al. West Nile Virus Vector Competency of *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes in the Galápagos Islands. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85(3), p. 426–433, 2011. DOI:10.4269/ajtmh.2011.10-0739

ELIZONDO-QUIROGA D. et al. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from the metropolitan area of Guadalajara, Jalisco, Mexico for Zika virus. **Scientific reports** – natureresearch, V. 9, Nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53117-1>

Acesso em: 01/02/2022.

EVANS O. et al. Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. **J Exp Biol**, v. 212, p. 1436-1441, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.028951>

Acesso em: 01/02/2022.

FALL G. et al. Vector Competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of West Nile virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 90(4), p. 747-754, 2014. DOI:10.4269/ajtmh.13-0405.

FEITOZA T. S. et al. Interspecific Mating Effects on Locomotor Activity Rhythms and Refractoriness of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Females. **Insects**, 11, 874; 2020. DOI:10.3390/insects11120874

FERNANDES R. S. et al. Vector Competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for Three Zika Virus Lineages. **Pathogens**, v. 9, 2020. DOI:10.3390/pathogens9070575

FONSECA M. D. et al. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. **Science**, vol 303, p. 1535-1538. 2004.

FONTES G. et al. The microfilarial periodicity of *Wuchereria bancrofti* in north-eastern Brazil, **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 94:4, p. 373-379. 2000. DOI: 10.1080/00034983.2000.11813552

FORATTINI O. P. **Culicidologia Médica**: V 2. Identificação, biologia, epidemiologia. São Paulo: Edusp, 2002.

FORATTINI O. P. **Culicidologia Médica**: V 1. Princípios gerais, morfologia e glossário taxonômico. São Paulo: Edusp, 1996.

GENTILE C. et al. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: cry2 is different. **Journal of Biological Rhythms**. Vol. 24(Nº6); p. 444-451. 2009. DOI: 10.1177/0748730409349169

GENTILE C. et al. Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 36. p. 878–884. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.08.008>

Acesso em: 29/05/2023.

GENTILE C. et al. Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 108(Suppl. I): p. 80-87. 2013. DOI: 10.1590/0074-0276130471

GILLOTT C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annu Rev Entomol** 48: p. 163-184. 2003. DOI: 10.1146/annurev.ento.48.091801.112657

GUEDES D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, p. 1-11, Ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/emi.2017.59>

Acesso em 29/05/2023.

HADDOW A. J. Studies on the biting habits and medical importance of east African mosquitos in the genus *Aedes*. ISubgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Dunnius*. **Bulletin of Entomological Research**; 50:759–779. 1960. DOI : [10.1017/S000748530005478X](https://doi.org/10.1017/S000748530005478X)

HAMER G L et al. “Plasmodium relictum infection in *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) decreases diel flight activity but increases peak dusk flight activity”. **Research square (preprint)**. 2022. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1422722/v1>

Acesso em 29/05/2023.

HARDIN P. E. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. 1st ed. Vol. 74, **Advances in Genetics. Elsevier Inc.**; p. 141–173. 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-387690-4.00005-2

HUANG Y. J. S. et al. Susceptibility of a North American *Culex quinquefasciatus* to Japanese Encephalitis Virus. **Vector –borne and zoonotic diseases**, v. 15, p. 709-711, 2015. DOI: 10.1089/vbz.2015.1821

JANOUSEK T. E.; LOWRIE R. C. Vector competency of *Culex quinquefasciatus* (Haitian strain) following infection with *Wuchereria bancrofti*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 679-680, Set.1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90395-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90395-7)

Acesso em 29/05/2023.

JANSEN J. M. et al. Cronobiologia e seus mecanismos. JANSEN J. M. et al. (orgs.) **Medicina da noite: da cronobiologia à prática clínica**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 47-69, 2007.

JONES M. D. R.; GUBBINS S. J. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. **Physiological Entomology**, 3(3), p. 213–220. 1978. DOI:10.1111/j.1365-3032.1978.tb00151.x

JONES M. D. R.; GUBBINS S. J. Modification of female circadian flight-activity by a male accessory gland pheromone in the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Physiological Entomology**, v.4, p. 345-351, 1979.

JONES M. D. R. Coupled oscillators controlling circadian flight activity in the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Physiological Entomology**, v. 7, p. 281-289, 1982.

JONES M. D. R. The programming of circadian flight-activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito, *Aedes aegypti*. **Physiological Entomology**, v. 6, p. 307-313, 1981.

KENT R. J.; CRABTREE M. B.; MILLER B. R. Transmission of West Nile Virus by *Culex quinquefasciatus* Say Infected with *Culex Flavivirus Izabal*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4(5), Mai. 2010. DOI:10.1371/journal.pntd.0000671

KONOPKA, R.J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**; 68: p. 2112- 2116, 1971. DOI:10.1073/pnas.68.9.2112

KRAMER L. D.; CIOTA A. T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. **Elsevier**, Wadsworth Center, New York State Department of Health, and School of Public Health, State University of New York at Albany, Albany, New York, USA. 2015.

LAPOINTE D. A. et al. Experimental infection of Hawai'i Amakihi (*Hemignathus virens*) with West Nile Virus and Competence of a co-occurring vector, *Culex quinquefasciatus*: potential impacts on endemic Hawaiian avifauna. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45(2), p. 257-271, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.257>  
Acesso em: 01/02/2022.

LIMA-CAMARA, T. N. et al. Male accessory gland substances from *Aedes albopictus* affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108(Supl. I), p. 18-25, 2013. DOI: 10.1590/0074-0276130381

LIMA-CAMARA T. N. et al. Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-8, 2014.

LIMA-CAMARA T. N. et al. Body size does not affect locomotor activity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* females (Diptera:Culicidae). **Acta Tropica**, 231. 106430. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106430>  
Acesso em 29/05/2023.

LIU Z. et al. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, Jul 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.3201/eid2307.161528>

Acesso em: 01/02/2022.

LUTOMIA J. et al. Probable contribution of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes to the circulation of chikungunya virus during an outbreak in Mombasa County, Kenya, 2017–2018. **Parasites Vectors**, v. 14. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04632-6>

Acesso em 29/05/2023.

MCMILLAN J. R. et al. Linking the vectorial capacity of multiple vectors to observed patterns of West Nile virus transmission. **Journal of Applied Ecology**, v. 56, p. 956-965, Dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13322>

Acesso em: 01/02/2022.

MCGREGOR B. L.; CONNELLY C. R.; KENNY J. L. Infection, Dissemination, and Transmission Potential of North American *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis*, and *Culicoides sonorensis* for Oropouche Virus. **Viruses**, V. 13, Fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13020226>

Acesso em: 01/02/2022

MENDONÇA S. F. et al. Evaluation of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes Competence to Oropouche virus Infection. **Viruses**, v. 13, Abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13050755>

Acesso em 29/05/2023.

MENNA-BARRETO L e MARQUES N. “O tempo dentro da vida, além da vida dentro do tempo”. **Ciência e Cultura**. Volume 54, nº2. São Paulo, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico**: Doenças negligenciadas. Número especial. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância do *Culex quinquefasciatus***. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 3ª edição. Brasília, 2011.

MORAIS A. S. et al. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 105: p. 672-676. 2010.

NDIAYE E. H. et al. Vector competence of *Aedes vexans* (Meigen), *Culex poicilipes* (Theobald) and *Cx. quinquefasciatus* Say from Senegal for West and East African lineages of Rift Valley fever virus. **Parasites & Vectors**, v. 9, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1383-y

NEWMAN C M; ANDERSON T K; GOLDBERG T L. “Decreased Flight Activity in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Naturally Infected With *Culex flavivirus*”. **Journal of Medical Entomology**, 53(1), p. 233–236. 2016. DOI: 10.1093/jme/tjv161

NEW ZEALAND BIOSECURE ENTOMOLOGY LABORATORY. ***Culex (Culex) quinquefasciatus* (Say)**. New Zealand Status. 2008.

NOORI N. et al. Short-term prediction of *Culex quinquefasciatus* abundance in Central North Georgia, USA, based on the meteorological variability. **Neural Computing and Applications**. 34: p. 14717–14728. 2022. DOI: [https://doi.org/10.1007/s00521-022-07324-z\(0123456789\(..-volV\)\(0123456789\(..-volV\)\)](https://doi.org/10.1007/s00521-022-07324-z(0123456789(..-volV)(0123456789(..-volV)))

Acesso em 29/05/2023.

PADILHA K. P. et al. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 19, Jun. 2018. DOI: 10.1590/0074-02760180290

PEREIRA TN et al. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14(4), Abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007518>

Acesso em 29/05/2023.

PITTENDRIGH C. S. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 58: p. 1762-1767. 1967.

PITTENDRIGH C. S.; TAKAMURA T. Temperature dependence and evolutionary adjustment of critical night length in insect photoperiodism. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 84: p. 7169-7173. 1987.

PITTENDRIGH C. S.; KYNER W. T.; TAKAMURA T. The amplitude of circadian oscillations: temperature dependence, latitudinal clines, and the photoperiodic time measurement. **J Biol Rhythms**; 6: p. 299-313. 1991.

REISEN W. K. et al. Mark—Release—Recapture Studies with *Culex* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southern California. **Journal of Medical Entomology**, 28(3), p. 357–371. 1991. DOI:10.1093/jmedent/28.3.357

REIS L. A. M. et al. Vectorial Competence Potential of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1923) from the Amazon Region to Transmit West Nile Virus Isolated in Brazil. **Research Square**, revisado em 2021. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-603135/v1>  
Acesso em 29/05/2023.

REIS L. A. M. et al. Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* from Brazil for West Nile Virus. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 8, 217. 2023.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8040217>  
Acesso em 29/05/2023.

RIVAS G. B. S. Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores. **Revista da Biologia**, 9(3), p. 19-25, 2012. DOI: 10.7594/revbio.09.03.04

RIVAS G. B. S. et al. Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. **Journal of biological rhythms**, vol 33, n°3, Jun. 2018. DOI: 10.1177/0748730418772175

RIVAS G. B. S. et al. CLOCKWORK ORANGE promotes CLOCK-CYCLE activation via the putative *Drosophila* ortholog of CLOCK INTERACTING PROTEIN CIRCADIAN. **Current Biology**, 31(19): p. 4207-4218.e4. 2021. DOI:10.1016/j.cub.2021.07.017.

ROMO H. et al. Comparative Vector Competence of North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* for African and European Lineage 2 West Nile Viruses. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98(6), p. 1863-1869, 2018. DOI: doi:10.4269/ajtmh.17-0935

ROTENBERG L.; MARQUES N.; MENNA-BARRETO L. Desenvolvimento da Cronobiologia. Marques N, Menna-Barreto L, orgs. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo: EDUSP-Fiocruz; p. 23-44. 1997.

ROWLAND M. W.; LINDSY S. W. The circadian flight activity of *Aedes aegypti* parasitized with the filarial nematode *Brugia pahangi*. **Physiological Entomology**, v. 11, p. 325-334, 1986.

SANISURIWONG J. et al. Vector competence of *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) for duck Tembusu virus transmission. **Acta Tropica**, v. 214, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105785>  
Acesso em 29/05/2023.

SANTANA S. R. et al. Gonotrophic discordance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in the city of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020. DOI: 10.1590/0037-8682-0277-2019

SAMY A. M. et al. Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*, Vector of West Nile Virus and Lymphatic Filariasis. **PLoS ONE** 11(10): e0163863. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163863

SUDEEP A. B. et al. Vector competence of certain *Culex* and *Aedes* mosquitoes for the Chittoor virus, the Indian variant of Batai virus. **Can J Microbiol**, v. 64, p. 581-588, Mai. 2018. DOI: 10.1139/cjm-2017-0514.



SUDEEP A. B. et al. Vector competence of two Indian populations of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes to three West Nile virus strains. **J Vector Borne Dis**, v. 52, p. 185-192, Set. 2015. Disponível em: <http://www.mrcindia.org/journal/issues/523185.pdf>  
Acesso em: 01/02/2022.

TUNGA K. C. et al. Demonstration of vector competence of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) for *Setaria digitata*. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 279-284, 2004. DOI: doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.001

TURELL M. J. et al. Vector competence of kenyan *Culex zombaensis* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Rift Valley Fever Virus. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, p. 378-382, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.2987/5645.1>.  
Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/full/10.2987/5645.1>  
Acesso em: 01/02/2022

WULUND L.; REDDY A. B. A brief history of circadian time: The emergence of redox oscillations as a novel component of biological rhythms. **Perspectives in Science**. 6, p. 27-37. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pisc.2015.08.002>  
Acesso em 29/05/2023.