

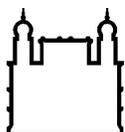
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - Mestrado

AVALIAÇÃO DO RISCO DA TRANSMISSÃO VETORIAL DO VÍRUS  
VACINAL NO CONTEXTO DA IMUNIZAÇÃO DE PRIMATAS NÃO-  
HUMANOS BRASILEIROS CONTRA A FEBRE AMARELA

RAFAELLA MORAES DE MIRANDA

Rio de Janeiro  
Agosto de 2020



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*RAFAELLA MORAES DE MIRANDA*

Avaliação do risco da transmissão vetorial do vírus vacinal no contexto da imunização de primatas não-humanos brasileiros contra a Febre Amarela

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientador:** Prof. Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

**RIO DE JANEIRO**

Agosto de 2020

Miranda, Rafaella Moraes de.

Avaliação do risco da transmissão vetorial do vírus vacinal no contexto da imunização de primatas não-humanos brasileiros contra a Febre Amarela / Rafaella Moraes de Miranda. - Rio de Janeiro, 2020.

xvi, 103f f.; il.

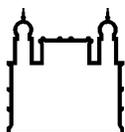
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

Orientador: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar.

Co-orientador: Ricardo Lourenço de Oliveira.

Bibliografia: f. 78-101

1. Febre Amarela. 2. Transmissão Vetorial. 3. Mosquitos. 4. Vacina contra Febre Amarela. 5. Primatas-não-humanos. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTOR: RAFAELLA MORAES DE MIRANDA***

**AVALIAÇÃO DO RISCO DA TRANSMISSÃO VETORIAL DO VÍRUS VACINAL NO  
CONTEXTO DA IMUNIZAÇÃO DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS BRASILEIROS  
CONTRA A FEBRE AMARELA**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar**  
**Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira**

**Aprovada em: 26/08/2020**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Myrna Cristina Bonaldo - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz)

**Prof. Dr. Alcides Pissinatti** (Centro de Primatologia do Rio de Janeiro)

**Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto** (Instituto Evandro Chagas)

**Suplentes**

**Prof. Dr. Filipe Vieira Santos de Abreu** (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais)

**Prof. Dr. Taissa Pereira dos Santos** (Institut de Recherche pour le Développement)

Rio de Janeiro, 26 de agosto de 2020

Dedico este trabalho ao meu  
marido e ao meu filho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por toda a força, por ter me sustentado nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Dr. Jeronimo Alencar, pela oportunidade, orientação, mas principalmente nas correções, sugestões e toda ajuda nas fases finais da elaboração da tese.

Ao meu co-orientador, Dr. Ricardo Lourenço, por todo o apoio, que nunca me faltou. Pelos ensinamentos, incentivo e pela colaboração em todas as fases do trabalho. Obrigada pela orientação, confiança, oportunidade e por toda a paciência e compreensão sobre as minhas dificuldades e erros, principalmente na etapa final da realização deste trabalho. Foi uma imensa honra ser sua aluna e aprender com você durante esses sete anos no LATHEMA.

Aos meus pais, que apesar de toda a dificuldade, não hesitaram, em nenhum momento, em investir nos estudos dos filhos e por sempre incentivarem a leitura e a busca do conhecimento.

Ao meu marido, que me incentivou a todo o momento, sempre acreditando em mim, me apoiando, me consolando, me animando e me fazendo rir até nos momentos de desespero. Por me suportar nos momentos de estresse, por entender as incontáveis vezes que precisei trabalhar nos fins de semana e até mais tarde da noite, seja na FIOCRUZ, seja em casa, estudando para a seleção do mestrado, para as disciplinas ou escrevendo dissertação. Por cada mimo para me fazer sentir melhor nos momentos de desespero, por cada refeição servida à mesa do computador, para que eu não “perdesse tempo” preparando e por tantas outras formas que encontrou para demonstrar o seu total apoio às minhas realizações profissionais e acadêmicas.

À família que ganhei no Rio de Janeiro, que me acolheu desde o início, a qual também me deu apoio e incentivo. Minha sogra, Cláudia Bastos, meu sogro Wanner Souza, meu cunhado Victor Souza e vó Alzira, obrigada por tudo!

A todos os amigos do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA), que com toda a certeza muito colaboraram para a realização deste trabalho. Agradeço cada palavra de incentivo ou de consolo, cada “pequeno” ensinamento, cada ajuda nos experimentos, coletas e expedições de campo. Em especial, agradeço à Dra. Rosilainy Surubi, Maria Ignez Bersot, Anielly

Alves, Dra. Márcia Castro, Maycon Neves, Agostinho Cardoso, Dra. Monique Motta, Dra. Teresa Fernandes, Glauber Rocha, Mauro Menezes, Marcelo Celestino, Renato Carvalho, Marcelo Quintela, Thiago Margalho, Cristiane Vicente, Alexandre Xavier, Luciana Stanzani, Paulino Ribeiro, Filipe Vieira, Aline Tátilla e a todos que contribuíram de alguma forma, mesmo que indireta, à realização deste trabalho.

Às amigas Iule Bonelly, Tacilane Divina e Keli Antunes, que mesmo não estando mais no LATHEMA, me ajudaram com palavras de consolo e incentivo, para que eu não esmorecesse. Agradeço ainda à Keli pelos “puxões de orelha” e à Iule e Tacilane pela ajuda em momentos difíceis e cansativos, ficando muitas vezes depois das 17h para me ajudar.

À Jô, por me socorrer em alguns (muitos) momentos, me auxiliar em outros e pelas conversas e momentos de desabafo e distração.

Aos amigos das turmas de Mestrado em Medicina Tropical 2018 e 2019, por tornar tudo mais leve, com as conversas descontraídas e por compartilhar as dúvidas e os conhecimentos. Especialmente, agradeço à minha amiga Pamela Mosquera, pelo apoio durante todo o mestrado. Por não duvidar da minha capacidade, mesmo quando eu mesma duvidava e por toda palavra de consolo e apoio, principalmente nesses momentos finais. Vou levar sua amizade para o resto da minha vida, independente da distância.

À Júlia Silva, por toda a ajuda com as estatísticas utilizadas neste trabalho.

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, pela colaboração, fundamental para a realização de todo o projeto, especialmente ao Dr. Alcides Pissinatti e à Sílvia Moreira.

Ao LABMOF, pela colaboração, fornecendo alíquotas de controle positivo para febre amarela, essencial para a realização das reações da RT-qPCR, especialmente à Dra. Myrna Bonaldo, Ieda Pereira e Lidiane Menezes.

Ao LATEV (Bio-Manguinhos) pela colaboração, a qual foi fundamental para a realização dos experimentos complementares, fornecendo alíquotas do vírus vacinal, em especial ao André Tavares, Marta Cristina, Dr. Marcos Freire e Ygara Mendes.

Ao Campus Fiocruz Mata Atlântica, especialmente ao Dr. Ricardo Moratelli. Ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical, ao Instituto Oswaldo Cruz e ao CNPq, por permitirem a realização deste trabalho.

## RESUMO

Em 2017-2019, um surto de febre amarela silvestre (FAS) acometeu o estado do Rio de Janeiro. Epizootias de primatas não-humanos (PNHs) foram amplamente reportadas, inclusive em áreas de conservação de espécies ameaçadas de extinção. Além da imunização de humanos, estratégias complementares foram sugeridas, como a vacinação de PNHs, que, além de potencialmente colaborar para a redução da transmissão do vírus amarelíco (YFV), evitaria a extinção de espécies ameaçadas. Porém, a possibilidade do vírus vacinal atenuado ser transmitido por mosquitos na natureza, que poderia pôr em risco as propriedades genéticas do vírus e biológicas da vacina, precisava ser averiguada. Assim, no presente estudo, lotes de mosquitos *Aedes aegypti*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, *Sabethes albiprivus* e *Sabethes identicus* foram alimentados diretamente em micos-leões vacinados e mantidos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), em Guapimirim. Os repastos foram feitos no terceiro dia após a vacinação dos animais com o vírus atenuado YFV-17DD, quando a carga viral no sangue variou de  $1,05 \times 10^3$  a  $6,61 \times 10^3$  PFU/mL. Após 14 e 21 dias de incubação a 26°C, 80% UR e fotoperíodo de 12/12h, homogenatos do corpo (tórax + abdome) de nenhum dos 620 mosquitos examinados por RT-qPCR se mostrou infectado. Para verificar se o título viral no sangue dos PNHs foi determinante na infecção dos vetores, outros lotes de mosquitos foram alimentados artificialmente com repastos sanguíneos contendo  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^7$  PFU/mL do YFV-17DD e incubados e examinados ao 14º. dia nas mesmas condições acima. Mosquitos só se infectaram quando ingeriram o repasto artificial com título viral elevado ( $10^7$  PFU/mL), mesmo assim exibindo taxa de infecção baixa (17 % e 10 % em *Hg. leucocelaenus* e *Ae. aegypti*, respectivamente) ou nula (*Sa. albiprivus*). O YFV-17DD não foi encontrado em nenhum homogenato de cabeça de mosquito infectado, sugere a existência de barreiras no intestino médio das espécies desafiadas, bloqueado a disseminação do vírus vacinal para tecidos secundários em e, por conseguinte, a sua transmissão. Foram realizadas coletas quinzenais de mosquitos, de dezembro de 2018 a dezembro de 2019, em 12 pontos distribuídos em transectos cobrindo desde a área mais modificada do CPRJ até 200 e 400 mm mata adentro, através de armadilhas de oviposição (ovitampas) e de adultos (BG-Sentinel com CO<sub>2</sub> como atraente) e atração humana protegida e esclarecida (AHPE). Coletaram-se 9.349 mosquitos, cuja abundância, riqueza e diversidade de espécies foram heterogêneas entre os pontos amostrais. O método de coleta influenciou mais na composição da fauna capturada que a localização, havendo espécies (*Anopheles cruzii*, *Psosrophora ferox*, *Runchomyia cerqueirai*, possivelmente *Wyeomyia incaudata* (?), *Wyeomyia theobaldi*, *Sabethes chloropterus* e *Sa. albiprivus*) somente coletadas com AHPE. A fauna de mosquitos se revelou diversa, com 21 espécies de 12 gêneros, dentre as quais vetoras primárias e secundárias da FAS, como *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Aedes scapularis* e *Sa. chloropterus*. As distribuições temporal e espacial da densidade destas espécies, especialmente de *Hg. leucocelaenus*, sugerem que os PNHs do CPRJ estão expostos à picada desses vetores e à transmissão do vírus selvagem, a despeito da localização da gaiola e da época do ano, embora com maior risco entre janeiro e março. Porém, as evidências obtidas indicam que a baixa viremia desenvolvida pelos micos-leões e outros PNHs Neotropicais vacinados no CPRJ, combinada com a baixa susceptibilidade de mosquitos silvestres ao YFV-17DD, não sustentariam a transmissão do YFV-17DD na natureza.

## ABSTRACT

In 2017-2019, the state of Rio de Janeiro was affected by an outbreak of sylvatic yellow fever (SYF). Epizootics of non-human primates (NHPs) were largely reported, including in conservation areas of endangered species. In addition to the immunization of humans, complementary strategies have been suggested, such as the vaccination of PNHs, which besides potentially helping to reduce the transmission of the yellow fever virus (YFV), would prevent the extinction of endangered species. However, the possibility of the attenuated vaccine virus being transmitted by mosquitoes in the wild, which could jeopardize the genetic and biological properties of the vaccine, needed to be investigated. Thus, in the present study, batches of *Aedes aegypti*, *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, *Sabethes albiprivus* and *Sabethes identicus* mosquitoes were fed directly on vaccinated lion tamarins maintained at the Primatology Center of Rio de Janeiro (CPRJ), in Guapimirim. Feedings were performed on the third day after vaccination of the animals with the attenuated virus YFV-17DD, when the viral load in the blood ranged from  $1.05 \times 10^3$  to  $6.61 \times 10^3$  PFU / mL. After 14 and 21 days of incubation at 26°C, 80% RH and 12/12h photoperiod, no body homogenates (thorax + abdomen) of 620 mosquitoes examined by RT-qPCR proved to be infected. To verify whether the viral titer in the blood of the PNHs was determinant in the infection, other batches of mosquitoes were artificially fed with blood meals containing  $1 \times 10^4$  or  $1 \times 10^7$  PFU / mL of the YFV-17DD, following incubation and virus screening on the 14<sup>o</sup> day under the same above mentioned conditions. Only mosquitoes engorged with the artificial meal with the higher viral titer ( $10^7$  PFU / mL) got infected but displaying low (17% and 10% in *Hg. leucocelaenus* and *Ae. aegypti*, respectively) or null (*Sa. albiprivus*) infection rates. YFV-17DD was not found in head homogenates of any infected mosquito, suggesting the existence of barriers in the midgut of the challenged mosquito species, blocking dissemination of the vaccine attenuated virus to secondary mosquito tissues and, therefore, its transmission. Fortnightly collections of mosquitoes were carried out, from December 2018 to December 2019, at 12 sites distributed in transects covering from the most modified area in the CPRJ up to 200 and 400m from there into the forest, through oviposition (ovitrap) and adults (BG-Sentinel with CO<sub>2</sub> as attractive) and protected and informed human attraction (AHPE). A total of 9,349 mosquitoes were collected, whose species abundance, richness and diversity were heterogeneous among the sampling sites. The collection method influenced the captured fauna the more than the site location, with seven species (*Anopheles cruzii*, *Psosrophora ferox*, *Runchomyia cerqueirai*, possibly *Wyeomyia incaudata* (?), *Wyeomyia theobaldi*, *Sabethes chloropterus* and *Sa. albiprivus*) being collected only AHPE. The CPRJ's mosquito fauna proved to be diverse, with 21 species of 12 genera, including primary and secondary SYF vectors, such as *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Aedes scapularis* and *Sa. chloropterus*. The temporal and spatial distributions of density of these species, especially *Hg. leucocelaenus*, suggest that PNHs in the CPRJ are exposed to the bite of these vectors and transmission of sylvatic YFV, regardless of the location of their cages and at any time in the year, although with greater risk between January and March. However, the evidence obtained in this study indicates that the low viremia developed by vaccinated lion tamarins and other NHPs in the CPRJ, combined with the low susceptibility of wild mosquitoes to YFV-17DD, would not support the transmission of the attenuated vaccine virus in nature.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Aspectos gerais sobre a febre amarela.....	1
1.2	A vacina 17DD.....	6
1.3	Ciclos de transmissão da febre amarela .....	7
1.4	Primatas não humanos (PNHs) e febre amarela .....	9
1.5	Biologia dos mosquitos .....	11
1.6	Principais vetores da febre amarela no Brasil .....	14
1.6.1	Vetor Urbano .....	14
1.6.2	Vetores Silvestres.....	17
1.7	Competência vetorial .....	20
1.8	Uma breve história da febre amarela no Brasil.....	23
1.9	Epidemiologia e situação atual da febre amarela no Brasil.....	25
1.10	Vírus vacinal atenuado em mosquito vetor.....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1	Objetivo Geral.....	31
2.2	Objetivos Específicos .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1	Considerações éticas.....	32
3.2	Delineamento e local do estudo.....	32
3.3	PNHs utilizados no estudo .....	33
3.4	Mosquitos utilizados nos desafios orais infectantes .....	33
3.5	Repasto sanguíneo nos PNH vacinados .....	35
3.6	Desafio oral experimental de mosquitos em laboratório .....	37
3.7	Exame dos mosquitos .....	38
3.8	Coleta de mosquitos para levantamento faunístico .....	39
3.9	Análises estatísticas .....	42
3.9.1	Índices de diversidade e similaridade .....	42
3.9.2	Análises de Kruskal-Wallis, Pós teste de Dunn e Análise de Mann Withney.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
4.1	Determinação das taxas de infecção e disseminação em mosquitos alimentados nos PNHs vacinados .....	44

<b>4.2</b>	<b>Determinação das taxas de infecção e disseminação dos mosquitos desafiados oralmente em laboratório .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Abundância dos mosquitos (Culicidae) capturados no CPRJ .....</b>	<b>48</b>
4.3.1	Abundância dos imaturos .....	51
4.3.2	Abundância dos adultos.....	52
<b>4.4</b>	<b>Abundância segundo o ponto de coleta.....</b>	<b>54</b>
<b>4.5</b>	<b>Distribuição espacial: riqueza e diversidade de espécies .....</b>	<b>57</b>
<b>4.6</b>	<b>Abundância e distribuição das espécies por período de coleta. ....</b>	<b>61</b>
4.6.1	Imaturos.....	61
4.6.2	Adultos capturados por AHPE .....	63
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
5.1	Competência vetorial .....	65
5.2	Levantamento faunístico e modelos de distribuição dos espécimes coletados .....	71
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>102</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A) Representação esquemática da poliproteína do YFV. Três proteínas virais estruturais, C, capsídeo; prM, precursor da proteína de membrana; E, envelope; e as sete proteínas não-estruturais. Fonte: Adaptado de Beck et al. 2013.	
B) Partícula viral esquematizada mostrando a estrutura básica do vírus. Fonte: Adaptado de Gardner & Ryman, 2010 .....	4
Figura 2: Ciclos de transmissão da febre amarela: silvestre, urbano e intermediário. (Fonte: CDC).....	9
Figura 3: Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> no momento da realização do repasto sanguíneo. Foto: Genilton Vierira/IOC .....	15
Figura 4: Macho de <i>Haemagogus janthinomys</i> . (A) e fêmea de <i>Haemagogus leucocelaenus</i> (B). Foto: Josué Damacena e Genilton Vieira (Instituto Oswaldo Cruz). .....	18
Figura 5: <i>Sabethes</i> sp. Foto: Ulf Drechsel.....	19
Figura 6: Barreiras que um arbovírus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo. MIB= barreira de infecção no intestino; MEB = Barreira de escape do intestino; TB = barreira de transmissão. Fonte: (AMARAL et al., 2012; adaptado de Black et al., 2002).....	22
Figura 7: Distribuição dos casos humanos confirmados para a FA, segundo o local provável de infecção (LPI), amazônica ou extra-Amazônica no Brasil, entre os períodos de monitoramento 1998/1999 e 2019/2020 (Fonte: Coordenação-Geral das Arboviroses (CGARB) /Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis (DEIDT)/ Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/ Ministério da Saúde (MS). .....	27
Figura 8: Distribuição dos casos humanos e epizootias em PNHs confirmados para FA, por local provável de infecção, monitoramento 2019/2020 (jul/19 a jun/20), Brasil, entre as SE 01 a11 (Fonte: Ministério da Saúde, 2020). .....	28
Figura 9: Detalhes da localização do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, no município de Guapimirim, no Estado do Rio de Janeiro .....	32
Figura 10: Disposição dos pontos de coleta no entorno do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Guapimirim, RJ. As distâncias indicadas possuem como referência o ponto central (P1), situado próximo à sede do CPRJ.....	40
Figura 11: Armadilhas utilizadas para a coleta de mosquitos adultos e imaturos. Capturador de sucção manual (Castro) (A), Ovitrapa (B) e armadilha BG-Sentinel (C). Fotos: SVS/MS 2004 (A) e (B); Rafaella Miranda (C).....	41

Figura 12: Percentual por gênero dos espécimes coletados, através da captura de imaturos ( ovos, larvas e pupas) e adultos, coletados por todas as metodologias empregadas neste estudo, no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, no período de um ano (dez/2018 a dez/2019).....	50
Figura 13: Abundância dos imaturos (ovos, larva e pulas), coletados através de ovitrampas (água e palhetas), coletados no entorno do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, no período de um ano, no conjunto dos pontos amostrais. ....	50
Figura 14: Abundância dos mosquitos obtidos através dos ovos coletados em palhetas de ovitrampas no CPRJ, no período de um ano, em todos os pontos amostrais.....	51
Figura 15: Abundância dos mosquitos obtidos através de imaturos (larvas e pupas), em ovitrampas no CPRJ, no período de um ano, em todos os pontos amostrais. ....	52
Figura 16: Abundância geral entre os adultos coletados por BG e AHPE no CPRJ em oito meses de coleta (dez/2018 a mar/2019 e jun/2019 a set/2019). ....	53
Figura 17: Abundância dos adultos coletados através da AHPE no CPRJ, em oito meses de coleta (dez/2018 a mar/2019 e jun/2019 a set/2019).....	53
Figura 18: Abundância dos adultos coletados através da armadilha BG-Sentinel no CPRJ em oito meses de coleta (dez/2018 a mar/2019 e jun/2019 a set/2019)	54
Figura 19: Abundância dos imaturos (ovos, larva e pupas) por ponto de coleta, obtidos a partir de palhetas e água de ovitrampas no CPRJ .....	55
Figura 20: Distribuição dos imaturos coletados no CPRJ por ponto amostral e tipo de coleta.....	56
Figura 21: Abundância de Culicídeos coletados na forma adulta, através da BG-Sentinel e AHPE no CPRJ, segundo o ponto de coleta .....	57
Figura 22: Número absoluto de espécimes capturados por mês de coleta, entre adultos e imaturos .....	62
Figura 23: Flutuação mensal dos mosquitos imaturos coletados no período de um ano, no CPRJ.....	63
Figura 24: Flutuação mensal dos mosquitos capturados através da AHPE no CPRJ. ....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Total dos mosquitos desafiados oralmente nos primatas não-humanos (PNHs) virêmicos no 3º. Dia após receberem a vacina de vírus da febre amarela atenuado 17DD, do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Guapimirim, Rio de Janeiro, segundo a espécie de mosquito e período de incubação após a alimentação nos primatas.....	44
Tabela 2: Espécie de mico-leão, viremia no momento da alimentação dos mosquitos e número de mosquitos, por espécie, examinados segundo o dia após a alimentação nos primatas (d.p.i.) virêmicos no 3º. dia após receberem a vacina de vírus da febre amarela atenuado 17DD no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro .....	46
Tabela 3: Parâmetros determinantes da competência vetorial avaliados em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Sa. albiprivus</i> e <i>Hg. leucocelaenus</i> experimentalmente desafiadas por via oral com duas diluições diferentes do vírus vacinal 17DD, após 14 dias de incubação.....	47
Tabela 4: Número absoluto dos espécimes coletados, dentre adultos e imaturos, através de todos os métodos de captura utilizados neste trabalho, no conjunto dos pontos amostrais da área do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), município de Guapimirim, no estado do Rio de Janeiro .....	49
Tabela 5: Número absoluto de espécimes coletados no CPRJ por ponto amostral e por tipo de coleta, no período de um ano (dez/2018 a dez/2019). .....	55
Tabela 6: Riqueza, diversidade e equitabilidade dos espécimes de Culicídeos obtidos nas formas imatura e adulta no período de um ano, no entrono do CPRJ, por ponto de coleta. Os valores mais elevados estão destacados em negrito .....	58
Tabela 7: Distribuição das espécies coletadas através de quatro diferentes tipos de coletas, no entorno do CPRJ, por ponto amostral. As linhas sombreadas correspondem às espécies vetoras primárias e secundárias do YFV. ....	59
Tabela 8: Valores de similaridade de Sørensen (IS) entre o resultado da captura de mosquitos nos pontos (P1 a P12) no CPRJ. Os valores em negrito representam os pontos com as mais altas similaridades entre eles.....	61
Tabela 9: Número absoluto de espécimes capturados por mês de coleta .....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FAS	Febre amarela silvestre
Aa	Aminoácidos
AHPE	Atração humana protegida e esclarecida
BT	Barreira de transmissão
C	Proteína do capsídeo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO2	Dióxido de carbono
CPRJ	Centro de Primatologia do Rio de Janeiro
DENV	Dengue Vírus
DPI	Dia pós infecção
E	Proteína do envelope
EEEP	Estação Ecológica Estadual do Paraíso
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Febre Amarela
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
L15	Leibovitz 15
Mac – ELISA	Ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM
MEB	<i>Midgut escape barrier</i>
MIB	<i>midgut infection barrier</i>
mL	Mililitro
nM	Nanômetro
Nt	nucleotídeos
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PETP	Parque estadual dos Três Picos
PFU	Unidade formadora de placa (do inglês: <i>plaque-forming unit</i> )
PNHs	Primatas não humanos
prM	Proteína precursora de membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa (do inglês: <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> )
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase método quantitativo
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RH	Umidade Relativa (do inglês: <i>Relative humidity</i> )
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i> )
RPM	Rotação Por Minuto
RT	Transcriptase Reversa (do inglês: <i>Reverse transcriptase</i> )
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase – método quantitativo
SFB	Soro Fetal Bovino
SGEB	Barreira de Escape da glândula Salivar
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SYF	<i>Sylvatic yellow fever</i>

TD	Taxa de Disseminação
TI	Taxa de Infecção
TT	Taxa de Transmissão
ul	Microlitro
UNIFESO	Centro Universitário Serra dos Órgãos
VFA	Vírus da Febre Amarela
WHO	<i>World Health Organization</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
ZIKV	Zika vírus

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais sobre a febre amarela

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa aguda, febril, de gravidade variável, transmissível através de um inseto vetor, podendo durar de 2 a 4 dias nas formas leve e moderada. É uma doença de notificação compulsória, causada por um arbovírus, o vírus da febre amarela (YFV) <sup>(1)</sup>. Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes, tais como mosquitos, flebótomos, maruins e carrapatos <sup>(2)</sup>.

Uma parte dos indivíduos que se infecta com o vírus é assintomática e a maioria dos que adoecem melhora após os sintomas iniciais, que incluem: febre de início súbito, calafrios, dor de cabeça intensa, dores no corpo, náuseas, vômitos, fadiga e fraqueza. No entanto, cerca de 15% evoluem para a forma mais grave da doença, após apresentar um breve período, de algumas horas a um dia, sem sintomas <sup>(3)</sup>. Aproximadamente metade dos pacientes que evoluem para a forma grave, que se caracteriza clinicamente por manifestações de insuficiência hepática e renal, morre dentro de 7 a 10 dias <sup>(4)</sup>

O diagnóstico laboratorial do YFV, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é feito por dois modos: o diagnóstico virológico e o diagnóstico sorológico. O virológico se subdivide em diagnóstico molecular, isolamento viral e *post-mortem*. O molecular é geralmente útil nos primeiros cinco dias após o início dos sintomas (fase virêmica), com a extração do RNA e utilização nas técnicas moleculares (RT-PCR) convencional ou em tempo real <sup>(1)</sup>.

O isolamento viral pode ser feito por inoculação intracerebral em camundongos ou em cultura celular (célula Vero ou C6/36, de *Aedes albopictus*). Mas, pela sua complexidade, é pouco utilizado como metodologia para diagnóstico, sendo mais empregado em pesquisas, que serão complementares à vigilância em saúde pública. Já no *post-mortem*, o exame histopatológico com a técnica de imuno-histoquímica realizado em cortes de amostras do fígado é considerado um “método padrão ouro” para casos humanos fatais e também em macacos <sup>(5)</sup>.

O diagnóstico sorológico possibilita a detecção de anticorpos específicos e é útil para a fase pós-viremia da febre amarela. Um resultado IgM positivo por meio da técnica de ELISA, principalmente captura de IgM (Mac-ELISA) ou outro imunoensaio

(imunofluorescência indireta), de uma amostra coletada a partir do quinto dia do início dos sintomas é presuntivo de infecção recente pelo vírus <sup>(6)</sup>. A confirmação do caso de febre amarela mediante ELISA IgM dependerá da situação epidemiológica e do resultado do diagnóstico diferencial laboratorial. Em áreas em que circulam outros *Flavivirus* (principalmente DENV e ZIKV), a probabilidade de reação cruzada é maior. Outra técnica sorológica, como a detecção de IgG (ELISA) e, principalmente, de anticorpos neutralizantes, pela técnica de neutralização por redução de placas (PRNT), podem confirmar o diagnóstico. A detecção dos anticorpos IgG é útil com amostras pareadas do mesmo paciente (quando coletadas com pelo menos uma semana de diferença). O PRNT oferece maior especificidade, apesar do fato de reação cruzada já ter sido relatado nesta técnica <sup>(5)</sup>.

Apesar da existência de uma vacina eficaz, a febre amarela continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública mundial, tendo, atualmente, 47 países endêmicos ou que possuem regiões consideradas endêmicas, sendo 34 da África e 13 nas Américas Central e do Sul <sup>(4,7)</sup>.

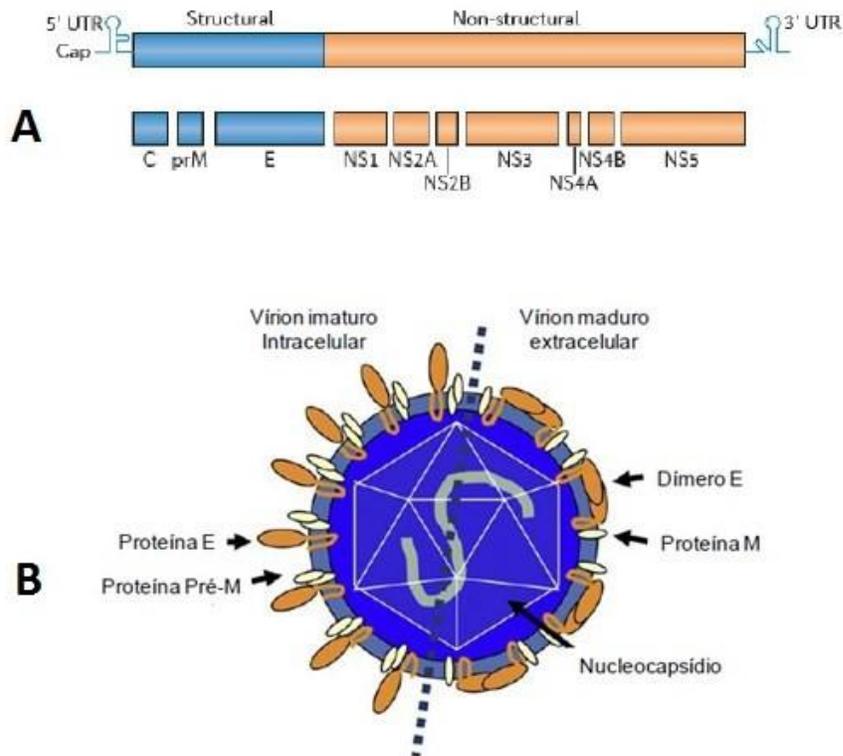
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o mundo passa atualmente por um período de maior risco de morte por FA. Em 2015-2016, Angola reportou a ressurgência da FA urbana, com uma grave epidemia que logo atingiu a República Democrática do Congo e provocou o aparecimento de casos importados em países distantes, como a China, revelando uma alarmantemente baixa cobertura vacinal em países endêmicos <sup>(8,9)</sup>. Quase simultaneamente, houve a reemergência da FA silvestre na região extra-Amazônica brasileira, que afetou áreas sem registro de circulação de vírus há mais de sete décadas, como áreas metropolitanas da região Sudeste do País, o que impactou na produção elevada de casos, ainda mais quando confrontada com a série histórica das últimas décadas. Foram notificados cerca de 14 mil casos humanos suspeitos e, destes, foram confirmados 2.259 (6,2%), registraram-se 773 óbitos, numa taxa de letalidade de 34,2% <sup>(10)</sup>.

Do ponto de vista epidemiológico, o que se verificou na epidemia recente brasileira é o que tradicionalmente se tem observado na história da doença no país e na América. A análise dos casos confirmados entre 2014 e 2019 mostra que maior parte dos casos são do sexo masculino, na faixa etária entre 21 a 65 anos (70,4%), geralmente associada à exposição em atividades de risco (extradomiciliar) e às áreas sem cobertura vacinal ou baixa cobertura vacinal. O mesmo perfil

epidemiológico foi observado nos óbitos confirmados. Também se tem observado que a letalidade maior na FA se dá em indivíduos de idade elevada <sup>(10)</sup>.

O YFV é de origem africana e pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, sendo o protótipo do gênero que também incluem outros arbovírus endêmicos e epidêmicos tais como o vírus dengue (DENV) e Zika (ZIKV). Os flavivírus são vírus esféricos de 40 a 60 nm de diâmetro de simetria icosaédrica, possui por capsídeo que contém uma única molécula de RNA de cadeia positiva, com cerca de 11 kb, circundados por um envelope viral derivado da célula hospedeira <sup>(11-13)</sup>. O genoma viral codifica uma poliproteína precursora de 3.411 aminoácidos, que é codificada por uma única fase de leitura aberta de 10.233 nt, sendo flanqueada por duas regiões não codificantes de tamanho variável, sendo uma grande, 3'NCR com 500 nucleotídeos, e uma pequena, 5'NCR que possui 118 nucleotídeos. O RNA viral expressa sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1), que são responsáveis pelas atividades reguladoras e da expressão do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade e três proteínas estruturais (C – capsídeo, prM – pré-membrana e E – envelope), que são incluídas na montagem do vírion e codificam a formação da estrutura básica da partícula viral <sup>(13-17)</sup>.

O processo de replicação do YFV se dá após a fusão do seu envelope com a membrana celular, mediada por uma maquinaria de fusão mais rápida e mais eficaz dentre todos os vírus envelopados demonstrados em estudos até o presente momento <sup>(18)</sup>. A entrada do vírus na célula tem início com a interação da proteína E (envelope viral) com receptores específicos na superfície celular. Esta interação promove a internalização da partícula viral através da endocitose, formando compartimentos endolíticos pré-lisossomais, onde o pH ácido induz a uma dissociação dos dímeros da proteína E em monômeros, os quais se reassociam em trímeros. Esta conformação, permite a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e, devido à natureza fluida do nucleocapsídeo, o genoma viral é rapidamente acessado para tradução <sup>(19)</sup>.



**Figura 1:** A) Representação esquemática da poliproteína do YFV. Três proteínas virais estruturais, C, capsídeo; prM, precursor da proteína de membrana; E, envelope; e as sete proteínas não-estruturais. Fonte: Adaptado de Beck et al. 2013. B) Partícula viral esquematizada mostrando a estrutura básica do vírus. Fonte: Adaptado de Gardner & Ryman, 2010

A tradução ocorre de maneira que o cap-dependente se inicia por escaneamento do ribossomo até o primeiro AUG, gerando com isso a poliproteína. Na região carboxi-terminal do capsídeo podemos encontrar um peptídeo sinal que direciona a translocação da proteína E para o lúmen do Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER), onde ocorre uma clivagem proteolítica para a maturação/formação/individualização da proteína e a sua posterior glicosilação. Ao final dessa maturação, as proteínas estruturais permanecem associadas à membrana do RER, com o capsídeo no lado citoplasmático e a prM-E no lado do lúmen. As proteínas prM-E permanecem associadas como heterodímeros e ligam-se à membrana reticular através de âncoras trans-membranas. As demais proteínas não-estruturais iniciam a replicação do RNA viral. Através desse processo, o RNA de polaridade positiva é transcrito em um RNA de polaridade negativa, o qual serve de molde para a síntese de várias moléculas de polaridade positiva. As novas fitas de RNA interagem com as proteínas do capsídeo, retidas no RER, formando novos

nucleocapsídeos, que se internalizam no RER, dando origem aos vírions que estão imaturos e não-infecciosos <sup>(19,20)</sup>.

Os vírions originados da replicação são, então, transportados, através de vias secretórias, até a superfície da célula. O último estágio da maturação viral está associado ao processamento da prM e da proteína C, bem como à glicosilação das proteínas E e prM em um mecanismo semelhante ao da glicosilação das proteínas celulares. Finalizando-se este processo, as partículas virais maduras serão liberadas por exocitose <sup>(20)</sup>.

Até o momento foram identificados sete genótipos no YFV: cinco na África e duas nas Américas. Entretanto, existem polimorfismos nos genomas dos genótipos do vírus da febre amarela. <sup>(13,21)</sup>. Na África há dois genótipos no Oeste (Oeste africano I e II) e três do Leste e Centro-africano, denominados Leste Africano, Centro-leste Africano e Angola, e há dois genótipos nas Américas, denominados Sul Americano I e II <sup>(22,23)</sup>. Não se sabe se um genótipo é mais patogênico do que o outro <sup>(24)</sup>. Pesquisas utilizando ferramentas moleculares conseguiram indicar que os YFV das Américas apresentam uma sequência repetitiva do genoma que não ocorre nas amostras africanas, o que minimizou a polêmica quanto a origem, africana do vírus <sup>(13)</sup>. Verificou-se também que os isolados do YFV do oeste da África estão mais próximos filogeneticamente aos das Américas, que por sua vez são mais distantes daquelas do leste da África. Este padrão filogenético é compatível com a hipótese do surgimento do YFV na África, mais provavelmente no leste do continente, que teria se dispersado para África Ocidental, e daí para as Américas durante o tráfico de escravos e, em seguida, para o oeste das Américas <sup>(23)</sup>.

No Brasil, o genótipo mais frequentemente identificado do YFV é o Sul-americano I <sup>(25,26)</sup>. Em análises filogenéticas de isolados de YFV dos últimos 70 anos no Brasil, foram identificadas distintas linhagens, denominadas 1A a 1E, que se sucedem no tempo e espaço <sup>(25)</sup>. A linhagem do vírus pertencente ao genótipo Sul-Americano I denominada 1D foi responsável por epizootias e casos humanos entre 1998 a 2001. Após esse período, nos anos 2000, foi substituída por uma nova linhagem viral, chamada 1E, que causou morte maciça de bugios (*Alouatta caraya*) e casos humano no Sul do Brasil, em áreas que eram consideradas livres de febre amarela há décadas <sup>(27)</sup>. Análises moleculares recentes revelaram a existência de polimorfismos no genoma do vírus circulante no Sudeste do Brasil durante a

epidemia de 2016-2017, sugerindo a provável existência de uma sub-linhagem emergida na linhagem 1E <sup>(28)</sup>.

## 1.2 A vacina 17DD

O vírus da febre amarela foi isolado pela primeira vez em 1927, a partir de uma amostra de sangue de um jovem africano, de nome Asibi, que apresentou a forma moderada da doença. Após 176 passagens alternadas do vírus selvagem da cepa Asibi em tecidos de camundongo e embrião de galinha houve a perda do vicerotropismo e competência vetorial, ou seja, perda da capacidade do vírus ser transmitido pelo vetor <sup>(29)</sup>, sem comprometimento da sua capacidade em induzir resposta imune protetora em macacos e humanos, desenvolvendo a cepa atenuada YF17D. Várias linhagens derivadas da cepa 17D foram testadas para se alcançar um nível de atenuação com manutenção da imunogenicidade <sup>(30)</sup>.

Na França, o vírus YFV foi isolado de um homem que foi acometido pela doença no Senegal e atenuado após 128 passagens em cérebros de camundongos. Essa cepa passou a ser conhecida como a “cepa francesa” e resultou na vacina YF neurotrópica francesa <sup>(31)</sup> que foi utilizada na redução da prevalência da doença nos países africanos de língua francesa, em 1960. Devido à ocorrência elevada de casos de encefalite após ser ministrada a vacinação com a cepa francesa, o uso dessa vacina foi abandonado em 1982. A vacina de vírus atenuado 17D é a usada atualmente no mundo <sup>(31,32)</sup>.

Na década de 1940, foi implementado um sistema de lotes-sementes e também o controle das sub-cepas vacinais para evitar alterações indesejáveis nas propriedades biológicas da vacina com o vírus 17D <sup>(33)</sup>.

A cepa vacinal YFV-17D e a cepa selvagem Asibi diferem entre si em 68 de 10.862 nucleotídeos (nt) (aproximadamente 0,63%), que resulta em 32 aminoácidos (aa) diferentes. O gene que codifica a proteína E é a região na qual existe o maior número de mutações, correspondendo a 11 nt e oito aminoácidos diferentes <sup>(34)</sup>. Baseado na associação da proteína E com a penetração do vírus na célula hospedeira, acredita-se que mutações nessa proteína possam ser responsáveis pela alteração de tropismo viral e, conseqüentemente, da virulência. Na região 3'-UTR, as mutações podem estar envolvidas na atenuação <sup>(35-37)</sup>. As duas sub-cepas vacinais que são usadas atualmente, 17D-204 e 17DD correspondem às passagens 235-240

e 287-289, respectivamente, do vírus selvagem Asibi. Não há diferença na região 5'-terminal e, no gene do capsídeo, no entanto, quatro substituições de ntestão localizadas na extremidade 3'-UTR, sendo que as outras substituições de aminoácidos estão distribuídas no restante do genoma viral <sup>(38)</sup>. Embora possam apresentar diferenças em nível molecular, estudos envolvendo diferentes sub-cepas vacinais do YFV-17D mostraram que não há diferenças na imunogenicidade entre elas <sup>(39,40)</sup>.

A cepa vacinal utilizada atualmente no Brasil é a 17DD, que compartilha 99,9% de identidade e sequência de ácido nucleico com a 17D-204 <sup>(30,42,43,44)</sup>. A vacinação contra a febre amarela gera altos níveis de proteção, com soroconversão maior que 95% em crianças e adultos e duração da imunidade podendo superar 10 anos. Em humanos que recebem a primeira dose da vacina, a viremia (leve) ocorre de 3 a 7 dias após a imunização e com pico geralmente nos primeiros 3 dias <sup>(45)</sup>, enquanto em macacos rhesus, o pico de viremia ocorre 4 a 6 dias após a imunização com dose humana do YFV 17DD <sup>(41,46)</sup>. A vacinação induz uma viremia relativamente baixa que diminui após 4 a 7 dias. Simultaneamente, desenvolve-se uma resposta do tipo IgM que não poderá ser diferenciada para a resposta de IgM induzida por uma infecção natural. Aproximadamente 10 dias após a vacinação, a pessoa é considerada protegida contra uma infecção natural. Assim, a resposta vacinal IgM pode ser detectada a partir do quinto dia em diante, com um pico ocorrendo geralmente duas semanas após a vacinação. Posteriormente, os níveis desses anticorpos tendem a diminuir <sup>(47)</sup>.

A vacina contra a febre amarela é indicada para pessoas entre nove meses e 60 anos que residem em áreas de risco e para pessoas que residem em áreas urbanas e vão viajar para regiões de risco. No caso de pessoas com mais de 60 anos que nunca foram vacinadas, o médico deve levar em conta os riscos da vacinação, que incluem o risco de eventos adversos nessa faixa etária ou decorrentes de comorbidades <sup>(48)</sup>.

### **1.3 Ciclos de transmissão da febre amarela**

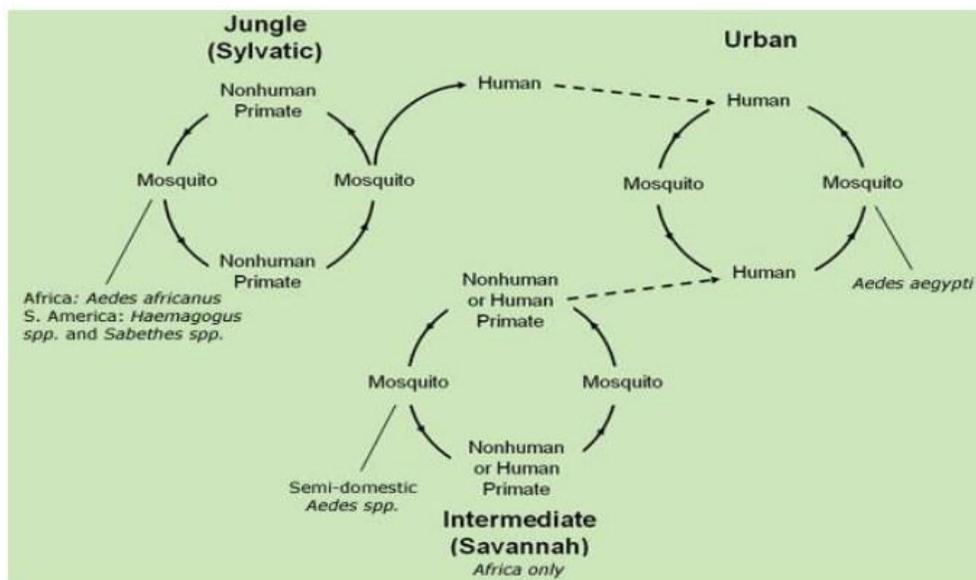
A febre amarela é transmitida pela picada infectante de mosquitos. Possui dois principais padrões epidemiológicos distintos, porém idênticos do ponto de vista clínico, etiológico, imunológico e fisiológico: os ciclos urbano e silvestre. As

diferenças entre os ciclos referem-se aos elementos que formam o cenário de transmissão, ou seja, a localização geográfica, espécies vetoras e tipos de hospedeiros (49-51).

No ciclo urbano, o humano virêmico é a fonte da infecção dos mosquitos, não havendo participação de animais na manutenção da circulação viral. O vírus é transmitido através da fêmea do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) infectada pelo YFV, vetor primário implicado neste ciclo, tanto na América do Sul quanto na África. No entanto, desde 1942 não há relatos de FA urbana no Brasil e foram raros os eventos de transmissão considerada urbana, ou seja, por *Ae. aegypti*, nos demais países endêmicos sul americanos nas últimas décadas (49,51,52).

Já no ciclo silvestre, a transmissão ocorre entre primatas não humanos (PNHs) e mosquitos silvestres que voam sobretudo nas copas das árvores. Na América do Sul, as principais espécies transmissoras no ciclo silvestre são mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* e, na África, várias espécies do gênero *Aedes*, como *Ae.(Stegomyia) africanus* (Theobald, 1901) *Ae.(Stegomyia)simpsoni* (Theobald 1905), *Ae.(Diceromyia) furcifer* (Edwards,1913) e *Ae.(Diceromyia) taylori* (Edwards 1936). Neste ciclo, o homem não vacinado pode se infectar, acidentalmente, ao entrar na floresta, aproximar-se da franja da mata ou residir perto dessas áreas, em regiões enzoóticas, sendo este o único cenário epidemiológico de ocorrência atualmente nas Américas (32,49,53). Tanto na África quanto nas Américas, os casos humanos ocorrem geralmente em momentos de aumento da circulação viral na mata, ou seja, durante epizootias em PNHs, quando aumentam as chances de mosquitos se infectarem nesses vertebrados virêmicos e, conseqüentemente, a taxa de mosquitos infectados que, acidentalmente, podem picar humanos (24).

Na África, há ainda a ocorrência de um ciclo intermediário de transmissão. Este ciclo ocorre em savanas úmidas ou semi-úmidas, atingindo a população humana que reside ou trabalha em áreas ao redor de florestas, envolvendo espécies de mosquitos que se alimentam tanto em primatas quanto em humanos, especialmente no peridomicílio, como *Aedes simpsonii* (Figura 2) (50,54,55).



**Figura 2:** Ciclos de transmissão da febre amarela: silvestre, urbano e intermediário. (Fonte: CDC)

#### 1.4 Primatas não humanos (PNHs) e febre amarela

Em todo o mundo existem mais de 370 espécies descritas de PNHs <sup>(56)</sup>. Os PNHs são separados em dois grandes grupos: os macacos do Velho Mundo (Catarrhini), distribuídos nos continentes Africano e Asiático, e os macacos do Novo Mundo (Platyrrhini), que estão distribuídos no continente Americano, do México à Argentina, e também são denominados primatas neotropicais <sup>(57)</sup>. Tanto na África quanto na América do Sul, os hospedeiros silvestres do YFV são PNHs.

Diversos trabalhos têm mostrado a participação de diferentes macacos no ciclo natural de transmissão da FA. Os macacos africanos diferem dos americanos, por serem suscetíveis ao vírus e produzirem viremia, mas sem apresentarem sinais clínicos de infecção. O gênero *Colobus* Illiger 1811, é o principal gênero de PNH na África Oriental e Central, enquanto que aqueles do gênero *Cercopithecus* Linnaeus, 1758, são os principais hospedeiros vertebrados em áreas de florestas e savanas <sup>(58)</sup>. O Brasil destaca-se por possuir a maior biodiversidade de primatas do mundo, com 69 espécies endêmicas, das 110 conhecidas atualmente no país. Todos os gêneros de PNHs do Novo Mundo são susceptíveis ao vírus da febre amarela, sendo exclusivamente arborícolas. De acordo com o gênero, podem habitar estratos arbóreos distintos nos quais a atividade hematofágica dos diferentes vetores primários ou secundários é também feita distintamente <sup>(59)</sup>.

Os PNHs podem desenvolver doença indistinguível da dos humanos quanto à sua forma clínica <sup>(60)</sup>. O espectro clínico da doença pode variar de formas assintomáticas e leves, até uma doença de início súbito, febril inespecífica, que pode evoluir para formas severas <sup>(13)</sup>. Nos humanos a letalidade varia entre 20% e 50% dos casos que cursam com icterícia e hemorragia. A diferença nos primatas é que a evolução é mais rápida, com a morte do animal em até uma semana <sup>(61)</sup>.

Os gêneros de PNHs que mais têm sido associados com a ocorrência de epizootias do YFV no Brasil são *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix* <sup>(49,62)</sup>. Macacos e saguis brasileiros geralmente produzem altas viremias nos seis primeiros dias de infecção. Nessa situação, passam a funcionar como hospedeiros amplificadores e servindo de fonte de infecção para mosquitos vetores. Ao se deslocarem virêmicos, passam a disseminar o vírus dentro da floresta (ou de uma para outra). Após a infecção, os animais recuperados adquirem imunidade ao longo da vida <sup>(63,64,65)</sup>. Ao contrário, os mosquitos susceptíveis mantêm-se infectados por toda a vida (cerca de 30 dias) <sup>(27)</sup>. Na região Amazônica, a cada 8 a 10 anos, a circulação do vírus se manifesta por epizootias, renovando a população de PNHs suscetíveis e deixando para trás alguns sobreviventes imunes ao vírus <sup>(66)</sup>.

O mico-leão-dourado é um primata que está ameaçado de extinção, e que pertence a região da mata Atlântica (endêmico da região) do Rio de Janeiro, Brasil. Por causa da caça, a espécie teve a população bastante reduzida no passado. Projetos de reintrodução da espécie e de criação de áreas de proteção, como no Poço das Antas, Silva Jardim, RJ, resultaram num aumento da população. Mas, tem-se observado reduções recentes: em 2014, eram 3.700, mas em 2018, após a realização de um censo, verificou-se que eram 2.516 indivíduos, uma queda de 32%. Coincidentemente, em maio de 2018, houve a primeira morte de um mico-leão-dourado selvagem por causa da febre amarela nas últimas décadas. Com esse acontecimento, foi realizada uma nova contagem na reserva de Poço das Antas, verificando-se uma perda significativa desses micos no interior do fragmento maior da floresta que nas bordas da floresta, resultado, possivelmente, de diferença na composição da fauna de vetores entre os ambientes. Espera-se que parte dos sobreviventes tenha adquirido imunidade natural. Mas, estratégias de imunização foram propostas para evitar maiores perdas nas populações de micos-leões-dourados em sua maior área de conservação <sup>(67)</sup>. Com efeito, epizootias em PNHs foram detectadas no município vizinho (Casimiro de Abreu), em 2019, mostrando

que o YFV pode se manter na floresta Atlântica por seguidas estações de transmissão, sem a necessidade de uma nova introdução <sup>(68)</sup>.

## 1.5 Biologia dos mosquitos

Os mosquitos são insetos dípteros, pertencentes à família Culicidae, sendo as espécies agrupadas em duas subfamílias: *Anophelinae*, com apenas três gêneros; e *Culicinae*, composta por 110 gêneros, segregados em 11 tribos <sup>(69)</sup>. Atualmente são conhecidas 3.570 espécies, pertencentes à família *Culicidae*, distribuídas em todo o globo. Destas, cerca de 500 ocorrem no Brasil, algumas consideradas antrópicas e pouco mais de 20 têm importância na transmissão de patógenos causadores de doenças em humanos e animais, que incluem vírus (arbovírus), helmintos e protozoários <sup>(70)</sup>. Assim, os vetores dos protozoários causadores das malárias dos primatas humanos ou não humanos são do gênero *Anopheles*, ao passo que o vetor primário da filariose bancroftiana é do gênero *Culex*. Gêneros de grande importância na transmissão de arbovírus patogênicos ao homem, inclusive o vírus da febre amarela, pertencem à subfamília Culicinae, como os *Aedes*, *Culex*, *Haemagogus* e *Sabethes* <sup>(63,69,70)</sup>.

Os culicídeos são insetos holometábolos, ou seja, possuem metamorfose completa, passando pelos estágios de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adultos alados. As fases imaturas são aquáticas, vivendo em água estagnada ou com baixo fluxo. As larvas se alimentam de detritos orgânicos de forma ativa <sup>(63,71)</sup>. Os quatro estádios larvais não têm a mesma duração, embora seja um crescimento contínuo, considerando-se o conjunto deles. A faixa de temperatura favorável situa-se entre 20 e 30°C, porém pode-se notar diferenças variáveis de acordo com a espécie <sup>(71)</sup>. Mesmo dentro de uma mesma espécie, a densidade larval, a quantidade de nutrientes na água e a temperatura influenciam a duração do estágio larval. Aspupas também são aquáticas e móveis, porém, ao contrário das larvas, não se alimentam, pois estão em intensa atividade de divisão celular para formar o corpo do animal adulto que está prestes a emergir <sup>(63,71,72)</sup>. As pupas masculinas são menores que as femininas e, normalmente, os alados masculinos emergem antes <sup>(71)</sup>. Embora a alimentação na fase adulta possa ser estritamente de seiva vegetal, as fêmeas da grande maioria das espécies de mosquitos necessitam ainda da alimentação sanguínea para o desenvolvimento dos ovários e a maturação dos ovos, além de

também contribuir para a longevidade das fêmeas. Entretanto, em algumas espécies hematófagas podem ocorrer indivíduos capazes de produzir desovas não precedidas por ingestão de sangue, fenômeno este chamado de autogenia <sup>(63)</sup>.

Após a emergência, os adultos procuram locais sombrios, úmidos e protegidos de vento, chamados abrigos, e logo se dá a cópula. As fêmeas de mosquitos possuem espermatecas, onde os espermatozoides são armazenados e utilizados para a fecundação dos óvulos a cada postura. Uma única cópula pode manter uma fêmea de mosquito fértil por toda a vida. Após a cópula, geralmente aumenta a voracidade por sangue <sup>(63, 71)</sup>. Normalmente, é necessário que a fêmea esteja totalmente ingurgitada para que ocorra a maturação dos ovos. O período que compreende a alimentação sanguínea completa e a postura dos ovos, denominado ciclo gonotrófico, pode variar entre espécies, populações ou indivíduos <sup>(61,73)</sup>. No entanto, para algumas espécies de mosquitos pode ser necessário mais de um repasto sanguíneo, que pode ocorrer após dois ou três dias após a primeira alimentação, para enfim produzir a primeira desova. Este fenômeno, denominado discordância gonotrófica, bastante comum em fêmeas de *Ae. aegypti*, por exemplo, tem grande importância epidemiológica, visto que fêmeas com essa característica geralmente realizam múltiplas alimentações sanguíneas, que podem ocorrer em um mesmo hospedeiro ou não, aumentando as chances da transmissão de patógenos, como os arbovírus <sup>(73)</sup>.

A atração das fêmeas hematófagas faz-se através da combinação de vários estímulos, que possibilitam direcioná-la ao hospedeiro ao qual servirá de fonte sanguínea, como a visão (silhueta), temperatura corporal, presença de CO<sub>2</sub> e umidade, provenientes da respiração e ácido láctico, liberado no suor <sup>(70,71,73)</sup>. Indivíduos febris, podendo estarem em momento de viremia, podem ser bastante atrativos para insetos vetores hematófagos. As fêmeas pousam sobre o hospedeiro vertebrado e selecionam o local da picada por meio de órgãos sensoriais, podendo, neste momento, ocorrer uma possível contaminação, uma vez que a saliva do mosquito é inoculada no hospedeiro durante a picada. <sup>(63,75,76)</sup>.

Além do rastreamento ativo na procura por fontes sanguíneas, os mosquitos utilizam ainda a estratégia de esperar pelo hospedeiro em locais frequentados por ele. Embora fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) utilizem outros animais como fonte de alimentação sanguínea, os humanos são os mais procurados, principalmente pelo *Ae. aegypti*, espécie fortemente doméstica e

antropofílica, que encontra no domicílio humano suas fontes preferidas de sangue e locais para abrigo e criação. Por este motivo, não se dispersam muito, deslocam-se de um imóvel ao outro para realizar a postura, espalhando seus ovos em diferentes criadouros <sup>(71,73,76)</sup>. *Ae. albopictus*, no entanto, possui menor grau de sinantropia, realizando o repasto sanguíneo e criando-se preferencialmente no peridomicílio doméstico <sup>(71,76)</sup>.

A disponibilidade de fonte alimentar, a preferência por certas condições microclimáticas e altitudes arbóreas dos mosquitos silvestres para os exercícios de suas atividades, influenciam a frequência destes nos ambientes naturais, assim como a sua distribuição vertical. Há espécies, chamadas acrodendrófilas, que preferem picar nos níveis mais elevados das florestas, embora ataquem também nos estratos mais baixos, junto ao solo. Estas são de grande importância epidemiológica, uma vez que essa flutuação entre os estratos das florestas possibilita a transmissão de patógenos ao homem. Espécies que possuem preferência pelos animais como fonte alimentar, são denominados zoofílicas <sup>(71,73,76)</sup>.

Em relação à preferência horária para a realização da hematofagia, mosquitos são classificados em diurnos, noturnos e crepusculares. Entretanto, há sempre os oportunistas, que podem picar a vítima mesmo fora do horário de sua preferência, caso a mesma se aproxime de seu abrigo <sup>(76)</sup>. Quanto ao comportamento das fêmeas em relação ao hospedeiro, espécies mais “tímidas” abordam os hospedeiros nas horas em que estes se encontram em situações com pouca possibilidade de reagir, por exemplo, durante o sono, exibindo atividade noturna, como espécies do gênero *Anopheles* (Meigen 1818) e *Culex* (Linnaeus, 1758). Há ainda os “tímidos” que preferem abordar durante o dia, geralmente em horário em que a temperatura ambiente é elevada e suas vítimas encontram-se em repouso ou até dormindo, como certos *Sabethes* que picam macacos nas copas das árvores <sup>(71)</sup>. Os mosquitos mais agressivos, por outro lado, podem se alimentar em hospedeiros mais ativos e adquiriram a capacidade de escapar das investidas dos mesmos, como, por exemplo, mosquitos do gênero *Aedes* (Meigen 1818), *Haemagogus* e *Psorophora* (Robineau-Desvoidy, 1827) <sup>(71,76)</sup>.

O Brasil é o país com a maior diversidade de espécies do mundo, abrigando mais de 20% do total de espécies do planeta <sup>(77)</sup>. Com relação à biodiversidade brasileira, a Mata Atlântica, por exemplo, é classificada como um dos cinco pontos com alta endemidade e diversidade de fauna e flora do planeta <sup>(78)</sup>. Este bioma

apresenta formações florestais, restingas, manguezais e campos de altitude que tomam 17 estados do Brasil. Devido a sua grande extensão, a Mata Atlântica possui climas diferentes, de acordo com cada região, havendo, assim, no mesmo bioma, regiões úmidas o ano todo e locais com estações secas e chuvosas mais demarcadas (79-81).

A ocorrência das espécies está condicionada a fatores como a heterogeneidade estrutural do Bioma, na qual a maior diversificação de recursos no habitat permite a coexistência de um maior número de espécies, além de minimizar o efeito da competição e, conseqüentemente, aumentar a biodiversidade local. A diversidade de espécie refere-se à variedade de espécies de organismos vivos de uma determinada comunidade, habitat ou região, sendo assim, não está correlacionada à densidade de indivíduos na população, mas sim ao conjunto de espécies e o seu número de representantes. A variação de espécies existentes entre comunidades, pode ser representada e quantificada de diversas maneiras, sendo a mais comum delas através dos índices de diversidade (82,83).

A distribuição das espécies de mosquitos numa dada região está relacionada, principalmente, à escolha do local de oviposição, o qual é fortemente influenciado por fatores climáticos e ambientais, tais como umidade, temperatura, luminosidade, tipo de vegetação, e disponibilidade de criadouros. Além disso, a capacidade dos ovos de algumas espécies de culicídeos de suportar um período fora da água sem eclodir (diapausa facultativa) ocorre naturalmente em espécies que depositam seus ovos fora da água. Esta condição, que pode ser influenciada por fatores extrínsecos, permite que essas espécies suportem períodos de seca, viabilizando sua próxima geração. O contato com a água parece ser o principal fator capaz de interromper a diapausa. Porém, há outros estímulos, como a variação de temperatura, presença de microorganismos e agitação da água (63).

## **1.6 Principais vetores da febre amarela no Brasil**

### **1.6.1 Vetor Urbano**

No Brasil, *Aedes aegypti* (Figura 3) foi o único vetor reconhecido na transmissão da febre amarela no ciclo urbano, tendo esta modalidade sido eliminada em do país 1942 (43). Embora originário do Velho Mundo, provavelmente na região Etiópica, e descrito no Egito, hoje é considerado um mosquito cosmopolita, com

distribuição em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Esta espécie foi introduzida no Brasil durante o período colonial, provavelmente trazida pelos navios negreiros que realizavam o tráfico de escravos entre o continente africano e o Novo Mundo <sup>(63)</sup>. Grandes campanhas no combate ao *Ae. aegypti* foram montadas desde o início do século XX, mas foi em 1942 que se iniciou oficialmente a campanha visando a erradicação do mosquito no país, com êxito na erradicação do vetor em 1955 <sup>(43,63)</sup>. A reinvasão do *Ae. aegypti* no Brasil em 1967, deu-se, provavelmente, pelo fato de os países vizinhos não o terem erradicado, aliado ao relaxamento no combate ao vetor no país <sup>(63,84)</sup>. O risco do ressurgimento da transmissão urbana da doença deve-se a múltiplos fatores relacionados a esta espécie, que o tornam um excelente vetor no ambiente urbano, como a sua elevada endofilia, antropofilia e susceptibilidade ao vírus da febre amarela (YFV)<sup>(63,76,85)</sup>. É extremamente abundante em áreas urbanas e suburbanas, onde a concentração populacional humana é alta e a cobertura vegetal é moderada ou rara <sup>(86)</sup>.



**Figura 3:** Fêmea de *Aedes aegypti* no momento da realização do repasto sanguíneo. Foto: Genilton Vieira/IOC

A alimentação sanguínea das fêmeas de *Ae. aegypti* ocorre essencialmente durante o dia, intensificando-se nas primeiras horas do dia e no fim da tarde. A maior parte dos animais vertebrados pode servir como fonte de repasto, mas os humanos são a principal fonte sanguínea desta espécie. Mostra, portanto marcada antropofilia, picando o homem preferencialmente nos pés e nas partes inferiores das

pernas. A fêmea, quando perturbada durante o repasto sanguíneo, abandona o hospedeiro, podendo voltar a atacar o mesmo ou outra pessoa até que fique completamente ingurgitada. Assim, uma fêmea infectada pode ter várias alimentações sanguíneas em diferentes hospedeiros, comportamento este de grande importância epidemiológica na transmissão de arbovírus <sup>(63,87,88), 34)</sup>. As fêmeas grávidas podem dispersar seus ovos em vários sítios de oviposição durante um único ciclo gonodotrófico. Isto ocorre devido à sua frequente discordância gonotrófica, ou seja, uma mesma fêmea realiza mais de um repasto sanguíneo antes de se completar este ciclo, possibilitando o aumento do seu potencial na transmissão de arbovírus <sup>(63)</sup>.

As fêmeas de *Ae. aegypti* depositam seus ovos preferencialmente em recipientes artificiais a céu aberto ou dentro das casas, contendo água limpa, de pobre à moderada quantidade de matéria orgânica em decomposição, sombreadose de fundo ou lateral escura. Em condições favoráveis de umidade, luminosidade e temperatura, o desenvolvimento embrionário ocorre 48 horas após a postura dos ovos e, após esse período inicial de maturação em ambiente úmido, os ovos são capazes de resistir em ambientes secos, podendo permanecer viáveis por vários meses de dessecação <sup>(63)</sup>, havendo registros de até 450 dias <sup>(89)</sup>. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto em longas distâncias <sup>(88)</sup>. Os ovos eclodem poucos minutos após serem submersos na água e o desenvolvimento larval completo pode se dar em apenas uma semana caso as condições de temperatura, a quantidade de nutrientes e a densidade populacional no criadouro sejam favoráveis. A fase pupal leva geralmente dois dias de duração e a mortalidade é muito baixa nesse período. Após a emergência da pupa, machos e fêmeas procuram se abrigar dentro das casas no peri-domicílio. As fêmeas passam a sugar sangue com cerca de três dias após a emergência <sup>(63,71)</sup>.

A maior densidade populacional de *Ae. aegypti* está relacionada ao período chuvoso, devido ao aumento de recipientes com acúmulo de água no peridomicílio. Contudo, é possível que haja a manutenção da população em considerável densidade em períodos de estiagem, devido à oferta elevada de criadouros dentro das casas, como depósitos de água para consumo destampados, à oviposição diretamente na superfície da água e a rápida capacidade de eclosão destes ovos

<sup>(63,72)</sup>,

### 1.6.2 Vetores Silvestres

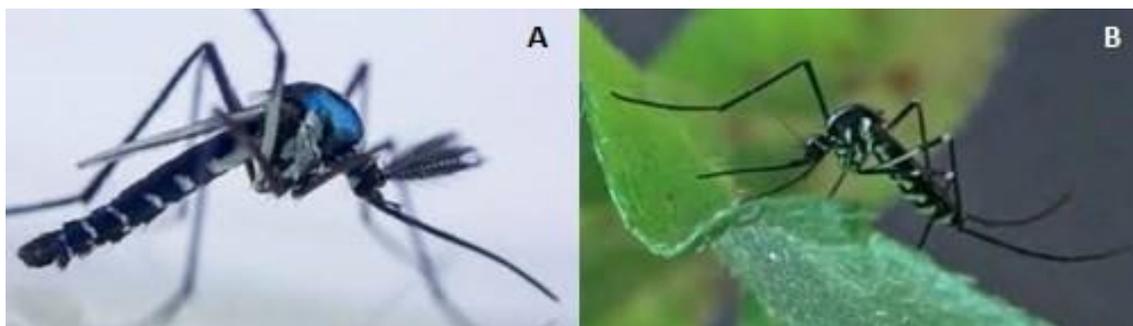
Membros dos gêneros *Haemagogus* (Williston, 1896) e *Sabethes* são os vetores biológicos mais importantes envolvidos na transmissão da febre amarela nas áreas florestadas das Américas <sup>(63,90)</sup>.

O gênero *Haemagogus* pertence à tribo Aedini, a mesma dos *Aedes*. *Haemagogus* desempenha um papel primordial na transmissão da febre amarela silvestre nas Américas Central e do Sul <sup>(90)</sup> devido, principalmente, ao seu hábito primatófilico, que facilita seu contato com PNHs infectados com o YFV <sup>(91)</sup>. *Haemagogus* é um gênero restrito ao Novo Mundo e quase todas as espécies são neotropicais. São mosquitos essencialmente silvestres, diurnos e acrodentrófilos. Colocam seus ovos em criadouros naturais, contendo substratos úmidos, como buracos ou ocos de árvores e, com menor frequência, em cascas de frutas e internódios de bambu <sup>(63)</sup>. Em condições de laboratório, o ciclo imaturo dos *Haemagogus* tem duração de 7 a 10 dias e o adulto em cerca de três meses <sup>(63,85)</sup>.

Os ovos das espécies de *Haemagogus* podem resistir à dessecação por até um ano. <sup>(92)</sup> A diapausa dos ovos dos Aedini geralmente termina após o primeiro contato com a água. Porém pode ocorrer, como é o caso de alguns *Haemagogus spp.*, a necessidade de mais de uma imersão para a eclosão dos ovos de uma mesma desova, ou seja, os ovos eclodem em parcelas, a partir de múltiplas imersões na água <sup>(93,94)</sup>. Entretanto, os efeitos dessas múltiplas imersões diferem entre *Hg. janthinomys* e *Hg. leucocelaenus*. Este último costuma ter uma maior porcentagem de eclosão de um mesmo lote de ovos já na primeira imersão, e o restante eclodindo parceladamente nas imersões seguintes, até em torno da 13ª. Enquanto que para *Hg. janthinomys* a taxa de eclosão dos ovos é mais alta entre a 11ª e 26ª imersão. Tal comportamento pode ser considerado uma estratégia de sobrevivência a longo prazo, principalmente de espécies que depositam seus ovos em locais sujeitos a diversas alterações em seus níveis de água <sup>(94)</sup>.

Considerado o vetor primário da febre amarela silvestre no Brasil, *Hg. janthinomys* Dyar, 1921 (Figura 4) foi várias vezes encontrado infectado naturalmente com o YFV no país, sendo sua distribuição geográfica coincidente com a área de maior endemicidade desta arbovirose <sup>(63,91,95,96)</sup>. Podem se deslocar por até 11 km e são raramente encontrados em habitações humanas ou peridomicílio, tendo assim, a sua importância epidemiológica na transmissão da FA em ambientes florestais <sup>(63,92)</sup>. São diurnos, com atividade hematofágica tendo pico entre 12h e 15h.

Embora sejam acrodendrófilos, podem realizar o repasto sanguíneo ao nível do solo. Contudo, esse padrão de comportamento pode variar em diferentes regiões e épocas. Na Guiana Francesa, por exemplo, foi observado que a atividade ao nível do solo pode ocorrer em vários momentos ao longo do ano <sup>(90,97,98)</sup>.



**Figura 4:** Macho de *Haemagogus janthinomys*. (A) e fêmea de *Haemagogus leucocelaenus* (B). Foto: Josué Damacena e Genilton Vieira (Instituto Oswaldo Cruz).

*Haemagogus capricornii* Lutz, 1904 morfologicamente por muito tempo confundido com *Hg. janthinomys*, é importante vetor da FAS no sudeste do Brasil. As fêmeas dessas espécies são indistinguíveis morfologicamente e, por isso, é comum que os dados de biologia e relatos de infecção natural refiram a essa espécie como *Hg. janthinomys/Hg. capricornii*. Genuinamente brasileiro, *Haemagogus capricornii* é encontrado nas matas, em áreas menos úmidas e de clima mais ameno do Sudeste brasileiro. Pouco se sabe sobre sua biologia. Entretanto, parece ter hábitos semelhantes às outras espécies co-genéricas <sup>(63)</sup>.

Assim como *Hg. janthinomys*, *Hg. leucocelaenus* (Dyar & Shannon 1924) (Figura 4) tem sido encontrado naturalmente infectado com o YFV <sup>(13,91,96,99,100)</sup>. Como os demais membros deste gênero, a espécie *Hg. leucocelaenus* possui atividade diurna, hábito acrodendrófilo e cria-se em buracos de árvore, com a abundância relacionada à variação sazonal, sendo menor nas estações secas. As fêmeas possuem boa capacidade de vôo (até quase 6 km), inclusive em áreas parcialmente desmatadas, e atacam o hospedeiro com certa agressividade, mesmo no solo <sup>(63)</sup>. Embora tenha atividade em todo o período diurno, em áreas de ocorrência da FA, no noroeste do Rio Grande do Sul, apresenta o pico da atividade hematofágica em torno do meio-dia. Apesar de ser um mosquito silvestre, há relato de que *Hg. leucocelaenus* possui capacidade de sobreviver em ambientes

modificados nas fronteiras norte e oeste de São Paulo, podendo facilitar a transmissão do vírus em porções de áreas urbanas limítrofes com a mata <sup>(63,101)</sup>.

Dentre as espécies do gênero *Sabethes* (figura 5), as de maior importância são *Sabethes chloropterus* (Humboldt, 1819) e *Sabethes albiprivus* (Theobald, 1903), por serem comumente encontrados em focos enzoóticos do vírus da febre amarela, além de já ter sido encontrado naturalmente infectado com o YFV. Contudo, *Sa. chloropterus* recebe maior destaque epidemiológico neste cenário. Considerada como uma espécie vetora potencial, foi recentemente encontrado naturalmente infectado e sugerido como vetor secundário do YFV no bioma da Mata Atlântica <sup>(63,91,99, 102)</sup>.



**Figura 5:** *Sabethes* sp. Foto: Ulf Drechsel

*Sabethes chloropterus* são mosquitos exclusivamente diurnos, silvestres e acrodendrófilos, porém, em florestas mais abertas e menos úmidas, sua acrodendrofilia é menos acentuada. É essencialmente silvestre e eclético quanto ao hospedeiro, e ataca o homem com certa facilidade. Diferentemente dos Aedini, como *Haemagogus* e *Aedes*, os ovos dos *Sabethes* são sensíveis à dessecação e são depositados, preferencialmente, em ocos de árvores, com pequenas aberturas para o exterior, o que evita a evaporação rápida, protegendo-os da dessecação e possibilitando a ocorrência desta espécie durante todo o ano <sup>(63)</sup>. O ciclo larval é bem mais longo em comparação com os dos *Haemagogus* e *Aedes*, podendo durar cerca de 20 dias, mesmo em condições favoráveis, e a fase de pupa dura cerca de uma semana <sup>(63,103)</sup>. As fêmeas são “tímidas” e atacam com pouca voracidade em comparação aos *Haemagogus* e *Aedes*. Sobrevoam o hospedeiro vertebrado

diversas vezes antes de finalmente pousar e picar, preferencialmente na região do rosto, próximo ao nariz <sup>(63)</sup>.

## 1.7 Competência vetorial

A capacidade vetorial de uma espécie é determinada a partir de parâmetros biológicos, ecológicos e comportamentais do inseto vetor. Destaca-se, dentre esses fatores, a competência vetorial, sendo esta a probabilidade de o vetor se infectar a partir de um repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado <sup>(76)</sup>, ser permissivo à infecção, replicação/multiplicação e transmissão de patógenos específicos <sup>(104)</sup>. Outros fatores igualmente importantes na determinação da capacidade vetorial são: a densidade do vetor na área, a média de picadas no hospedeiro específico para o parasito, a média de picadas infectantes por indivíduo, a duração do período de incubação do patógeno no inseto vetor, a duração do ciclo gonotrófico e a taxa de sobrevivência diária do vetor <sup>(76)</sup>. A competência vetorial é um fenótipo que é governado pela frequência de barreiras determinadas geneticamente <sup>(105,106)</sup> e está associada diretamente com a suscetibilidade à infecção, à duração do período de incubação extrínseco (PIE) e à eficiência na transmissão <sup>(107,108)</sup>. O PIE é o intervalo de tempo entre a ingestão de sangue infectado até chegada do vírus ou outro patógeno na saliva do mosquito. A sua duração depende de aspectos genéticos do vetor e do vírus envolvidos, e da temperatura ambiente, variando geralmente entre 10 a 14 dias para *Flavivirus* em temperaturas médias em torno de 26-28°C ou até menos, por exemplo em condições de temperaturas mais elevadas <sup>(106,109,110,111)</sup>. Este período depende também do título viral, da cepa e da quantidade de sangue infectante que o inseto ingere <sup>(112)</sup>.

A competência vetorial é avaliada quantitativamente, geralmente em valores percentuais, expressos em taxas, que dependem do momento em que se encontra a infecção <sup>(113)</sup>. Após a ingestão do sangue infectado, o tecido primário de replicação viral são as células epiteliais do intestino médio, ou estômago <sup>(76)</sup>. Assim, primeiramente, avalia-se a proporção de mosquitos que, tendo ingerido sangue com vírus e decorrido o PIE, apresenta infecção no tubo digestivo, obtendo-se a taxa de infecção. Por praticidade, ao invés de se dissecar o intestino médio, geralmente testa-se o triturado do abdômen do inseto como um todo.

Se o inseto for permissivo, depois de um período de replicação no intestino médio, o vírus pode se espalhar na hemocele e se disseminar para outros órgãos, estando presente igualmente na hemolinfa. Assim, calcula-se a taxa de disseminação a partir da proporção de indivíduos nos quais a infecção foi disseminada para os tecidos secundários, a partir do exame de patas, asas e/ou cabeça. Ou seja, a taxa de disseminação corresponde à proporção de indivíduos onde o vírus se disseminou dentre aqueles em que a infecção foi detectada. Por fim, determina-se a taxa de transmissão, com base na proporção de mosquitos em que a saliva continha o vírus dentre aqueles em que a disseminação foi comprovada <sup>(73,113)</sup>. Pode-se calcular a eficiência da transmissão, que corresponde à proporção de indivíduos com a saliva positiva dentre o número inicial que ingeriu o sangue infectado <sup>(106,109)</sup>.

Como dito, fatores intrínsecos importantes relacionados à competência vetorial são as vias inatas associadas à imunidade e às barreiras teciduais no mosquito, as quais um arbovírus precisa superar, para então ser finalmente transmitido pelo inseto. Essas barreiras podem ser classificadas como: a **barreira de infecção do intestino médio**, que impede a infecção do epitélio do estômago; a **barreira de escape do intestino médio**, que controla a disseminação do estômago para os tecidos secundários; a **barreira da glândula salivar**, que governa a penetração do vírus da hemocele para dentro das glândulas salivares, **Barreira de escape das glândulas salivares**, que controla a liberação do vírus nos dutos salivares para que ocorra a transmissão a um hospedeiro vertebrado durante a picada, momento em que as fêmeas de mosquitos injetam saliva (Figura 6) <sup>(106,109)</sup>.

Estudos recentes sobre a competência vetorial de espécies urbanas e silvestres em relação ao YFV, demonstrou que *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Hg. leucocelaenus*, *Sa. albiprivus* são competentes para transmitir o vírus da febre amarela <sup>(85,114)</sup>. Entretanto, vários fatores podem exercer influência na competência vetorial, entre eles a diversidade genética e a microbiota do inseto. É o caso de *Ae. aegypti*, por exemplo, onde há uma grande variedade na susceptibilidade a infecções por arbovírus entre populações geográficas ou até mesmo dentro de uma mesma população com diferentes cepas virais. Essa variação entre as populações geográficas dos mosquitos, dá-se, provavelmente, pelo fato de a competência vetorial ser um fenótipo complexo em evolução, o qual depende da interação entre o patógeno, o vetor e os seus simbiosiontes. A microbiota do inseto influencia os

principais processos fisiológicos relacionados à transmissão dos patógenos. A replicação do vírus DENV, por exemplo, é afetada pela microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, cuja redução da mesma, através de antibióticos, torna os mosquitos mais suscetíveis <sup>(115)</sup>. Apesar do sistema imune dos artrópodes ser considerado incapaz de adquirir memória imunológica, a imunidade inata desempenha um papel importante para limitar a infecção por patógenos. Alguns estudos mostraram a diferenciação de hemócitos e a caracterização de proteínas que possuem domínios de imunoglobulinas desempenhando papel importante no combate a infecções por determinados patógenos em mosquitos. A interação vírus-vetor é, portanto, resultado de um processo de coevolução contínua que envolve o sistema imune do vetor e suas barreiras físicas e moleculares e os mecanismos virais de escape destas defesas. Como consequência desse processo dinâmico, a longo prazo, ocorre a seleção de espécies ou populações de uma mesma espécie que irão atuar, de forma específica ou não, como vetores de um arbovírus <sup>(104)</sup>.



**Figura 6:** Barreiras que um arbovírus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo. MIB= barreira de infecção no intestino; MEB = Barreira de escape do intestino; TB = barreira de transmissão. Fonte: (AMARAL et al., 2012; adaptado de Black et al., 2002).

## 1.8 Uma breve história da febre amarela no Brasil

Depois de entrar no Brasil provavelmente pela costa, no século XVII, registrou-se a primeira epidemia no país em Recife. A febre amarela foi gradualmente se deslocando para outras áreas do noroeste e sudeste. Em meados do século XIX, uma epidemia atingiu a cidade de Salvador e alastrou-se por diversas outras cidades, chegando ao Rio de Janeiro em 1850, levando à morte 4.160 pessoas. Importantes epidemias ocorreram no Sudeste e Centro-oeste do Brasil na primeira década do século XX e nos anos 1930 e início dos anos 1940 <sup>(84)</sup>.

Em 1901, Walter Reed coordenou um estudo em Cuba em que comprovou, pela primeira vez, que a febre amarela era transmitida através de um vetor, o *Ae. aegypti* (na época chamada *Stegomyia fasciata*). Tal descoberta foi fundamental na redução da incidência da doença, permitindo a adoção de medidas de saneamento e controle do vetor <sup>(30,84)</sup>.

Durante 30 anos o único vetor conhecido era o *Ae. aegypti* e a transmissão era tida como restrita às áreas urbanas. A existência de um ciclo silvestre da febre amarela foi descoberta em 1932, por meio de estudos epidemiológicos realizados no Vale do Canaã, Estado do Espírito Santo, derrubando o mito de "doença da cidade". Nessa epidemia capixaba, percebeu-se que os casos ocorriam nas áreas rurais, sem que houvesse a presença do já conhecido vetor, *Ae. aegypti*, levando à suspeita de que o vírus era transmitido por outras espécies. Com isso, a Fundação Rockefeller financiou uma série de pesquisas entomológicas e sorológicas, na busca por possíveis vetores e hospedeiros de um ciclo silvestre. As provas de proteção realizadas em animais silvestres comprovaram o importante papel dos PNHs na epidemiologia da febre amarela silvestre no Brasil. Ademais, foi possível, através dos estudos epidemiológicos e entomológicos realizados nos locais de ocorrência de casos da doença, a identificação de várias espécies de mosquitos silvestres naturalmente infectados, destacando-se os *Haemagogus* <sup>(30,84)</sup>.

Entre os anos 1930 e 1937, estudos demonstraram que a febre amarela silvestre seria a modalidade comum da doença, e a urbana seria apenas uma manifestação atípica e possível de se extinguir com a erradicação do vetor *Ae. aegypti* e o esgotamento ou grande redução do número de indivíduos não imunes ao vírus <sup>(30,43,84)</sup>.

Somente em 1938 ficou demonstrado que os mosquitos silvestres *Hg. capricornii*, *Hg. leucocelaenus* (antes denominado *Aedes leucocelaenus*) e ao menos uma espécie de Sabetíneo poderiam ser os responsáveis pela transmissão da febre amarela silvestre no Brasil. Anos mais tarde, foi comprovada a participação do *Sa. chloropterus* neste ciclo <sup>(14,56)</sup>. Os achados no Brasil inspiraram estudos em outros países americanos, como na Colômbia, e na África, onde se comprovou igualmente a existência de tais ciclos epidemiologicamente distintos <sup>(116,117,118)</sup>.

A ameaça constante do aparecimento de epidemias de caráter epidemiológico urbano, veiculadas do *Ae. aegypti*, ou de origem silvestre, cujos vetores não se pode combater com os métodos empregados contra o vetor doméstico estimulou pesquisa para o desenvolvimento de vacinas. Assim, data da mesma década da descoberta do ciclo silvestre o primeiro uso da vacina de vírus atenuado 17D, feito em 1937. Logo inicia-se um programa continental de erradicação do *Ae. aegypti* orquestrada pela Organização Panamericana de Saúde, no qual o Brasil se engajou e conseguiu erradicar o vetor urbano de seu território, sendo o último foco encontrado em 1955 <sup>(84)</sup>. Mas nem todos os países americanos tiveram o mesmo sucesso e, por conta disso, tornaram-se perenes fontes de reinfestação de países vizinhos, como se deu no Brasil no final da década de 1960. O Brasil foi progressivamente reinfestado pelo *Ae. aegypti* nas décadas seguintes, o que resultou na introdução ou reintrodução de arbovírus, com subsequentes epidemias, como as provocadas pelo vírus Dengue, nos anos 1980, e os vírus Zika e Chikungunya, na década de 2010 <sup>(63,119,120)</sup>. Ainda que a febre amarela transmitida por *Ae. aegypti* não tenha sido mais detectada no Brasil desde os anos 1940, a preocupação com reurbanização a partir das ondas epizootias no ambiente silvestre, especialmente os próximos às grandes metrópoles apresentando elevados índices de infestação domiciliar tornou-se uma constante nas últimas décadas <sup>(121,122)</sup>.

Assim, em 1999, os órgãos de saúde pública recomendaram o monitoramento da circulação da FA no Brasil com base na vigilância sobre a ocorrência de epizootias em PNHs, considerando estes animais como sinalizadores da circulação do YFV, aliado à vigilância entomológica. O fato é que, a partir de 1997, estava havendo intensa circulação do vírus, estendendo-se da região amazônica à região central do Brasil. Em 2008-2009, a expansão da FA foi bem marcante, registrando-se casos, inicialmente, no Estado do Pará, Tocantins e Goiás e, posteriormente, em

2009, uma grande onda epidêmica e epizootica atingiu a região central (Goiás e Mato Grosso do Sul), alcançando o sul do Rio Grande do Sul. <sup>(17)</sup>.

## **1.9 Epidemiologia e situação atual da febre amarela no Brasil**

O vírus da febre amarela vem sendo identificado no Brasil, de Norte ao Sul, com ocorrências epizooticas quase cíclicas. O território da febre amarela se expande e retrai a partir da Amazônia, região reconhecida como um grande foco enzoótico/endêmico, de onde se originam epizootias em macacos que se disseminam para outras regiões ao longo das matas de galeria. Durante esse espalhamento há morte de grande parte dos PNHs, essenciais para a amplificação viral, e restando a população de animais resistentes ao vírus, devido à produção de anticorpos <sup>(122,123)</sup>. No Brasil, a febre amarela segue um padrão sazonal, com a maior transmissão ocorrendo historicamente entre dezembro e maio, sendo menorou interrompida nos outros meses. Entretanto, em 2018, diferente dos últimos 20 anos, a notificação de epizootias nos meses de junho a novembro indicou que a circulação viral continuou ocorrendo durante o período de baixa transmissão <sup>(124)</sup>. Em razão deste aspecto sazonal, os dados epidemiológicos de febre amarela são registrados e analisados segundo estações ou temporadas que vão de julho de um ano a junho do ano subsequente. <sup>(125)</sup>.

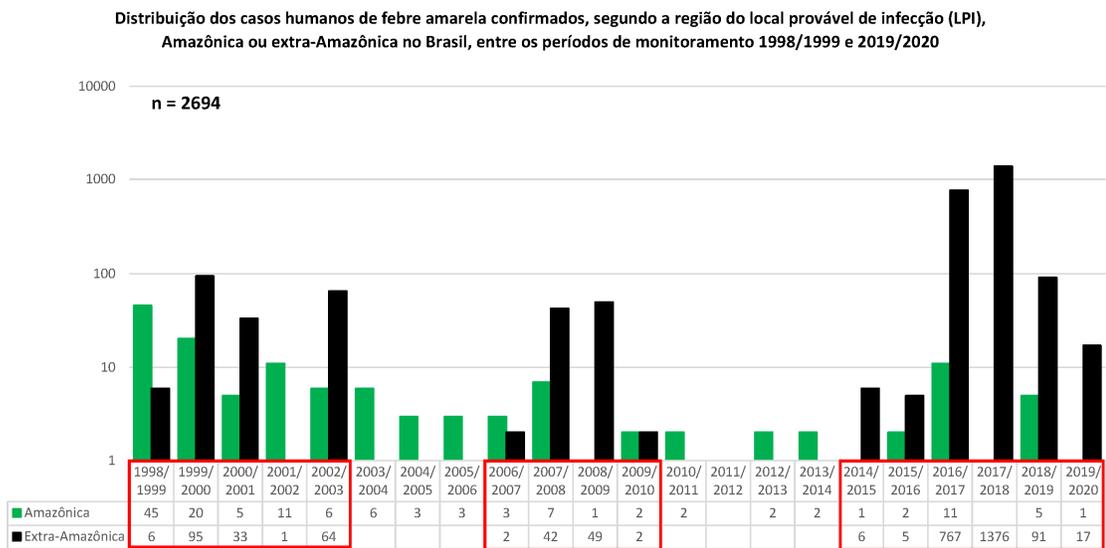
A recente reemergência da FA no país afetou diversas regiões metropolitanas em vários estados do Sudeste entre 2016 e 2018, dispersando-se em seguida para o Sul, correspondendo a um marco na história recente da doença. Análise de dados epidemiológicos, filogenéticos e filogeográficos de amostras do YFV <sup>(125,126)</sup> revelaram que a onda epizootica se iniciou, em 2014, na Amazônia, particularmente no Pará e Tocantins, deslocando-se em direção ao sul através da bacia dos rios Tocantins-Araguaia, atingindo os estados de Goiás e Minas Gerais em 2015. Em 2015-2016, a onda epizootica seguiu duas rotas no Sudeste: uma em direção aoSul, pela bacia do rio Paraná, chegando a São Paulo ainda em 2016, e umasegunda que se deslocou para o leste mineiro, chegando aos estados litorâneos do Espírito Santo e Rio de Janeiro, onde os primeiros casos foram detectados em 2017.No Rio de Janeiro, foram detectadas duas rotas independentes de disseminação do YFV separadas pela Serra do Mar, ou seja, uma litorânea, que chegou até Paraty e

Angra dos Reis, e outra pelo interior, que atingiu principalmente o vale do rio Paraíba do Sul <sup>(126,127)</sup>, especialmente durante a estação de transmissão de 2017-2018. Acreditava-se que, após a passagem de uma epidemia, a circulação do YFV no Sudeste dependeria da reintrodução do vírus a partir de onda epizootica vinda da bacia Amazônica, onde haveria condição de transmissão perene. O encontro de macaco infectado em 2019, dois anos após a circulação em uma área na Mata Atlântica, no Estado do Rio de Janeiro, demonstrou que esse bioma pode manter a circulação do vírus independentemente de nova introdução <sup>(128)</sup>.

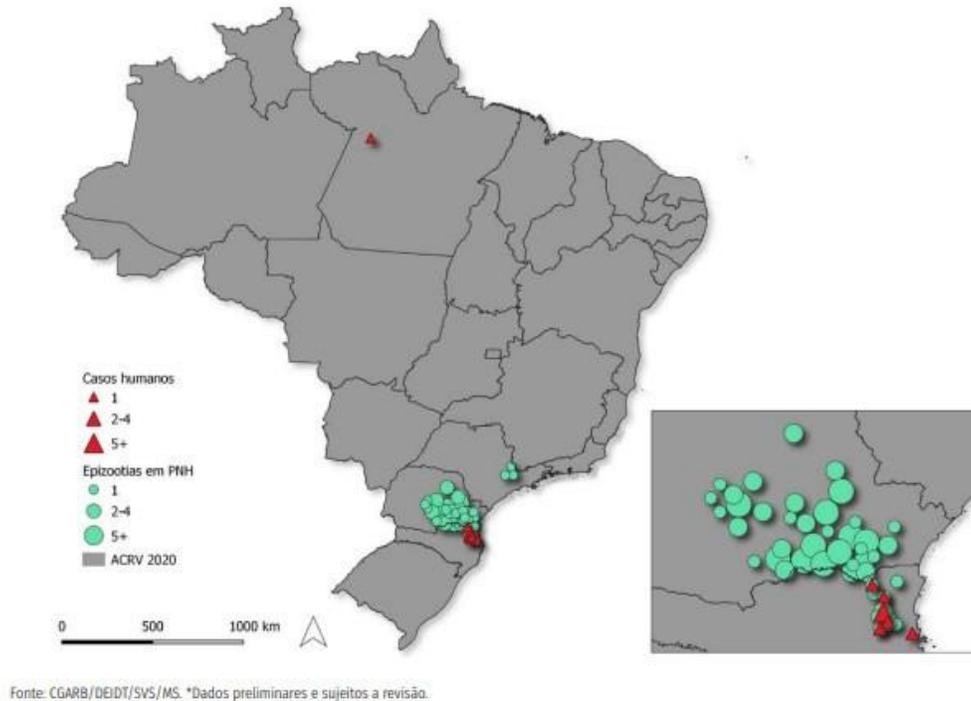
Durante as temporadas epizooticas 2016-2017, 2017-2018 e 2018-2019 o Brasil registrou o maior número de casos dos últimos anos (Figura 7) (2,1 mil casos e mais de 700 óbitos), tornando o recente surto de febre amarela silvestre no Brasil o mais grave das últimas sete décadas. Foi possível observar o avanço das áreas de transmissão nos sentidos leste e sul do país, alcançando a região da Mata Atlântica, local que abriga uma ampla variedade de PNHs e onde o vírus não circulava há décadas. <sup>(129)</sup>. No Sudeste, o início do surto começou com o registro de casos no fim de 2016, em Minas Gerais, alcançando rapidamente o Sudeste do país, resultando na confirmação total de 778 casos em humanos, incluindo 262 mortes e 1.655 epizootias por febre amarela, registrados até junho de 2017. No período sazonal seguinte (2017-2018), o Sudeste vivenciou uma segunda onda de transmissão, registrando 1.376 casos humanos, incluindo 483 mortes e 864 epizootias (Figura 8). A maioria dos casos humanos e epizootias ocorridos era originalmente de áreas rurais do interior de MG, mas, posteriormente, o vírus se aproximou de grandes regiões metropolitanas, como Vitória (Espírito Santo), São Paulo (São Paulo) e do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro), cidades altamente infestadas por vetores urbanos competentes do YFV, como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* <sup>(43)</sup>. Na temporada de 2018-2019, houve uma redução no número de casos confirmados, que pode ser atribuída, em parte, ao movimento do vírus em áreas de menor receptividade, juntamente à maior cobertura vacinal em áreas onde antes a vacinação não era recomendada <sup>(130)</sup>.

Além do vírus da febre amarela (YFV) representar uma séria ameaça às populações rurais, a intensa movimentação de humanos virêmicos em áreas infestadas por *Ae. aegypti* é um risco permanente para a introdução do vírus em área urbana <sup>(91,123,131,132,133)</sup>. Uma grande campanha de vacinação de pessoas que vivem nas áreas rurais e em bairros próximos de parques e áreas verdes das

idades foi realizada. Entretanto, além de vacinar a população humana, estratégias complementares foram sugeridas durante a epidemia, dentre as quais a vacinação de PNHs (122,134). Entendeu-se também que, além de potencialmente colaborar para a interrupção da transmissão do vírus em dadas áreas, a imunização de macacos confinados em parques, zoológicos, centros de pesquisa e reservas florestais próximas a áreas urbanas, evitaria também a extinção de espécies ameaçadas, preservando a biodiversidade.



**Figura 7:** Distribuição dos casos humanos confirmados para a FA, segundo o local provável de infecção (LPI), amazônica ou extra-Amazônica no Brasil, entre os períodos de monitoramento 1998/1999 e 2019/2020 (Fonte: Coordenação-Geral das Arboviroses (CGARB) /Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis (DEIDT)/ Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/ Ministério da Saúde (MS).



**Figura 8:** Distribuição dos casos humanos e epizootias em PNHs confirmados para FA, por local provável de infecção, monitoramento 2019/2020 (jul/19 a jun/20), Brasil, entre as SE 01 a11 (Fonte: Ministério da Saúde, 2020).

### 1.10 Vírus vacinal atenuado em mosquito vetor

Como explicado, para um arbovírus ser transmitido por um mosquito, as partículas virais ingeridas pelo inseto durante um repasto de sangue em um vertebrado devem primeiramente infectar o epitélio do intestino médio (estômago) do inseto, replicar neste sítio primário e, subsequentemente, disseminar do intestino médio para outros órgãos, chamados de tecidos secundários de replicação, dentre os quais as glândulas salivares. Só então, o vírus estará presente na saliva e poderá ser injetado juntamente com ela quando o mosquito se alimentar num hospedeiro suscetível. Em resumo, o ciclo de um arbovírus num mosquito passa por três fases sequenciais: infecção (replicação restrita ao estômago, sítio primário), disseminação (replicação em tecidos secundários) e transmissão (chegada do vírus na saliva) <sup>(85)</sup>.

Assim, dependendo de características do vírus e da combinação de características genéticas do vírus e do mosquito, este ciclo pode se desenvolver com sucesso ou ser abortado em qualquer uma das fases supracitadas. Além da infecção, o fenômeno da disseminação no mosquito é, portanto, uma etapa crítica para a transmissão.

A cepa Asibi do vírus da febre amarela (YFV), que é capaz de infectar, disseminar e ser transmitida em uma alta proporção em mosquitos *Ae. aegypti*, foi usada nos anos 1930 para se desenvolverem as vacinas de o vírus atenuado 17D, a partir do qual foram derivadas as subcepas vacinais, como 17D-204 e 17DD usadas hoje. Testes laboratoriais foram feitos para verificar se o vírus atenuado vacinal seria capaz de infectar e ser transmitido pelo vetor clássico, o *Ae. aegypti*. Verificou-se que vírus atenuado dessa vacina é capaz de infectar as células do epitélio do estômago dos mosquitos, ou seja, de estabelecer a infecção no vetor. Porém, diferentemente de cepas silvestres do YFV, como o da cepa de origem (Asibi), perdeu a capacidade de se disseminar para tecidos secundários dos mosquitos e, assim, seria incapaz de ser transmitida pelo mosquito vetor *Ae. aegypti*, como resultado do processo de atenuação conseguido através de passagens seriadas em embrião de galinha <sup>(134,135)</sup>. Ou seja, após a ingestão pelo mosquito, a infecção por 17D seria limitada ao intestino médio do vetor *Ae. aegypti*. Até onde sabemos, não houve testes sistemáticos quanto à competência vetorial de espécies silvestres de mosquitos Neotropicais para o vírus vacinal atenuado 17D ou 17DD.

Manipulação genética direcionada em regiões do genoma do vírus vacinal 17D mostraram que mudanças no genoma desse vírus podem recuperar a sua capacidade de se disseminar nos mosquitos. Por exemplo, uma quimera contendo uma combinação dos genes estruturais da 17D e genes proteicos de membrana (M) e de envelope (E) do vírus Asibi foi capaz de disseminar em *Ae. aegypti* desafiados por infecção via oral. Isso sugere que potenciais mutações no genoma do vírus 17D, em especial nas proteínas M e E, podem permitir a recuperação da capacidade do vírus vacinal de disseminar e ser transmitido <sup>(135)</sup>. Portanto, tais mutações podem ocorrer juntamente com outras que podem interferir na segurança desta vacina composta de vírus atenuado.

Em 2018, micos-leão-dourados foram mortos durante epizootia pelo YFV ocorrida em área de preservação, em Silva Jardim, do Estado do Rio de Janeiro <sup>(136)</sup>. Esse acontecimento teve grande repercussão na área de conservação <sup>(67)</sup>, uma vez que uma epizootia poderia prejudicar profundamente um projeto de várias décadas.

O Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) é unidade do INEA-Rio de Janeiro, localizada na abrangência do Parque Estadual dos Três Picos (PETP), Guapimirim, cuja finalidades inclui o estudo e criação, em cativeiro, de PNHS ameaçados de extinção, como os micos-leão e muriquis. Frente à morte de micos-leões pelo YFV, unidades da Fiocruz (Biomanguinhos e IOC), juntamente com o CPRJ, desenharam um projeto para testar a eficácia e viabilidade da imunização de primatas não humanos através da vacinação com a vacina de vírus atenuado 17DD. Assim como passagens seriadas do vírus selvagem Asibi resultou na atenuação (perda de viscerotropismo e neurotropismo), a replicação do vírus vacinal 17D ou 17DD atenuado em hospedeiros não habituais, como macacos do Novo Mundo, muito sensíveis ao YFV, e mosquitos selvagens do Novo Mundo, poderia, de alguma forma, selecionar mutações no genoma do vírus que permitam não só a sua disseminação, mas também e transmissão do vírus vacinal por mosquitos.

Primatas não humanos do Novo Mundo injetados com cepas selvagens do YFV produzem viremia elevada geralmente nos primeiros 3-5 dias após a infecção <sup>(136)</sup>. No ambiente de cativeiro ou, principalmente, na natureza, animais recentemente vacinados poderão ser picados por dezenas de mosquitos por dia, nos quais a infecção poderá se instalar. Espera-se que o vírus 17DD restrinja a sua infecção ao intestino desses mosquitos. Mas, caso haja mutações no genoma viral nestes ou nos PNHS vacinados que permitam a recuperação da capacidade de disseminação nos mosquitos, há risco de o vírus vacinal ser transmitido com composição gênica desfavorável.

Os PNHS envolvidos no projeto de imunização supracitado permanecem em gaiolas, não teladas, ao ar livre no CPRJ, o qual é cingido por matas de municípios onde recentemente (2017-2018) foi reportada a transmissão natural do YFV <sup>(137)</sup>. Portanto, a fauna de mosquitos no CPRJ deve, potencialmente, possuir vetores do YFV. Assim sendo, os animais vacinados podem ser picados por mosquitos originários das matas próximas. Hipoteticamente, mosquitos silvestres podem picar animais vacinados em viremia, infectando-se e, ao voltar para a mata, iniciar uma infecção autóctone.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade do vírus vacinal 17DD de infectar, disseminar e ser transmitido por mosquitos alimentados com sangue de primatas do novo mundo mantidos em cativeiro durante o período da viremia vacinal, bem como a determinação da fauna de mosquitos locais a que estes animais vacinados estão potencialmente expostos à picada em seus recintos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a. Determinar as taxas de infecção e investigar se há disseminação e transmissão em mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* desafiados oralmente através da alimentação em PNHs do Novo Mundo vacinados com a vacina atenuada (17DD)
- b. Efetuar coletas de mosquitos no entorno dos recintos dos PNHs no CPRJ, visando ao levantamento faunístico no local
- c. Identificar e descrever a existência de diferentes modelos de distribuição das populações de mosquitos no CPRJ.

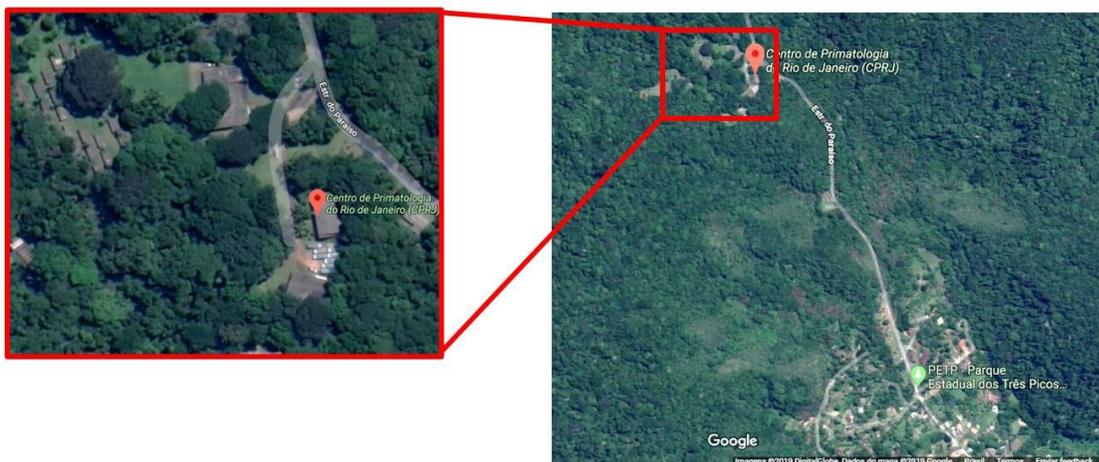
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Considerações éticas

O estudo foi realizado sob aprovação do comitê de ética para a realização do experimento com os PNHs (CEUA-UNIFESO nº 467/17- Anexo 1) e para realização de captura dos mosquitos no Parque estadual dos Três Picos (PETP) e outras áreas do RJ (SISBIO 52472-2 – Anexo 2).

#### 3.2 Delineamento e local do estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo experimental e observacional. A porção experimental foi feita com a utilização de mosquitos provenientes da colônia do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, do instituto Oswaldo Cruz, e de PNHs mantidos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), que participam de um estudo de avaliação da imunogenicidade e segurança da vacina com vírus atenuado 17DD, coordenada por Biomanguinhos, Fiocruz. A porção observacional foi feita a partir da coleta de mosquitos no CPRJ, como detalhado adiante. O CPRJ está situado no município de Guapimirim, no estado do Rio de Janeiro, junto à antiga Estação Ecológica Estadual do Paraíso (EEEP), hoje integrada ao Parque Estadual dos Três Picos (PETP), a cerca de 100 km do centro da Cidade do Rio de Janeiro (Figura 9).



**Figura 9:** Detalhes da localização do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, no município de Guapimirim, no Estado do Rio de Janeiro.

### 3.3 PNHs utilizados no estudo

Em nosso estudo, utilizamos apenas micos-leões (Família *Callitrichidae*, gênero *Leontopithecus*) adultos e de ambos os sexos. Segundo o protocolo aprovado, animais (PNHs) injetados com a vacina de vírus atenuado 17DD, produzida por Biomanguinhos, foram anestesiados nos dias 0, 3 e 6 pós-injeção para coleta de sangue visando a determinação da viremia, a pesquisa de anticorpos e informações clínicas (e.g. peso, temperatura corporal) que são objeto de estudo independente sobre imunização e segurança da aplicação desta vacina para uso humano em PNHs do Novo Mundo. No 3º dia pós-vacinação, quando se observa o pico de viremia do 17DD na maioria dos micos (André T.S. Fernandes - LATEV- Biomanguinhos, informação pessoal), aproveitamos o período de anestesia dos animais para desafiar oralmente os mosquitos.

Cabe ressaltar que os animais que participaram desses experimentos são mantidos em regime semiaberto do CPRJ, ou seja, em gaiolas não teladas contra a entrada de insetos hematófagos, dentre os quais mosquitos. Portanto, os animais vacinados são um potencial risco de serem picados por insetos hematófagos diuturnamente. Com efeito, CPRJ é localizado em áreas próximas de mata e cursos d'água onde proliferam vários insetos hematófagos borrachudos, maruins, mutucas, flebotomíneos e mosquitos. Assim, os PNHs submetidos a esses experimentos já estão habituados a picadas de vários tipos de insetos hematófagos e, portanto, acreditamos que a alimentação de mosquitos nos mesmos não acarretaria estresse adicional.

### 3.4 Mosquitos utilizados nos desafios orais infectantes

Os vetores da febre amarela silvestres no Novo Mundo e, portanto, os que potencialmente poderiam picar PNHs vacinados e se infectarem, são espécies arborícolas dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Por essa razão, foram espécies desses gêneros as que usamos.

Foram usados mosquitos pertencentes a cinco espécies, das quais quatro silvestres – *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Sabethes albiprivus* e *Sabethes identicus* Dyar & Knab, 1907 – e uma doméstica, o *Ae. aegypti*. As populações de todas as espécies utilizadas foram originárias do Estado Rio de Janeiro, como detalharemos mais à frente.

A espécie de mosquito mais testada quanto à competência vetorial para o vírus amarelo e outros flavivírus epidêmicos é o *Ae. aegypti*, tanto por ser vetor clássico da febre amarela quanto por ser de fácil colonização em laboratório. Por conta disso, há bastante dados sobre a competência vetorial dessa espécie ao YFV na literatura (85,113,136,138). Além disso, como explicamos antes, *Ae. aegypti* foi também tradicionalmente empregado em avaliações de capacidade de disseminação de vírus atenuados (134,135). Por esses motivos, ainda que se trate de um mosquito doméstico e com pouca chance de picar macacos na natureza, lotes de *Ae. aegypti* foram incluídos em nossos experimentos a título de comparação com dados obtidos no passado (143) e como controle de funcionamento dos ensaios com mosquitos silvestres jamais testados frente a esse vírus vacinal.

Exceto quanto aos *Haemagogus*, o Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários do Instituto Oswaldo Cruz mantém colônias limpas de mosquitos das espécies utilizadas: *Ae. aegypti*, *Sa. identicus* e *Sa. albiprivus*. As colônias dessas três espécies são mantidas em insetário com temperatura, umidade e foto- período controlados ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 10\%$  UR, ciclo de 12h de luz e 12h de escuro). Detalhes da colonização dos mosquitos visando a experimentos como o que realizamos podem ser obtidas em Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994)<sup>(63)</sup> e Fernandes et al. (2016)<sup>(139)</sup>.

Resumidamente, no que concerne ao *Ae. aegypti*, utilizamos uma colônia estabelecida a partir de ovos coletados no bairro da Urca, Rio de Janeiro, RJ, mantida no laboratório por <10 gerações. Para se obterem as fêmeas destinadas aos experimentos de desafio oral, os ovos de *Ae. aegypti* já estocados em câmara úmida foram colocados para eclodir através de uma única imersão em água desclorada. As larvas obtidas foram criadas em bacias retangulares (28,5 x 21,4 x 5,7 cm) contendo 1L de água desclorada e alimentadas a cada dois dias com levedura de cerveja, numa densidade de 100-120 larvas/bacia. As pupas foram transferidas para potes contendo água desclorada mantidos em gaiolas onde os adultos emergiam e acasalavam. Os mosquitos adultos receberam alimentação açucarada (solução estéril de sacarose ou mel a 10%), diariamente, até a data da triagem das fêmeas para os ensaios.

As populações de *Sabethes albiprivus* e *Sabethes identicus* utilizadas foram procedentes de Tinguá, município de Nova Iguaçu, como previamente descrito em detalhes por Bersot (2014)<sup>(103)</sup>. Diferentemente dos Aedini, os ovos de *Sabethes* não

podem ser estocados, o que obriga a manutenção continuada das colônias iniciadas em 2013. <sup>(103)</sup> A colonização das duas espécies de *Sabethes* foi feita de modo semelhante ao descrito acima para *Ae. aegypti*, exceto, essencialmente, pela densidade larval, que foi de 60 indivíduos/ bacia.

Por não se manterem em colônia em condições de laboratório, os mosquitos *Hg. janthinomys/capricornii* e *Hg. leucocelaenus* utilizados nos desafios orais foram obtidos a partir da coleta de ovos dessas espécies com uso de ovitrampas suspensas nas copas de árvores no Campus Fiocruz Mata Atlântica (CFMA), situado no bairro da Taquara, na cidade do Rio de Janeiro, onde não foi confirmada a transmissão do YFV no recente surto. As ovitrampas <sup>(140)</sup> continham água desclorada, adicionada de pedados de folhas caídas das árvores, e três paletas de Eucatex como suporte para oviposição. As paletas eram trocadas quinzenalmente, estocadas em câmara úmida no insetário supracitado até a eclosão. A eclosão dos ovos foi feita da mesma maneira descrita acima para *Ae. aegypti*, porém, com pelo menos três imersões das palhetas por dois dias intercaladas por, pelo menos, 2 dias de secagem. A criação das formas imaturas e dos adultos foi semelhante ao descrito para *Ae. aegypti*, exceto pela adição de algumas folhas caídas de árvores previamente umedecidas nas bacias.

### **3.5 Repasto sanguíneo nos PNH vacinados**

Fêmeas de mosquito com 5-7 dias pós-emergência foram colocadas em pequenas gaiolas de plástico, em número entre 60 em cada para os *Aedes* e *Haemagogus* e 30 para os *Sabethes*. As gaiolas de plástico utilizadas para os *Aedes* e *Haemagogus* consistem em um recipiente cilíndrico adaptado, onde a parte superior é coberta com um tecido (*voil*), por onde os mosquitos se alimentam, ao passo que a parte inferior apresenta uma rodela de espuma sintética (espumavinílica acetinada - EVA) que possibilita mobilidade no momento do repasto sanguíneo, para diminuir o espaço de vôo dos insetos, aproximando-os da parte superior da gaiola, que por sua vez entra em contato com a pele do animal. Para os *Sabethes*, por serem maiores e mais sensíveis à perturbação, foram utilizadas gaiolas maiores, sem fundo móvel, como supracitado.

Cada mico-leão vacinado foi exposto, simultaneamente, a três gaiolas com mosquitos, cada qual contendo fêmeas de um dos gêneros de mosquitos supracitados (*Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*). A exposição à picada dos mosquitos foi feita durante anestesia já programada no projeto original em função da necessidade de punção venosa para determinação de viremia e quantificação de anticorpos nos PNH não relacionados a essa dissertação. As exposições aos mosquitos tiveram duração de 15 minutos e ocorreram no 3º dia pós-vacinação, quando se observou ocorrer o pico de viremia pelo YFV-17DD nos primeiros PNHs vacinados (André T.S. Fernandes, LATEV-Biomanguinhos, informação pessoal). Para tal, as gaiolinhas foram colocadas diretamente em contato com a epiderme dos PNHs, na porção inferior do ventre ou na face interna da coxa, áreas naturalmente pouco pilosas. Logo após o repasto sanguíneo, os mosquitos foram anestesiados e triados em banho de gelo e somente os totalmente ingurgitados foram aproveitados. Os não ingurgitados foram imediatamente descartados.

Os mosquitos ingurgitados foram separados, em grupos de 20 a 40, em gaiolas cilíndricas de papelão, teladas nas duas extremidades, que foram incubadas em estufas B.O.D com temperatura, umidade e foto-período controlados (26 °C; 80 % UR e com ciclo de 12 h de luz e 12 h de escuro). Os mosquitos receberam, diariamente, alimentação açucarada (solução estéril de sacarose ou mel a 10 %). Após 14 ou 21 dias da alimentação infectante (d.p.i.), os mosquitos sobreviventes foram examinados para a determinação das taxas relativas à competência vetorial, conforme detalhado por Fernandes *et al.* (2016) <sup>(139)</sup>. Resumidamente, os mosquitos eram anestesiados em banho de gelo e manipulados individualmente e com pinças estéreis, retirando-lhes todas as patas e asas. A saliva dos insetos é obtida por salivagem forçada com o inseto recém anestesiado. Para tal, introduzia-se a probóscide de cada mosquito em uma ponteira contendo 5µL de soro fetal bovino (SFB) estéril para a coleta de sua saliva durante 30 min. Então, retirava-se a probóscide do mosquito da ponteira e cortava-se a cabeça com lâmina de bisturi estéril. O SFB contendo a saliva coletada do inseto era imediatamente misturado a 45µL de meio de cultura Leibovitz L15 e congelado a -80°C até o processamento para determinação da taxa de transmissão. A cabeça e o restante da carcaça (abdome + tórax) eram respectivamente transferidos para tubos contendo 250 e 300µL de meio L15 contendo 4% de SFB e conservados a -80°C até o processamento para determinação das taxas de disseminação e infecção.

### 3.6 Desafio oral experimental de mosquitos em laboratório

Experimentos completos em laboratório foram realizados de modo a se comparar os resultados dos desafios orais dos mosquitos diretamente nos macacos, empregando-se as mesmas espécies de mosquitos e cepa viral vacinal, porém com títulos virais previamente conhecidos.

Para isso, fêmeas de *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* foram tratadas da mesma forma como citado anteriormente para os desafios orais através da alimentação em macacos no CPRJ. Porém, no laboratório, as fêmeas de mosquitos foram alimentadas com uma mistura de eritrócitos de coelho e sobrenadante de cultura do YFV 17DD em duas diluições. O sangue total de coelho foi previamente centrifugado e lavado, por cinco vezes, com PBS estéril. O vírus empregado correspondeu à amplificação, em uma passagem em cultura de células Vero inoculada com uma alíquota do conteúdo de um frasco da vacina de febre amarela (vírus atenuado 17DD), produzida por Biomanguinhos, pertencente ao mesmo lote usado na vacinação dos micos-leões (Lote 186VFA057Z, produzido em junho de 2018). Foi usado o meio 199, suplementado com 5% SFB, e incubação a 37°C, por três dias, quando sobrenadante foi recolhido e titulado a partir diluições inoculadas em células Vero. O estoque viral obtido tinha originalmente o título de 7,91 log<sub>10</sub> PFU/mL. O cultivo do vírus vacinal, sua amplificação e a determinação do título viral foram realizados no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) (Marta Cristina de Oliveira Souza, LATEV-Biomanguinhos, informação pessoal).

Esse estoque foi diluído em meio Leibovitz L15 suplementado com 2% de SFB e eritrócitos lavados de coelho até se obterem os títulos virais finais de 1x10<sup>4</sup> e 1x10<sup>7</sup> PFU/mL oferecidos oralmente aos mosquitos. O título viral de 1x10<sup>4</sup> foi PFU/mL foi escolhido por ser o mais próximo da viremia mais elevada apresentada por PNHS vacinados com a 177DD no projeto em curso, independentemente da espécie de primata ou tempo decorrido após a inoculação da vacina (André T.S. Fernandes, LATEV-Biomanguinhos, informação pessoal), ao passo que 1x10<sup>7</sup> PFU/mL foi o título mais elevado que se pode obter após diluição do estoque viralem eritrócitos lavados de coelho.

O repasto infectante, com duração de 40 minutos, foi oferecido em alimentador artificial, adaptado a um banho-maria circulante que mantinha a temperatura a 37°C. Após a alimentação, somente as fêmeas ingurgitadas foram

separadas e incubadas em BOD, com umidade, temperatura e fotoperíodo controlados, como detalhado anteriormente.

### 3.7 Exame dos mosquitos

A taxa de infecção (TI), determinada a partir de triturado de tecidos do abdome + tórax (doravante denominado corpo), corresponde ao percentual de indivíduos infectados dentre o número de indivíduos desafiados oralmente e ingurgitados. A taxa de disseminação (TD), determinada a partir de triturados da cabeça dos insetos, corresponde ao percentual de mosquitos positivos nestes tecidos dentre aqueles que tinham o corpo positivo. Por último, a taxa de transmissão (TT) corresponde à proporção de indivíduos com a saliva positiva dentre aqueles em que o vírus foi capaz de disseminar <sup>(141)</sup>.

Para a determinação das taxas de infecção e disseminação viral, corpo e cabeça, foram respectivamente triturados. Cada triturado foi centrifugado a 10.000g, durante 5 min, a 4°C. Uma amostra de 140 uL do sobrenadante foi utilizada para a extração do RNA, utilizando-se o QIAamp Viral RNA Mini Kit, seguindo-se o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi testado por RT-qPCR capaz de detectar tanto amostras de vírus selvagens quanto do vírus vacinal atenuado empregando-se os *primers* e estratégia descritos por Domingo *et al.* (2012) <sup>(142)</sup> e Abreu *et al.* (2019) <sup>(91)</sup>.

Resumidamente, o RNA viral foi transcrito reversamente e amplificado utilizando-se o TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems) em um equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems). Para cada reação, usamos 300 nM do primer 5'-GCTAATTGAGGTGCATTGGTCTGC-3' (posição do genoma 15–38), 600 nM do *primer* reverso 5'-CTGCTAATCGCTCAACGAACG-3' (posição do genoma 83-103) e 250 nM de sonda (5' FAM-ATCGAGTTGCTAGGCAATAAACAC-3'TAMRA, posição do genoma 41-64). Cada amostra foi testada em duplicata, utilizando-se água deionizada como controle negativo tanto para as reações de extração e quanto de PCR. A transcrição reversa foi realizada a 50 °C por 5 min. As condições de qPCR foram as seguintes: 95 °C por 20 s, seguidas de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Em cada grupo de amostras analisadas, os números de cópias do RNA genômico de YFV foram calculados por quantificação absoluta usando-se uma curva padrão para cada execução. Na

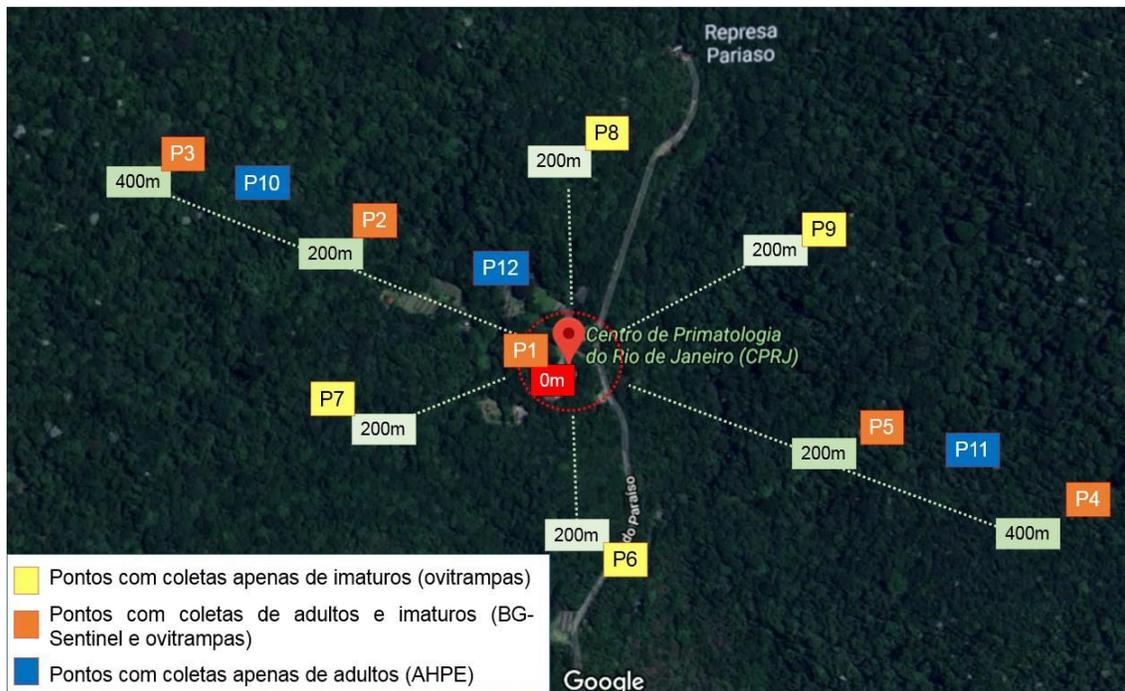
construção da curva padrão, um amplicon foi clonado compreendendo a região genômica de 1 a 865 de um isolado do vírus selvagem obtido de um bugio encontrado morto no Espírito Santo, em 2017 (isolado ES-504, número de acesso GeneBank: KY885000) <sup>(28)</sup>, usando-se o pGEM-T Easy Vector (Promega), conforme descrito previamente <sup>(91)</sup> e gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz. A curva padrão foi gerada por diluição em série de dez vezes (variando de 10 a 10<sup>9</sup> cópias/reação) do transcrito. O limite de detecção em condições padrão de ensaio foi de aproximadamente 40 cópias de RNA viral / mL.

Antes de testarmos mosquitos alimentados em macacos virêmicos ou em condições *in vitro*, realizamos reações de padronização a partir de diluições em série (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>) do homogenato de mosquito selvagem positivo da coleção de nosso laboratório. A sensibilidade do teste foi comparada em triplicata, e a RT-qPCR detectou o genoma do vírus até a diluição 10<sup>-9</sup>.

### **3.8 Coleta de mosquitos para levantamento faunístico**

As coletas foram realizadas na copa e no solo, dentro da mata no entorno do CPRJ e junto às jaulas dos animais, com a disposição de nove pontos de coleta, sendo cinco utilizados com a combinação de armadilhas para coleta de adultos e imaturos e quatro apenas para coleta de imaturos. Além destes, outros três pontos foram utilizados para captura ativa de adultos, através da Atração Humana Protegida e Esclarecida (AHPE).

Um transecto principal foi traçado com cinco pontos de coleta (P1 a P5) estabelecidos a cada 200 m, cujo ponto de coleta localizado no meio do seu comprimento (P1) serviu de referência para o traçado de mais duas retas de 400 m, na extremidade das quais se estabeleceram mais quatro pontos (P6 a P9) distando cada qual 200 m do ponto central P1. O P1 está localizado aproximadamente no centro geográfico das dependências do CPRJ (sede administrativa, laboratórios, ambulatório, centro cirúrgico, agrupamentos de jaula dos PNHs) ao passo que os P2, P5 a P9 se localizaram num raio de 200 m de distância do ponto central, no ecótono entre o ambiente modificado e a mata ou mesmo dentro da mata, enquanto os P3 e P4 se achavam totalmente dentro da mata, a 400 m do P1 (Figura 10).



**Figura 10:** Disposição dos pontos de coleta no entorno do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Guapimirim, RJ. As distâncias indicadas possuem como referência o ponto central (P1), situado próximo à sede do CPRJ.

Para a obtenção dos ovos foram utilizadas armadilhas do tipo ovitrampa<sup>(140)</sup> já descritas no item 3.4, instaladas nas árvores a uma altura de 2 metros, fazendo-se a troca das palhetas de Eucatex a cada 15 dias. Ao todo, foram instaladas 36 ovitrampas, distribuídas igualmente entre os pontos P1 a P9. No laboratório, as palhetas foram observadas individualmente ao estereomicroscópio para a procura de ovos de mosquitos. As paletas positivas foram guardadas em câmeras úmidas mantidas em insetário com temperatura, umidade e foto-período controlados ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR, ciclo de 12 h de luz e 12 h de escuro), por 7- 10 dias. Então, as paletas foram imersas várias vezes em água desclorada para estimular a eclosão dos ovos, com intervalos de quatro dias de secagem. No caso de nenhum ovo eclodir, a paleta ainda sofria cinco adicionais ciclos alternados de imersão e secagem. As larvas eram criadas no mesmo insetário, como descritas anteriormente, e a realização da identificação das espécies foi feita após a emergência dos adultos. As coletas de ovos foram feitas de dezembro de 2018 a dezembro de 2019.

As coletas de adultos foram realizadas através da captura por AHPE, com auxílio de capturador de sucção manual (Castro), e com armadilha BG-Sentinel (Figura 11). A armadilha BG-Sentinel é um cilindro de tecido, dobrável e leve, provida de uma ventoinha que produz convecções de ar, que ajudam a dissipar os atraentes escolhidos e, ao mesmo tempo, aspirar os mosquitos. Neste trabalho, utilizamos CO<sub>2</sub> liberado por gelo seco como atraente, que aumenta o sucesso desta armadilha na captura de uma grande variedade de mosquitos, como já empregado em outros estudos com transectos <sup>(91,143)</sup>.



**Figura 11:** Armadilhas utilizadas para a coleta de mosquitos adultos e imaturos. Capturador de sucção manual (Castro) (A), Ovitampa (B) e armadilha BG-Sentinel (C). Fotos: SVS/MS 2004 (A) e (B); Rafaella Miranda (C)

As coletas de adultos foram feitas em expedições, com duração de quatro dias por mês de amostragem, sendo quatro meses no período chuvoso – dezembro de 2018 a março de 2019 - e quatro no período seco – junho a setembro de 2019. Durante os quatro dias de coletas mensais, as armadilhas BG-Sentinel operavam, ininterrupta e simultaneamente, em cinco pontos de coletas (P1 a P5) compartilhados com os de operação de ovitrampas (Figura 10), sendo o resultado de

sua coleta individual e diariamente recolhido às 18:00h. No que concerne às capturas por AHPE, duplas coletavam mosquitos durante 40 min. por ponto, fazendo uma rotação entre os pontos entre 10:00-12:00 e 14:00-16:00h. Devido à limitação do número de indivíduos capturadores por expedição (N= 4), era possível realizar capturas por AHPE em somente dois pontos de coleta simultaneamente. Para se evitar interferência na coleta com BG-Sentinel, as duplas trabalhavam afastadas das armadilhas, porém respeitando as distâncias de 200 m entre os pontos do transecto. Foram estabelecidos três pontos para coletas de adultos com AHPE (P10 a P12), sendo o P12 localizado próximo ao P1 e os P10 e P11 a 400 m dali, ou seja, nas imediações dos P3 e P4, respectivamente.

A identificação das espécies capturadas foi realizada a partir da observação direta dos caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio estereomicroscópio (Zeiss®) e consulta às descrições/diagnoses respectivas das espécies, utilizando-se chaves dicotômicas elaboradas por Arnell (1973)<sup>(90)</sup>, Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994)<sup>(63)</sup>, Forattini (2002)<sup>(71)</sup> e Marcondes & Alencar (2010)<sup>(98)</sup>.

### **3.9 Análises estatísticas**

#### **3.9.1 Índices de diversidade e similaridade**

As diferenças na composição da comunidade dos mosquitos, em cada ponto de coleta, foram avaliadas e comparadas através do Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ )<sup>(144)</sup>. Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os Índices de Diversidades, foi utilizado o teste t, com nível de significância de 5 %, utilizando-se o software Past 3.16<sup>(82)</sup>.

A similaridade entre os pontos amostrais quanto ao número de espécies foi estimada pelo índice de similaridade qualitativa de Sørensen (IS), baseado na presença e ausência das espécies. Como regra geral para os índices de similaridade foram considerados valores acima de 0,5 como altos, crescendo gradativamente até 1,0<sup>(145)</sup>.

### **3.9.2 Análises de Kruskal-Wallis, Pós teste de Dunn e Análise de Mann Withney**

Para avaliar a ocorrência de diferenças significativas entre populações de mosquitos nos diferentes pontos de captura e diferentes tipos de armadilhas, foi utilizada a análise de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5 %, com auxílio do software IBM SPSS Statistics Version 23. O pós-teste de Dunn foi utilizado para avaliar quais pontos e quais armadilhas se distinguiram entre si. A Análise de Mann Whitney foi utilizada para avaliar a ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes tipos de armadilhas nos pontos de captura onde só foram colocadas duas armadilhas, também com auxílio do software IBM SPSS Statistics Version 23.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação das taxas de infecção e disseminação em mosquitos alimentados nos PNHs vacinados

Para o desafio oral dos mosquitos, foram utilizados oito micos-leões em viremia pelo YFV 17DD no terceiro dia pós-vacinação, resultando em um total de 620 mosquitos ingurgitados e sobreviventes ao final de 14 ou 21 dpi (Tabela 1). Ao todo, foram 270 *Ae. aegypti*, 127 *Sa. albiprivus*, 77 *Sa. identicus*, 141 *Hg. leucocelaenus* e 5 *Hg. janthinomys/capricornii*.

**Tabela 1: Total dos mosquitos desafiados oralmente nos primatas não-humanos (PNHs) virêmicos no 3º dia após receberem a vacina de vírus da febre amarela atenuado 17DD, do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Guapimirim, Rio de Janeiro, segundo a espécie de mosquito e período de incubação após a alimentação nos primatas.**

<b>Espécie</b>	<b>Mosquitos alimentados</b>	<b>14 dpi</b>	<b>21 dpi</b>	<b>Total</b>
<i>Ae. aegypti</i>	296	129	141	270
<i>Hg. leucocelaenus</i>	166	141	-	141
<i>Hg. janthinomys/capricornii</i>	5	5	-	5
<i>Sa. albiprivus</i>	152	127	-	127
<i>Sa. identicus</i>	77	77	-	77
Total	696	479	141	620

dpi: dias após o desafio oral em micos-leões virêmicos

A maioria dos insetos (N= 479, 77.3 %) foi examinada no 14º d.p.i., e apenas exemplares de *Ae. aegypti* foram examinados tanto com duas quanto com três semanas devido à maior disponibilidade. O número de mosquitos que se alimentou e sobreviveu por 14 dias após a alimentação nos micos-leões variou segundo a espécie, sendo resultado de suas características biológicas e comportamentais ou da disponibilidade de fêmeas para os ensaios.

Na Tabela 2, detalhamos o número de mosquitos, por espécie e período de incubação, segundo o espécime de mico-leão em foram alimentados e as respectivas viremias. Os micos-leões vacinados que serviram de fonte de infecção para os mosquitos apresentaram viremia com título viral variando entre  $1,05 \times 10^3$  pfu/mL e  $6,61 \times 10^3$  pfu/mL.

Todos os 620 mosquitos tiveram os corpos analisados para determinação da taxa de infecção (TI). Todas as amostras analisadas após 14 e 21 d.p.i apresentaram resultado negativo, ou seja, não houve sustentação da infecção pelo YFV em nenhum dos mosquitos analisados, alimentados nos PNHs vacinados com a vacina 17DD no 3º dia após a vacinação (Tabela 2). Ainda que não se tenha detectado infecção em nenhum mosquito a despeito do período de incubação e da intensidade da viremia dos animais, analisamos as cabeças dos mosquitos alimentados nos dois micos-leões (códigos 3617 e 2435) que apresentavam os mais altos títulos virais no sangue ingerido pelos insetos para a determinação da taxa de disseminação (TD). Foram quatro grupos de mosquitos, de três espécies diferentes, alimentados nesses dois micos-leões (Tabela 2). Não foi detectado genoma viral na cabeça desses mosquitos e, portanto, não houve disseminação do vírus vacinal atenuado 17DD para tecidos secundários dos insetos. Como os mosquitos alimentados nos primatas com as maiores viremias foram negativos para a disseminação, as cabeças dos mosquitos alimentados nos animais com viremias mais baixas e já diagnosticados negativamente para a infecção não foram analisadas para se determinar a TD. Uma vez que a instalação e manutenção da infecção no intestino médio é pré-requisito para a disseminação para tecidos secundários e a disseminação é pré-requisito para a infecção da glândula salivar e eliminação do vírus na saliva, não examinamos as salivas dos mosquitos para a determinação da taxa de transmissão.

**Tabela 2: Espécie de mico-leão, viremia no momento da alimentação dos mosquitos e número de mosquitos, por espécie, examinados segundo o dia após a alimentação nos primatas (d.p.i.) virêmicos no 3º dia após receberem a vacina de vírus da febre amarela atenuado 17DD no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro**

Espécie de mico-leão (código do animal)	Viremia (PFU/ml)	Mosquitos	N total	14 dpi	21 dpi	TI *	TD**
<i>Leontopithecus rosalia</i> (3617)	6,61 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. identicus</i>	15	-	15	0	0
		<i>Ae. aegypti</i>	34	34	-	0	0
<i>Leontopithecus rosalia</i> (2435)	5,37 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. albiprivus</i>	21	21		0	0
		<i>Ae. aegypti</i>	28		28	0	0
<i>Leontopithecus chrysomelas</i> (3504)	3,63 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. albiprivus</i>	13	13	-	0	ND
		<i>Ae. aegypti</i>	36		36	0	ND
<i>Leontopithecus chrysomelas</i> (3408)	3,54 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. albiprivus</i>	12	12	-	0	ND
		<i>Sa. identicus</i>	7	7	-	0	ND
		<i>Hg. leucocelaenus</i>	46	46	-	0	ND
		<i>Ae. aegypti</i>	17	17	-	0	ND
<i>Leontopithecus chrysomelas</i> (3644)	3,31 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. albiprivus</i>	30	30	-	0	ND
		<i>Sa. identicus</i>	15	15	-	0	ND
		<i>Hg. leucocelaenus</i>	53	53	-	0	ND
		<i>Ae. aegypti</i>	32	32	-	0	ND
<i>Leontopithecus chrysomelas</i> (3595)	2,75 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. albiprivus</i>	40	40	-	0	ND
		<i>Sa. identicus</i>	29	29	-	0	ND
		<i>Hg. janthinomys</i>	5	5	-	0	ND
		<i>Hg. leucocelaenus</i>	42	42	-	0	ND
		<i>Ae. aegypti</i>	42	42	-	0	ND
<i>Leontopithecus chrysopygus</i> (3533)	1,12 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. albiprivus</i>	11	11	-	0	ND
		<i>Ae. aegypti</i>	43	-	43	0	ND
<i>Leontopithecus chrysopygus</i> (2266)	1,05 x 10 <sup>3</sup>	<i>Sa. identicus</i>	11	11	-	0	ND
		<i>Ae. aegypti</i>	38	38	-	0	ND

\*TI: taxa de infecção; \*\*TD: taxa de disseminação.

## 4.2 Determinação das taxas de infecção e disseminação dos mosquitos desafiados oralmente em laboratório

Como explicamos, realizamos experimentos complementares com o objetivo de comparar os resultados destes com os desafios orais dos mosquitos alimentados diretamente nos micos-leões virêmicos cujos resultados acabamos de descrever. Assim, lotes dos mosquitos *Ae. aegypti*, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. albiprivus* foram desafiados oralmente com misturas de glóbulos vermelhos de coelho e sobrenadante de cultura celular contendo o vírus vacinal 17DD, oferecidas em duas diluições diferentes:  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^7$  PFU/mL. Após 14 dias de incubação, os mosquitos foram submetidos à salivagem forçada, para determinação posterior da taxa de transmissão (TT) e, posteriormente, foram guardados os corpos e cabeças para análise posterior das taxas de infecção (TI) e disseminação (TD), respectivamente, como feito nos mosquitos alimentados diretamente nos micos-leões.

Foram testados 59 *Ae. aegypti*, 48 *Hg. leucocelaenus* e 48 *Sa. albiprivus*, sendo 71 e 84 mosquitos alimentados com a mistura contendo a carga viral de  $1 \times 10^4$  e para  $1 \times 10^7$ , respectivamente, totalizando, nesse experimento, 155 mosquitos examinados (Tabela 3).

Não foi detectada infecção ou disseminação em nenhum dos mosquitos alimentados com a mistura contendo a carga viral de  $1 \times 10^4$  pfu/mL. Nos mosquitos alimentados com a diluição contendo a carga viral de  $1 \times 10^7$  pfu/mL, a taxa de infecção para *Ae. aegypti* foi de 13 % e para *Hg. leucocelaenus* de 17 %, enquanto não se detectou infecção em nenhum *Sa. albiprivus*. Não foi detectada disseminação em nenhum mosquito infectado ou não infectado. Em vista desse resultado, não se examinaram as amostras de saliva dos mosquitos.

**Tabela 3: Parâmetros determinantes da competência vetorial avaliados em fêmeas de *Aedes aegypti*, *Sa. albiprivus* e *Hg. leucocelaenus* experimentalmente desafiadas por via oral com duas diluições diferentes do vírus vacinal 17DD, após 14 dias de incubação.**

Carga Viral	Espécie	Corpos positivos (total)	TI (%)	TD (%)
$10^4$	<i>Ae. aegypti</i>	0 (29)	0	0
	<i>Hg. leucocelaenus</i>	0 (19)	0	0
$10^7$	<i>Ae. aegypti</i>	4 (30)	13	0
	<i>Sa. albiprivus</i>	0 (25)	0	0
	<i>Hg. leucocelaenus</i>	5 (29)	17	0

\*TI: taxa de infecção; \*\*TD: taxa de disseminação.

### 4.3 Abundância dos mosquitos (*Culicidae*) capturados no CPRJ

Após a realização de um ano de coleta, foi coletado um total de 9.349 espécimes (Tabela 4), obtidos em quatro diferentes tipos de coletas, sendo as mais proveitosas aquelas de ovos feitas com as palhetas de ovitrampas (51,1%), seguidas das realizadas com BG-Sentinel com atrativo de CO<sub>2</sub> (35,0%). Considerando-se apenas as coletas dos adultos, foram obtidos 3.733 espécimes, tendo em sua maioria capturados através da armadilha BG-Sentinel (87,7%) e o restante coletados em capturas através da AHPE utilizando o capturador de Castro (12,3%). No que concerne às coletas de imaturos em ovitrampas, obtivemos um total de 5.616 espécimes, sendo a maioria provenientes dos ovos encontrados nas palhetas (85,0%), enquanto uma pequena porcentagem resultou das larvas e pupas coletadas nas águas das ovitrampas (15,0%).

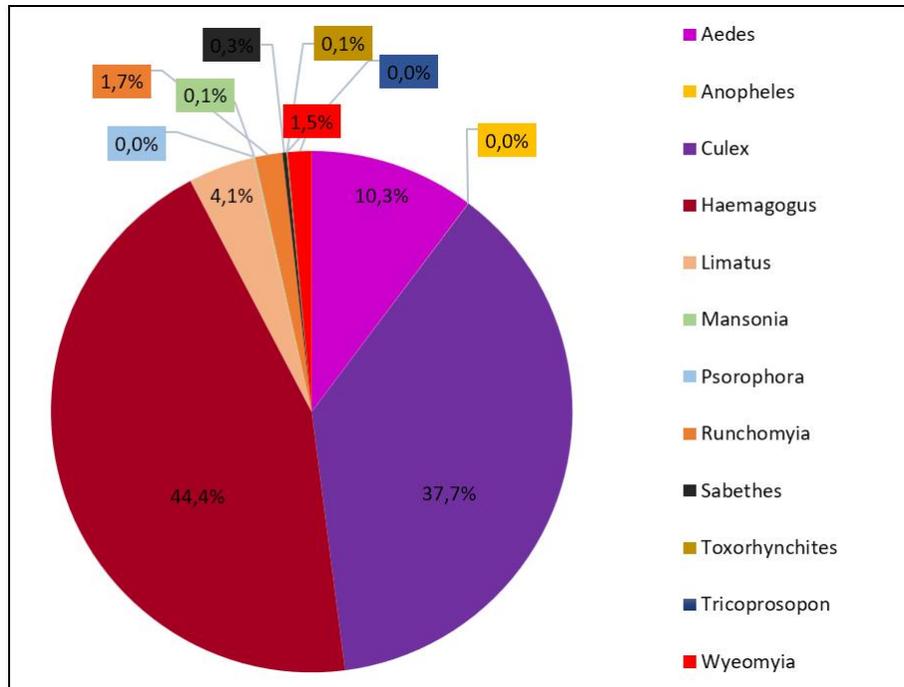
Houve cinco espécies coletadas através de todos os métodos empregados (ovitrampa, BG-Sentinel e AHPE), como os vetores primários do vírus da febre amarela, *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys/capricornii*, assim como *Ae. albopictus*, *Ae. terrens* e *Li. durhamii* (Tabela 4). Por outro lado, algumas espécies foram coletadas apenas com AHPE, não comparecendo em coletas com BG-Sentinel ou ovitrampas, mesmo que estas últimas tenham operado ininterruptamente durante 13 meses. Foram elas: *An. cruzii*, *Ps. ferox*, *Ru. cerqueirai*, possivelmente *Wy. incaudata* (?) e *Wy. theobaldi*, e os vetores secundários da febre amarela *Sa. chloropterus* e *Sa. albiprivus*. As *Mansonia* spp., assim como o único *Trichoprosopon* sp. e *Wy. confusa* só foram coletados com auxílio de BG-Sentinel. Em contraste, *Ae. aegypti*, *Li. pseudomethysticus* e o predador *Toxorhynchites* sp. só foram capturados com o uso de ovitrampa.

**Tabela 4: Número absoluto dos espécimes coletados, dentre adultos e imaturos, através de todos os métodos de captura utilizados neste trabalho, no conjunto dos pontos amostrais da área do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), município de Guapimirim, no estado do Rio de Janeiro.**

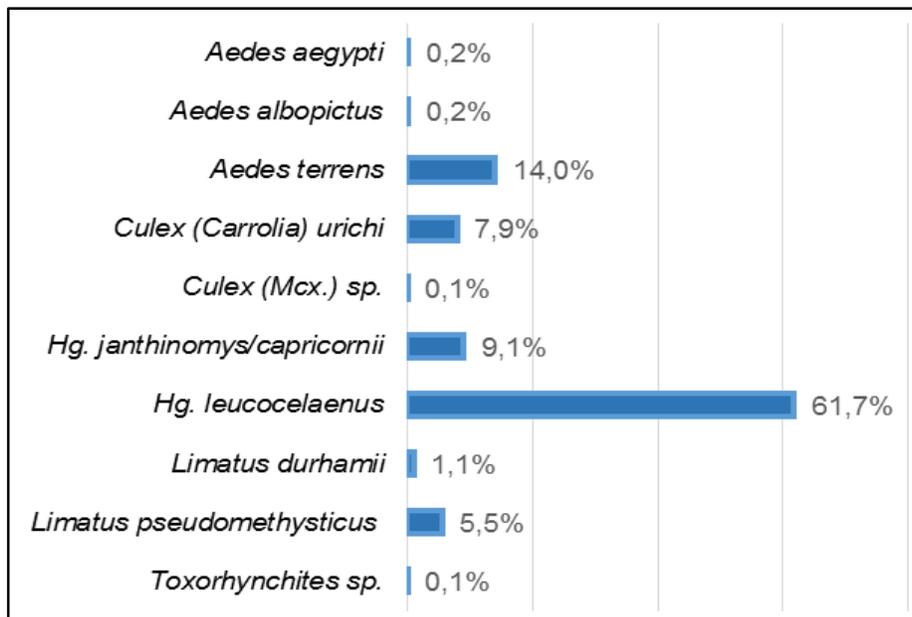
Gênero/Espécie	AHPE	BG	OVITRAMPA		TOTAL
			PALHETA	ÁGUA	
<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus)	0	0	14	0	14
<i>Aedes albopictus</i> (Skuse)	8	2	11	2	23
<i>Aedes scapularis</i> (Rondani)	59	63	0	0	122
<i>Aedes terreus</i> (Walker)	4	8	788	0	800
<i>Anopheles cruzii</i> Dyar & Knab	1	0	0	0	1
<i>Culex urichii</i> (Coquillett)	0	1	0	444	445
<i>Culex (Mcx.) sp.</i>	0	0	0	7	7
<i>Culex spp.</i>	41	3030	0	0	3071
<i>Haemagogus janthinomys</i> Dyar/Hg. <i>capricornii</i> Lutz	54	3	509	0	566
<i>Haemagogus leucocelaenus</i> (Dyar & Shannon)	99	17	3452	13	3581
<i>Limatus durhamii</i> Theobald	11	2	0	60	73
<i>Limatus pseudomethysticus</i> (Bonne-Wepster & Bonne)	0	0	0	311	311
<i>Mansonia titillans</i> (Walker)	0	6	0	0	6
<i>Mansonia sp.</i>	0	1	0	0	1
<i>Psorophora ferox</i> (von Hulboldt)	1	0	0	0	1
<i>Runchomyia cerqueirai</i> (Stone)	2	0	0	0	2
<i>Runchomyia frontosa</i> (Theobald)	24	27	0	0	51
<i>Runchomyia humboldti</i> (Lane & Cerqueira)	17	18	0	0	35
<i>Runchomyia reversa</i> (Lane & Cerqueira)	17	15	0	0	32
<i>Runchomyia sp.</i>	20	19	0	0	39
<i>Sabethes albiprivus</i> Theobald	3	0	0	0	3
<i>Sabethes chloropterus</i> (von Hulboldt)	21	0	0	0	21
<i>Toxorhynchites sp.</i>	0	0	0	5	5
<i>Tricoprosopon sp.</i>	0	1	0	0	1
<i>Wyeomyia incaudata</i> (?) (Root)	2	0	0	0	2
<i>Wyeomyia theobaldi</i> (?) (Lane & Cerqueira)	26	0	0	0	26
<i>Wyeomyia confusa</i> (Lutz)	0	1	0	0	1
<i>Wyeomyia spp.</i>	48	61	0	0	109
Total	458	3275	4774	842	9349

Considerando-se o total de mosquitos coletados através do conjunto de metodologias aplicadas, foram identificados 12 gêneros de mosquitos no CPRJ apresentando diferentes frequências sendo: *Haemagogus* (44,4 %), *Culex* (37,7 %), *Aedes* (10,3 %), *Limatus* (4,1 %), *Runchomyia* (1,7 %), *Wyeomyia* (1,5 %), *Sabethes* (0,3 %), *Mansonia* (0,1 %), *Toxorhynchites* (0,1 %), *Anopheles* (0,01 %), *Psorophora*

(0,01 %) e *Tricoproson* (0,01 %) (Figura 12). Foi detectada a ocorrência de 21 espécies (Tabela 4), sem se considerar os indivíduos cuja identificação específica não foi possível, em especial aqueles dos gêneros *Culex* e *Wyeomyia*.



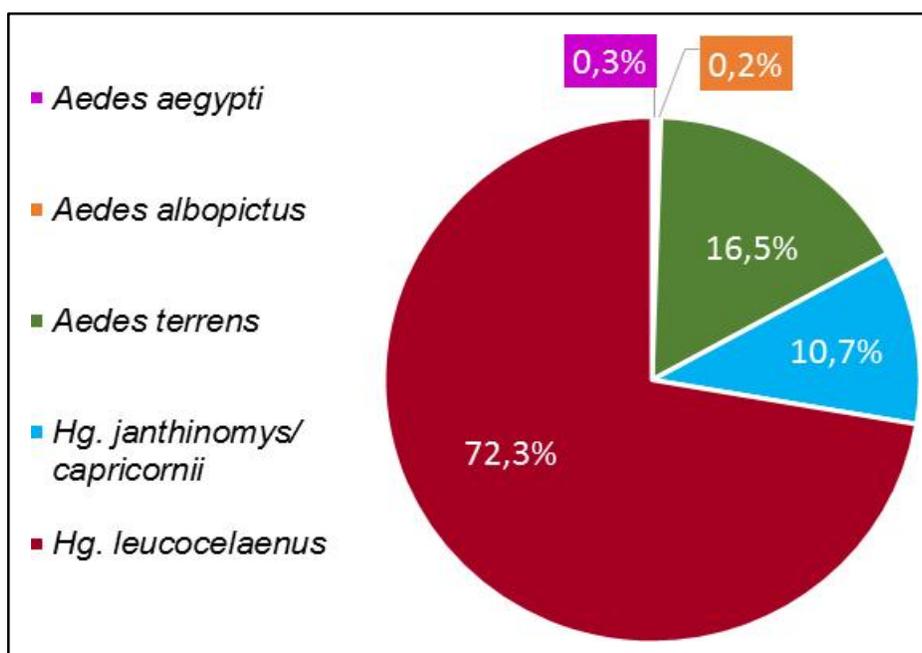
**Figura 12:** Percentual por gênero dos espécimes coletados, através da captura de imaturos (ovos, larvas e pupas) e adultos, coletados por todas as metodologias empregadas neste estudo, no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, no período de um ano (dez/2018 a dez/2019).



**Figura 13:** Abundância dos imaturos (ovos, larva e pulas), coletados através de ovitrampas (água e palhetas), coletados no entorno do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, no período de um ano, no conjunto dos pontos amostrais.

#### 4.3.1 Abundância dos imaturos

As coletas dos imaturos (ovos, larvas e pupas) foram realizadas quinzenalmente, durante um período de 13 meses, perfazendo 26 amostragens. Foram um total de 2.808 palhetas coletadas, que resultaram em 4.774 mosquitos eclodidos a partir dos ovos nelas obtidos. Somando-se a esses os adultos emergidos de 842 de larvas e pupas achados na água das ovitrampas. As espécies mais abundantes dentre todos os imaturos coletados com ovitrampas foram *Hg. leucocelaenus* (61,7 %), *Aedes terreus* (14 %) e *Hg. janthinomys/capricornii* (9,1 %) (Figura 13), sendo estas também as mais abundantes entre os adultos emergidos a partir dos ovos coletados, com 72,3 %, 16,5 % e 10,7%, respectivamente (figura 14). Em contrapartida, considerando-se apenas os imaturos obtidos na água das ovitrampas, as espécies com maior abundância foram *Culex (Carrolia) urichi* (52,7 %) e *Limatus pseudomethysticus* (36,9%) (Figura 15).



**Figura 14:** Abundância dos mosquitos obtidos através dos ovos coletados em palhetas de ovitrampas no CPRJ, no período de um ano, em todos os pontos amostrais.

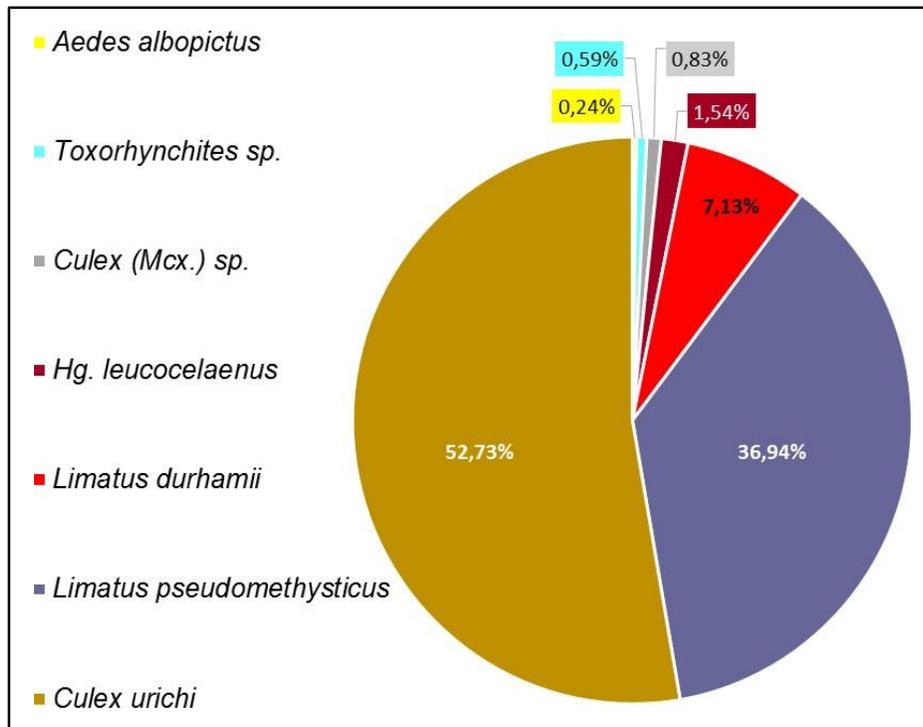
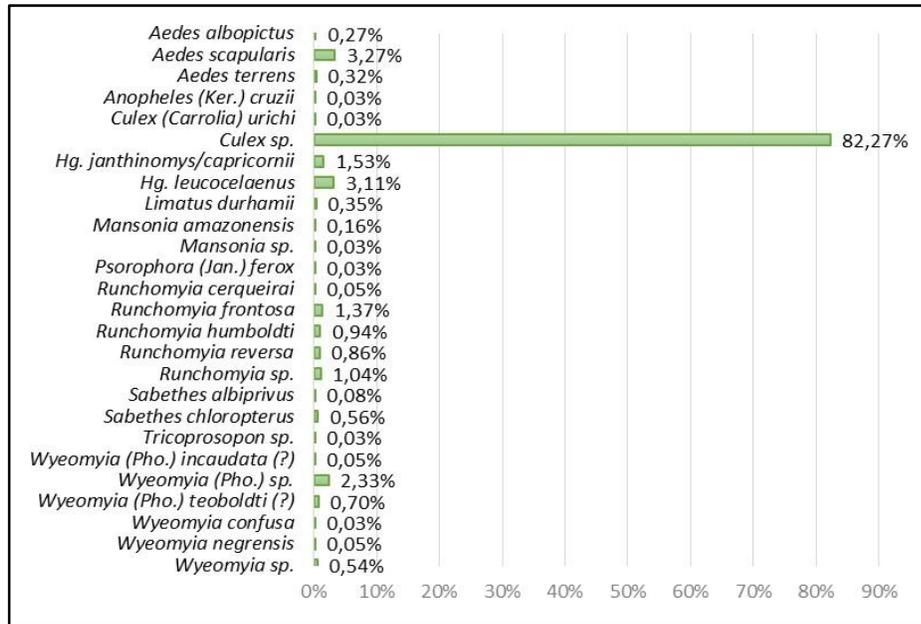


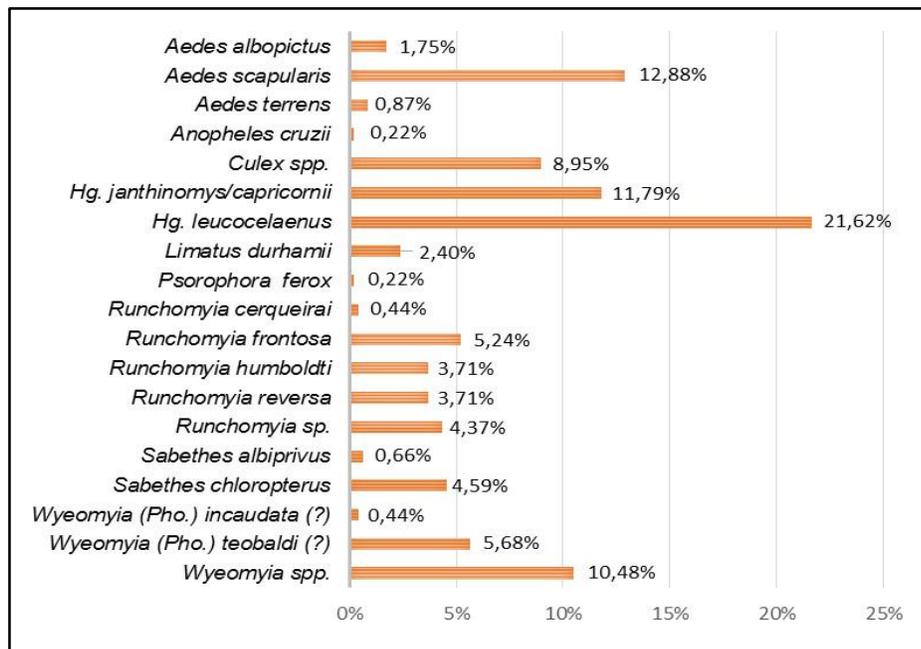
Figura 15: Abundância dos mosquitos obtidos através de imaturos (larvas e pupas), em ovitrampas no CPRJ, no período de um ano, em todos os pontos amostrais.

#### 4.3.2 Abundância dos adultos

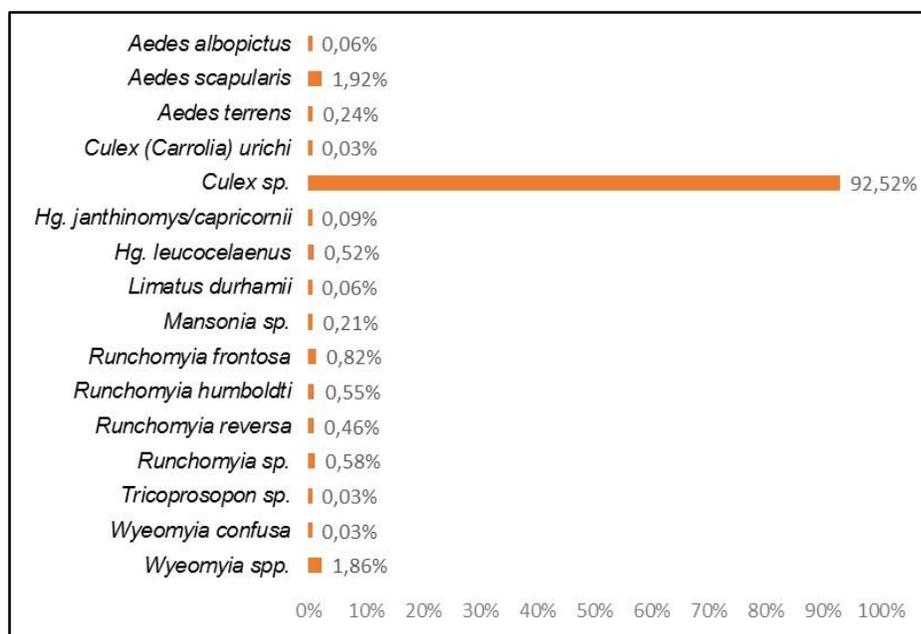
Ao analisarmos apenas a coleta dos adultos com a armadilha BG-Sentinel e captura através da AHPE, observamos que *Culex sp.* (82,2 %) apresentou maior abundância (Figura 16) quando reunimos os resultados das coletas. Entretanto, espécies como *Ae. scapularis* (3,27 %) e *Hg. leucocelaenus* (3,11 %), apesar do percentual baixo em relação ao *Culex sp.*, apresentaram, no geral, uma abundância destacável em relação as demais taxas. Porém, a composição da fauna e abundância modificam-se ao analisarmos os resultados das coletas dos adultos separadamente segundo o tipo de captura. Desta forma, foi possível observar que *Hg. leucocelaenus* (21,7 %) demonstra ter maior abundância, seguido de *Ae. scapularis* (12,9 %) na captura através da AHPE, onde *Culex sp.* representou menos de 9 % (Figura 17). Em contraste, *Culex sp.* correspondeu a 92,5 % do coletado com a armadilha BG-Sentinel contendo CO<sub>2</sub> como atrativo (Figura 18).



**Figura 16:** Abundância geral entre os adultos coletados por BG e AHPE no CPRJ em oito meses de coleta (dez/2018 a mar/2019 e jun/2019 a set/2019).



**Figura 17:** Abundância dos adultos coletados através da AHPE no CPRJ, em oito meses de coleta (dez/2018 a mar/2019 e jun/2019 a set/2019)



**Figura 18:** Abundância dos adultos coletados através da armadilha BG-Sentinel no CPRJ em oito meses de coleta (dez/2018 a mar/2019 e jun/2019 a set/2019)

#### 4.4 Abundância segundo o ponto de coleta

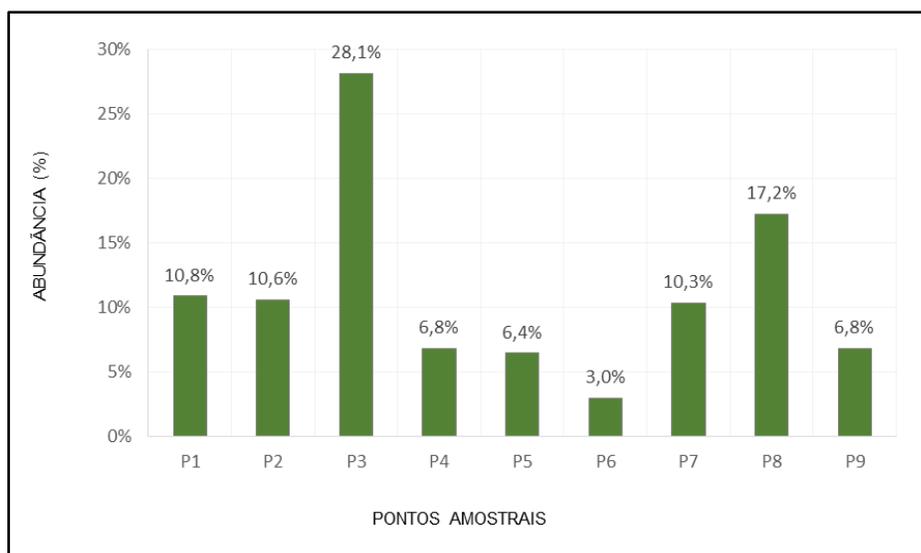
Considerando que as coleta dos adultos e imaturos não foram realizadas igualmente em todos os pontos, ou seja, não houve combinação de todos os tipos de coleta em todos os pontos. As análises de abundância, riqueza e frequência somente foi possível de ser realizada para os imaturos coletados (Pontos 1 a 9). As análises em questão, para os adultos, foram realizadas separadamente entre os tipos de coleta (BG-Sentinel e AHPE), uma vez que foram realizadas em pontos em número e locais diferentes ainda que próximos e com número distinto de horas gastas em coleta (Tabela 5).

Em relação à abundância dos espécimes coletados na forma imatura por ponto amostral, observamos que houve significativa heterogeneidade na quantidade de imaturos obtidas nos nove pontos de coleta (P1-P9; Kruskal-Wallis  $p = 0,01$ ) e que, no geral, o ponto P3 (28,1 %) apresentou maior abundância de espécimes dentre todos os pontos amostrados com ovitrampas (imaturos), seguido do P8 (17,2 %)

(Figura 19). Quando consideramos separadamente o coletado como ovo (paletas) e na água das ovitrampas (larvas e pupas) verificamos que em todos os pontos a abundância de ovos presentes nas palhetas era maior que de larvas e pupas, exceto no ponto P6 (Figura 20).

**Tabela 5: Número absoluto de espécimes coletados no CPRJ por ponto amostral e por tipo de coleta, no período de um ano (dez/2018 a dez/2019).**

		ADULTOS E IMATUROS					APENAS IMATUROS				APENAS ADULTOS		
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
IMATUROS	ÁGUA DE OVITRAMPAS	75	20	109	160	35	94	63	113	173	-	-	-
	PALHETAS	534	573	1468	223	326	73	515	853	209	-	-	-
ADULTOS	BG	432	441	298	418	1686	-	-	-	-	-	-	-
	AHPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	103	221	134

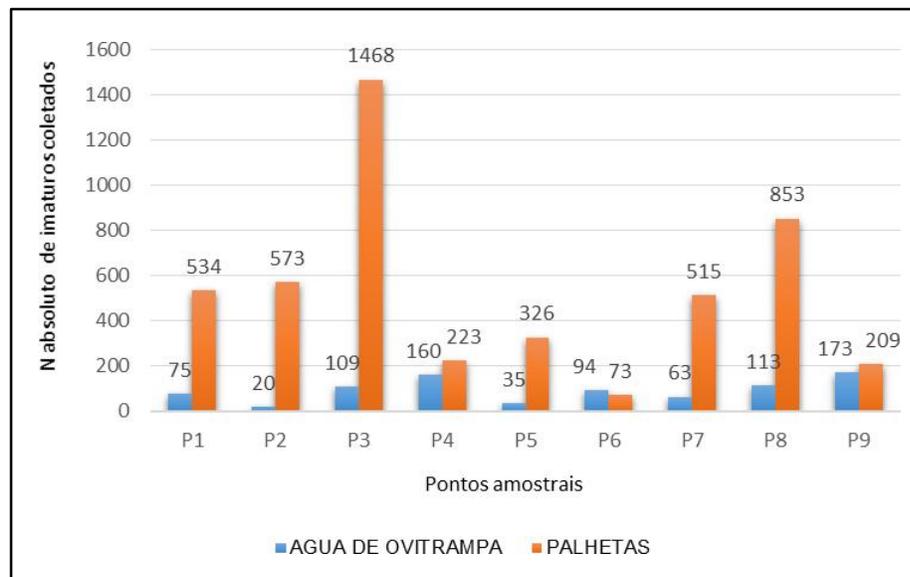


**Figura 19:** Abundância dos imaturos (ovos, larva e pupas) por ponto de coleta, obtidos a partir de palhetas e água de ovitrampas no CPRJ

O pós-teste de Dunn foi utilizado para observarmos quais pontos de coletas de imaturos (P1-P9) apresentavam diferenças significativas na abundância ( $p < 0,05$ ). O ponto que mais se diferencia é o P6, com o menor número de espécimes coletadas dentre todos (167), apresentando diferenças significativas em relação aos pontos P1, P2, P3, P4 e P5 (0,012; 0,019; 0,013; 0,002 e 0,005), com 609, 593, 1577, 383 e 361 espécimes coletados, respectivamente. Após o P6, os pontos P4 e P5 são os que mais apresentam diferenças significativas entre os outros pontos, assim como as menores abundâncias. O ponto P4 se distingue dos pontos P6 a P9 (0,002; 0,027; 0,013 e 0,024), com 167, 578, 966 e 382 espécimes respectivamente, enquanto que o P5 se diferencia dos pontos P6, P8 e P9 (0,005; 0,027 e 0,047).

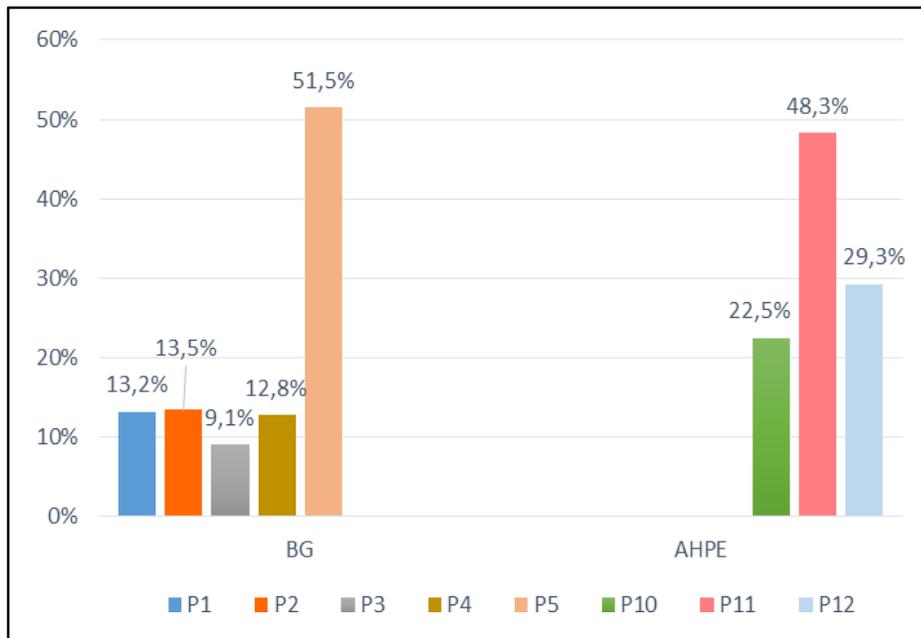
Analisando-se separadamente cada um dos pontos (P1-P5), a análise de Kruskal-Wallis indicou diferenças significativas entre os diferentes tipos de armadilhas (BG-Sentinel, água de ovitampas e palhetas) para os pontos P2, P4 e P5 (P2:  $p = 0,037$ ; P4:  $p = 0,000$ ; e P5:  $p = 0,017$ ). O pós-teste de Dunn indicou que nesses três pontos, a abundância na BG-Sentinel se distingue tanto da observada nas coletas com palhetas quanto na água das ovitampas.

A análise de Mann-Whitney foi utilizada para os P6 a 9, onde foram colocadas apenas ovitampas, não havendo diferença significativa entre o coletado nas palhetas e na água da ovitampas operadas em cada ponto.



**Figura 20:** Distribuição dos imaturos coletados no CPRJ por ponto amostral e tipo de coleta.

Os adultos coletados através da BG-Sentinel foram mais abundantes no P5 (51,5 %) (Figura 21; Tabela 5), tendo os outros pontos (P2 a P5) uma distribuição praticamente uniforme, ficando entre 9,1% (P3) e 13,5% (P2). Porém, as coletas através da AHPE foram proporcionalmente mais abundantes no ponto P11 (48,3 %) (Figura 21), embora não tenha havido diferença significativa (Kruskal-Wallis,  $p = 0,50$ ) entre o rendimento das capturas feitas nos pontos designados para este tipo de método (P10 a P12).



**Figura 21:** Abundância de Culicídeos coletados na forma adulta, através da BG-Sentinel e AHPE no CPRJ, segundo o ponto de coleta

#### 4.5 Distribuição espacial: riqueza e diversidade de espécies

Ao analisarmos as espécies encontradas por ponto amostral (tabelas 6 e 7), independentemente do tipo de coleta e a fase de vida do inseto capturado, poderemos observar que, ainda que o P5 tenha sido onde se coletaram mais espécimes ( $N = 2.047$ ), os pontos P4 (a 400m mata dentro) e P11 foram os que apresentaram maior riqueza de espécies, ou seja, maior número de espécies. Os pontos com as maiores diversidades, cujo cálculo baseia-se na abundância relativa de cada espécie, foram os P11 e P12, coincidentemente correspondentes a locais

de coletas com AHPE, respectivamente localizados dentro da mata e no ecótono próximo ao centro geográfico das instalações do CPRJ. Foi também coincidentemente nos três pontos de coletas com AHPE (P10 a P12) onde se observaram os maiores valores de equitabilidade, ou seja, onde houve melhor distribuição dos espécimes de cada espécie, sem ocorrência de espécies claramente dominantes (tabela 6).

**Tabela 6: Riqueza, diversidade e equitabilidade dos espécimes de Culicídeos obtidos nas formas imatura e adulta no período de um ano, no entrono do CPRJ, por ponto de coleta. Os valores mais elevados estão destacados em negrito.**

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Riqueza (S)	13	14	13	<b>16</b>	15	4	7	6	7	14	<b>16</b>	15
Espécimes	1041	1034	1875	801	<b>2047</b>	167	578	966	382	103	221	134
Diversidade de Shannon (H')	1.475	1.206	1.333	1.687	0,87	0,97	1.223	0,77	1.304	2.159	<b>2.425</b>	<b>2.402</b>
Equitabilidade de Shannon (J)	0,57	0,46	0,520	0,6	0,32	0,7	0,63	0,43	0,670	<b>0,797</b>	<b>0,856</b>	<b>0,866</b>

Quando comparamos a riqueza de espécies entre os pontos onde houve coleta combinada de imaturos e adultos (P1 a P5), o ponto P4 apresentou maior riqueza, apesar de ter o menor número de espécimes coletados dentre estes pontos. Nos pontos onde houve somente coleta de imaturos (P6 a P9), notamos que os pontos P7 e P9 apresentaram maior riqueza de espécies. Já os pontos nos quais foram realizadas apenas a captura de adultos, através da AHPE (P10 a P12), observamos que a maior riqueza de espécies ocorreu no ponto P11 (tabela 6).

Quando comparamos a diversidade (H') entre os pontos (Teste t, 95% probabilidade) observamos que houve diferença significativa entre eles, exceto entre os P1 e P4, o P2 em comparação tanto com o P7 quanto o P9, entre P3 e P9, o P4 e P10, P5 e P6, P7 e P9, e P11 e P12. Assim, embora localizado em ambiente modificado, no centro geográfico do CPRJ, teve diversidade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que todos os demais pontos onde foram feitas coletas também com BG-sentinela, exceto quando comparado ao P4, localizado a 400 m dali, dentro da mata. Não houve diferença na diversidade entre os dois pontos de ambiente selvagem

mais preservado (P3 e P4). Mas, quando considerados os pontos a 200m (P2, P5 a P9) do centro geográfico do CPRJ (P1), verificou-se que a diversidade foi heterogênea, com desvantagem para os P5, P6 e P8 em relação aos demais.

**Tabela 7:** Distribuição das espécies coletadas através de quatro diferentes tipos de coletas, no entorno do CPRJ, por ponto amostral. As linhas sombreadas correspondem às espécies vetoras primárias e secundárias do YFV.

ESPÉCIES/PONTO	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
<i>Aedes aegypti</i>	-	-	12	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Aedes albopictus</i>	-	-	5	1	-	-	4	-	5	2	-	6
<i>Aedes scapularis</i>	10	19	6	4	24	-	-	-	-	15	19	25
<i>Aedes terreus</i>	361	6	301	26	14	-	84	-	4	-	3	1
<i>Anopheles cruzii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Culex urichi</i>	41	15	61	81	12	4	39	74	118	-	-	-
<i>Culex (Mcx.) sp.</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	6	-	-	-
<i>Culex sp.</i>	403	397	263	373	1594	-	-	-	-	5	23	13
<i>Haemagogus janthinomys/capricornii</i>	29	74	78	50	82	-	83	95	21	13	22	19
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	147	498	1096	154	233	73	344	756	181	35	44	20
<i>Limatus durhamii</i>	19	-	17	15	1	10	-	-	-	4	2	5
<i>Limatus pseudomethysticus</i>	15	4	18	66	21	80	23	37	47	-	-	-
<i>Mansonia titillans</i>	1	1	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mansonia sp.</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psorophora ferox</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Runchomyia cerqueirai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
<i>Runchomyia frontosa</i>	2	-	12	2	11	-	-	-	-	1	8	15
<i>Runchomyia humboldti</i>	-	2	5	-	11	-	-	-	-	7	4	6
<i>Runchomyia reversa</i>	2	2	-	1	10	-	-	-	-	-	10	7
<i>Runchomyia sp.</i>	4	6	-	7	2	-	-	-	-	7	7	6
<i>Sabethes albiprivus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
<i>Sabethes chloropterus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	15	3
<i>Toxorhynchites sp.</i>	-	1	-	-	2	-	-	2	-	-	-	-
<i>Tricoproson sp.</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Wyeomyia (Pho.) incaudata (?)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Wyeomyia (Pho.) teoboldti (?)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	-
<i>Wyeomyia confusa</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Wyeomyia sp.</i>	7	8	1	17	28	-	-	-	-	8	35	5
<b>Total</b>	<b>1041</b>	<b>1034</b>	<b>1875</b>	<b>801</b>	<b>2047</b>	<b>167</b>	<b>578</b>	<b>966</b>	<b>382</b>	<b>103</b>	<b>221</b>	<b>134</b>

Foi notável a distribuição das espécies vetoras primárias do YFV nos locais de coleta (Tabela 7). A espécie *Hg. leucocelaenus* foi encontrada em todos os pontos e *Hg. janthinomys* só não foi coletada no P6. A biologia e hábitos das espécies influenciaram a sua distribuição. As espécies que não desovam em recipientes abertos, como ovitrampas, não foram coletadas nos pontos onde só este método de coleta foi usado, ou seja, P6 a P9. A distribuição de *Ae. scapularis* é um exemplo claro, uma vez que essa espécie foi encontrada apenas nos locais de coletas de adultos (com BG-Sentinels e AHPE). Esse comportamento também compartilhado pelas espécies de *Runchomyia* e *Wyeomyia*. Algumas espécies parecem ter tido a distribuição espacial ainda mais influenciada pelo método de coleta que pelo ponto de captura, como foi o caso das duas espécies de *Sabethes*, coletadas apenas nos pontos onde se realizaram capturas com AHPE (P10-P12).

Quando analisamos a similaridade entre os pontos de coleta [Similaridade de Sørensen (IS)], verificamos que a mais alta similaridade ( $IS > 0,81$ , ) foi encontrada entre os pontos onde se realizaram capturas apenas com AHPE, resultado que, novamente, possa indicar que o método de coleta influenciou mais na composição da fauna capturada que a localização. Ao compararmos os pontos onde houve coletas de adultos com BG e imaturos com ovitrampas (P1 a P5), observamos similaridade consideravelmente alta para todas as comparações por pares entre elas (IS variando de 0,59 a 0,83). Dentre essas comparações é interessante ressaltar aquela entre o ponto de ambiente mais modificado (P1) com os localizados mais dentro da mata (400 m), ou seja, P3 e P4, onde altos valores de similaridade foram igualmente detectados (IS= 0,69) (P1 x P3) e 0.80 (P1 xP4). A menor similaridade (IS= 0,18) foi detectada nas comparações do capturado em dois dos pontos localizados onde só operaram ovitrampas, localizados a 200 m do P1, ou seja, P6 e P8, com os demais pontos da mesma distância ou não.

**Tabela 8: Valores de similaridade de Sørensen (IS) entre o resultado da captura de mosquitos nos pontos (P1 a P12) no CPRJ. Os valores em negrito representam os pontos com as mais altas similaridades entre eles.**

IS	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
P1	*	<b>0,74</b>	<b>0,69</b>	<b>0,80</b>	<b>0,79</b>	0,33	0,40	0,32	0,40	<b>0,57</b>	<b>0,67</b>	<b>0,69</b>
P2		*	<b>0,59</b>	<b>0,71</b>	<b>0,83</b>	0,33	0,48	<b>0,50</b>	0,48	0,48	<b>0,58</b>	<b>0,60</b>
P3			*	<b>0,67</b>	<b>0,64</b>	0,47	<b>0,60</b>	<b>0,53</b>	<b>0,60</b>	<b>0,57</b>	<b>0,53</b>	<b>0,62</b>
P4				*	<b>0,81</b>	0,38	<b>0,50</b>	0,35	<b>0,50</b>	<b>0,63</b>	<b>0,65</b>	<b>0,73</b>
P5					*	0,42	0,45	0,48	0,45	<b>0,60</b>	<b>0,69</b>	<b>0,71</b>
P6						*	<b>0,55</b>	<b>0,60</b>	<b>0,55</b>	0,21	0,19	0,20
P7							*	<b>0,62</b>	<b>0,86</b>	0,36	0,25	0,35
P8								*	<b>0,62</b>	0,19	0,17	0,18
P9									*	0,27	0,25	0,35
P10										*	<b>0,81</b>	<b>0,84</b>
P11											*	<b>0,85</b>
P12												*

Valores acima de 0,5 indicam alta similaridade.

## 4.6 Abundância e distribuição das espécies por período de coleta.

### 4.6.1 Imaturos

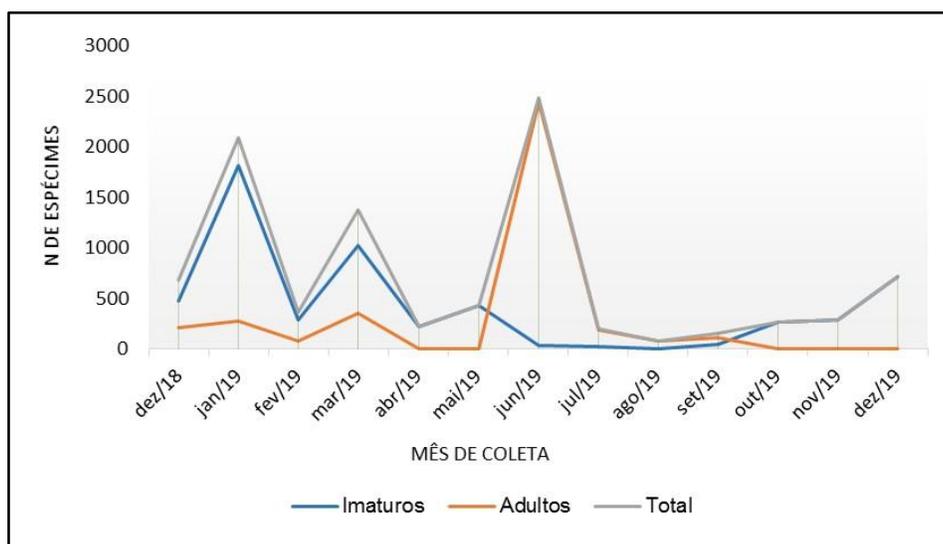
Como explicado, as coletadas dos imaturos foram realizadas quinzenalmente, de dezembro de 2018 a dezembro de 2019, sem interrupção, ou seja, foram realizadas duas coletas por mês durante um ano. Quanto à coleta dos adultos, foram realizadas quatro coletas no período seco e quatro no período chuvoso, ou seja, uma coleta por mês durante quatro meses seguidos no inverno e quatro meses seguidos no verão. As análises por mês de coleta nos permitiram notar que a maior abundância de espécimes imaturos ocorreu no período chuvoso. No entanto, em relação aos adultos, a maior densidade ocorreu no período seco (Tabela 8). Somando-se os resultados de coletas de imaturos e adultos, o mês com a maior abundância foi junho/2019, com 2.483 espécimes, resultado fortemente influenciado pela maior densidade nas coletas de adultos, perfazendo 2.447 exemplares. Entre

os imaturos, o mês com maior abundância de espécimes coletados foi janeiro/2019, com 1.812 exemplares, entre larvas, pupas e ovos em palhetas (figura 22).

**Tabela 9: Número absoluto de espécimes capturados por mês de coleta.**

	dez/18	jan/19	fev/19	mar/19	abr/19	mai/19	jun/19	jul/19	ago/19	set/19	out/19	nov/19	dez/19
Imaturos	477	1812	283	1025	215	433	36	18	0	41	269	287	720
Adultos	206	279	80	347	NR	NR	2447	182	81	111	NR	NR	NR
Total	683	2091	363	1372	215	433	2483	200	81	152	269	287	720

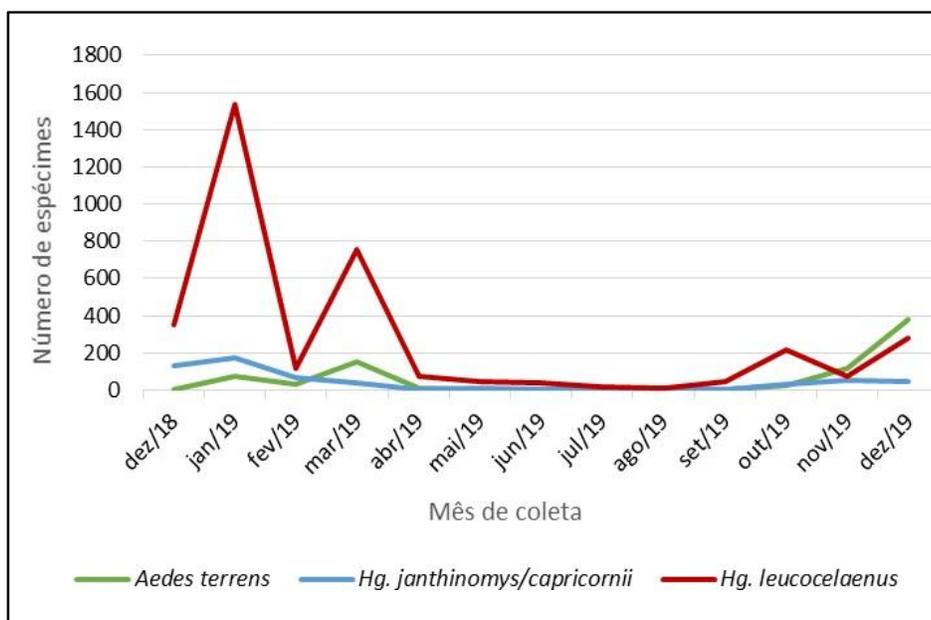
NR: coletas não realizadas para esta fase”.



**Figura 22:** Número absoluto de espécimes capturados por mês de coleta, entre adultos e imaturos

A densidade populacional dos imaturos por período de coleta, foi calculada com base nas espécies que apresentaram maior abundância. Como mostrado na figura 13, *Ae. terrens*, *Hg. janthinomys/capricornii* e *Hg. leucocelaenus* foram as espécies mais capturadas através das ovitrampas, ao longo dos meses utilizados nas coletas. Com base nisso, ao analisarmos de forma geral a densidade populacional destas espécies por mês de coleta, observamos que os picos

populacionais ocorreram nos meses de janeiro e março (figura 23). *Hg. leucocelaenus* foi a espécie mais capturada dentre as três durante o ano de coleta, apresentando pico populacional no mês de janeiro e sendo encontrada em todos os meses. *Ae. terreus*, com a segunda maior densidade dentre as três, foi mais encontrada em dezembro/2019, último mês de coleta, e não foi encontrado nos meses de junho, agosto e setembro. *Hg. janthinomys/capricornii* foi a espécie menos capturada dentre estas, apresentando maior pico populacional no mês de janeiro, não sendo encontrado nas ovitampas nos meses de junho, julho e setembro.

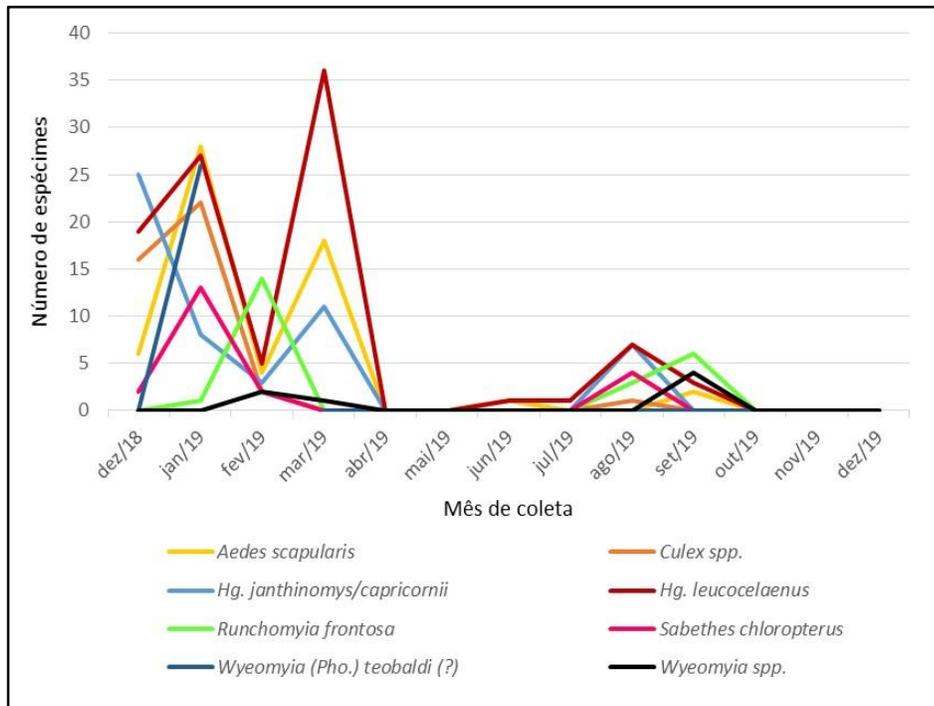


**Figura 23:** Flutuação mensal dos mosquitos imaturos coletados no período de um ano, no CPRJ.

#### 4.6.2 Adultos capturados por AHPE

Da mesma forma, analisamos a flutuação mensal dos mosquitos coletados através da AHPE, com base naqueles que apresentaram as maiores abundâncias. Para esta análise, consideramos àqueles que apresentaram abundância a partir de 5%, com exceção de *Sa. chloropterus*, que devido à sua importância médica, além da importância na transmissão da febre amarela silvestre, foi incluído, apesar da abundância apresentada ser menor que 5% (4,59%) (figura 17).

Dentre as espécies utilizadas nesta análise, nenhuma foi coletada nos meses de abril e maio e outubro a dezembro. A espécie mais capturada, *Hg. leucocelaenus*, apresentou pico populacional no mês de março e não foi capturada através da AHPE nos meses citados com coleta negativa. *Aedes scapularis*, *Culex spp.*, *Sabethes chloropterus* e *Wyeomyia teobaldi* (?) foram mais capturadas no mês de janeiro. *Wyeomyia spp.* foram mais encontradas no mês de setembro.



**Figura 24:** Flutuação mensal dos mosquitos capturados através da AHPE no CPRJ.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Competência vetorial

O recente surto de febre amarela no Brasil atingiu áreas próximas a grandes cidades no Sudeste, não se restringindo a áreas rurais remotas. A presença de vetores silvestres competentes em grande parte das florestas urbanas ou não, a baixa cobertura vacinal nos humanos e a elevada frequência de vertebrados suscetíveis em áreas peri-urbanas, como os PNHs, gerou grande preocupação. A vacinação dos macacos contra o YFV surgiu como uma estratégia de saúde pública, pois colaboraria para a interrupção da transmissão do vírus, além da preservação de espécies ameaçadas de extinção <sup>(146,147)</sup>. A principal vacina empregada contra do YFV em humanos é a de vírus atenuado (17-D ou 17-DD) e, por conseguinte, foi escolhida para a vacinação de PNHs em vista de sua eficácia e segurança. Porém, restava a preocupação de que o vírus vacinal circulante no sangue periférico de PNHs Neotropicais sabidamente muito sensíveis ao YFV pudessem exibir um fenótipo de alta infectividade para mosquito, disseminar até as suas glândulas salivares e ser transmitido. Se isso ocorresse, poderia se estabelecer um processo cíclico e descontrolado de transmissão no ambiente silvestre, entre PNHs e mosquitos silvestres, cuja interação YFV-hospedeiro é pouco conhecida, colocando em risco as características de segurança e estabilidade genética da vacina. Este cenário de transmissão silvestre do vírus vacinal aumentaria os riscos à estabilidade da vacina representados pela possibilidade de recombinação entre vírus selvagem e vacinal durante epizootias, sobretudo em co-infecções (YFV selvagem + YFV-17DD) nos mosquitos, onde a infecção, quando instalada, persiste durante toda a vida do inseto. Com efeito, sabe-se que os *Flavivirus* podem recombinar, o que aumenta a possibilidade de recombinação entre uma cepa vacinal e um vírus selvagem, o que pode potencialmente resultar em um vírus com propriedades potencialmente indesejáveis como, por exemplo, reversão ao fenótipo virulento <sup>(148)</sup>. Assim, o presente estudo combinou investigações de caráter experimental acerca da possibilidade do vírus vacinal ser transmitido na natureza a partir de PNHs vacinados no CPRJ associadas a observações de campo sobre os mosquitos que potencialmente picam os animais deste centro.

No que concerne o segmento experimental, primeiramente realizamos desafios orais através da alimentação de mosquitos em micos-leões vacinados e enviremia pelo YFV-17DD. Na sequência desafiamos oralmente grupos das mesmas espécies de mosquitos com o mesmo vírus através de alimentação artificial empregando dois títulos virais no repasto infectante: um que representasse a viremia mais elevada observada no conjunto de PNHs vacinados no CPRJ ( $1 \times 10^4$  PFU/mL) e outro elevado e que se aproximasse daqueles usados em experimentos semelhantes com o YFV selvagem ( $1 \times 10^7$  PFU/mL).

Nossos resultados mostraram que vírus vacinal YFV-17DD não foi capaz de infectar e, conseqüentemente, de se disseminar para tecidos secundários e ser transmitido por mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* alimentados diretamente em micos-leões vacinados, cujas viremias variavam entre  $1,05 \times 10^3$  e  $6,61 \times 10^3$  pfu/mL. As espécies de mosquito empregadas nos desafios orais através de alimentação diretamente nos micos-leões são reconhecidas vetores da febre amarela urbana e silvestre e têm demonstrado elevada competência vetorial para diferentes linhagens e cepas do YFV selvagem<sup>(85)</sup>. Portanto, as taxas de infecção nulas observada em todos os mosquitos alimentados nos macacos vacinados com YFV-17DD não seria resultado da falta de susceptibilidade dos mosquitos desafiados ao vírus amarelo selvagem, havendo duas principais hipóteses para explicar tal resultado: baixa viremia dos animais e incompatibilidade ao vírus atenuado. É sabido que o título viral no repasto infectante influencia tanto a taxa de infecção quanto o período de incubação extrínseco do vírus no vetor, ou seja, no tempo entre a alimentação infectante e a liberação de vírus na saliva de vetores<sup>(135,149)</sup>.

Resultados semelhantes aos nossos foram observados em uma pesquisa feita por Whitman (1939)<sup>(134)</sup>, porém com a utilização do vírus vacinal YFV-17D e o vetor urbano *Ae. aegypti*. Esse estudo mostrou que fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas em voluntários e macacos rhesus vacinados não se infectaram com o vírus vacinal. O autor verificou que os humanos voluntários e parte dos macacos rhesus vacinados e que serviram de fonte de infecção para os mosquitos apresentaram baixa viremia e nenhum inseto se infectou. Mesmo *Ae. aegypti* alimentados nos macacos que apresentaram viremias mais elevadas do que as observadas nos 29 humanos não se infectaram. Frente a esse resultado, Whitman (1939)<sup>(134)</sup> sugeriu que a quantidade de vírus circulante

em um ser humano vacinado é muito pequena para permitir a infecção por *Ae. aegypti*.

A escolha do terceiro dia para o desafio oral dos mosquitos foi baseada em achados de inoculação de vírus selvagem (Asibi) ou vacinais atenuados em macacos usualmente empregados em estudos sobre vacinas de febre amarela (especialmente rhesus e macaco-verde), onde o pico de viremia se posicionou geralmente de 2 a 4 dpi, dependendo da dose injetada e da via de inoculação<sup>(46,150,151)</sup>. As viremias apresentadas pelos micos-leões no dia da alimentação dos mosquitos em nosso estudo (3 dias após a vacinação) chegaram a  $6,61 \times 10^3$  PFU/mL no máximo, sendo semelhantes às descritas para o YFV-17D em rhesus. Com efeito, a cepa selvagem Asibi do vírus da FA é altamente virulenta aos macacos rhesus, levando à elevada viremia e à morte de 95% dos animais dentro de 4 a 7 dias<sup>(152)</sup>. Em contrapartida, a atenuação da cepa Asibi, através de passagens em série do vírus, resultou na redução da capacidade de produzir alta viremia, ficando os títulos virais no sangue dos rhesus em torno de  $3,0 \log_{10}$  PFU mL<sup>-1</sup> (equivalente a  $1 \times 10^3$  PFU/mL)<sup>(153)</sup>.

De fato, a viremia nos micos-leões vacinados teria sido o fator decisivo na infecção dos mosquitos, quando verificamos que os mosquitos desafiados artificialmente com o YFV-17DD proveniente do mesmo lote usado na vacinação dos micos num repasto contendo a carga viral de  $1 \times 10^4$  PFU/mL não foram capazes de se infectar, enquanto a alimentação com uma carga viral maior, ou seja, de  $1 \times 10^7$  PFU/mL, resultou na infecção de uma parcela dos *Ae. aegypti* e *Hg. leucocelaenus*. Porém a taxa de infecção dos mosquitos foi baixa: de 13 % e 17 % em *Ae. aegypti* e *Hg. leucocelaenus*, respectivamente. Populações brasileiras destas mesmas espécies de mosquitos que utilizamos, quando desafiadas oralmente com o YFV de várias linhagens de origem americana e africana (como é caso do 17-DD) e utilizando-se títulos virais semelhantes ( $1 \times 10^{6.5}$  e  $1 \times 10^7$  PFU/mL), exibiram taxas de infecção geralmente bem acima de 40%<sup>(85)</sup>. Danet et al (2019)<sup>(154)</sup> desafiaram, oralmente e simultaneamente, lotes de *Ae. aegypti* com uma cepa selvagem do YFV do genótipo do Oeste Africano (YFV-DAK) e com o YFV-17D usando o mesmo título viral  $4 \times 10^7$  PFU/mL. Os autores verificaram que, ao 14º dpi, as taxas de infecção para a cepa selvagem foram >90% ao passo que foram < 50% no conjunto de ensaios com o vírus vacinal YFV-17D. Além disso, observaram que a carga viral alcançada no sítio primário de replicação no mosquito, o intestino médio, era 1 a 2

log de partículas infecciosas a menos nos mosquitos desafiados com o YFV-17D que com o YFV-DAK. McElroy et al (2006) <sup>(155)</sup> compararam a cinética da infecção de *Ae. aegypti* desafiados oralmente com a cepa Asibi e o YFV-17D em que o repasto sanguíneo foram essencialmente o mesmo (7 e 7.3 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> e 17D respectivamente). Os autores examinaram triturado do corpo inteiro dos mosquitos e notaram que ambos os vírus apresentaram produção característica após infecção oral de mosquitos, ou seja, uma fase inicial (1<sup>o</sup> a 3<sup>o</sup> dpi), na qual o título de vírus infeccioso diminuiu, seguida de aumento no título que permaneceu constante ou aumentou até o 14<sup>o</sup> dpi. E, igualmente, observaram títulos virais mais altos nos mosquitos infectados por Asibi em comparação com aqueles infectados com 17D, com uma diferença em média de 2 logs, mas essa diferença não foi significativa.

Ainda que a infecção pelo YFV-17DD tenha sido diagnosticada em alguns *Ae. aegypti* e *Hg. leucocelaenus* alimentados artificialmente com título de 1 x 10<sup>7</sup> PFU/mL, a disseminação não foi detectada em nenhum deles, sugerindo que a infecção pelo vírus ficou limitada ao intestino médio. Outros autores também obtiveram resultados similares ao desafiarem fêmeas de *Ae. aegypti* com vírus vacinal YFV-17D <sup>(135,154)</sup> Tem-se verificado que a carga viral no intestino do inseto infectado está diretamente relacionada à chance de haver disseminação e transmissão de flavivírus. Vazeille et al (2019) <sup>(156)</sup> verificaram que uma carga viral no corpo ≥ 4800 cópias virais desencadeou a disseminação e ≥ 12.000 cópias virais desencadeou a transmissão de ZIKV em *Ae. albopictus*. Assim, a baixa carga viral exibida pelo vírus vacinal (17DD ou 17D) relatada nos trabalhos descritos acima <sup>(155,154)</sup> pode ajudar a explicar o fracasso na disseminação deste vírus comparada ao vírus selvagem. Porém, nossos resultados e os estudos comentados acima sugerem que, além do título viral no sangue ingerido, as características do YFV têm importante papel na instalação da infecção dos mosquitos.

Embora o ciclo do YFV no mosquito seja bem conhecido, o papel da genética viral nesses processos não foi ainda totalmente elucidado. Mas, sabe-se que a capacidade vetorial depende sobretudo de interações governadas por fatores genéticos do vetor e do vírus envolvidos <sup>(138,141,157,158)</sup>. A cepa vacinal YFV-17D difere em 68 dos 10.862 nucleotídeos (nt) (aproximadamente 0,63%) da cepa selvagem Asibi de que se originou, o que resulta em 32 aminoácidos (aa) diferentes. É no gene que codifica a proteína E onde existe o maior número de mutações <sup>(34)</sup> e acredita-se que mutações nessa proteína possam ser responsáveis pela alteração

de tropismo viral. Os genomas das duas sub-cepas vacinais (17D-204 e 17DD) não diferem do vírus selvagem Asibi na região 5'-terminal nem no capsídeo, mas sim na 3'-UTR<sup>(38)</sup>.

Vários estudos focaram nos genes das proteínas estruturais virais de *Flavivirus* como sendo os que conteriam os principais determinantes da infecção, mas principalmente a disseminação viral em mosquitos <sup>(155,159-162)</sup>. Estando o maior número de diferenças entre os genomas do YFV da cepa Asibi e o vírus vacinal atenuado (17D ou 17DD) na proteína estrutural do envelope (E), vários destes estudos tanto com o YFV quanto outros arbovírus focaram neste alvo de investigação <sup>(160-163)</sup>. No caso do YFV, um estudo relatou que o gene da proteína E, especificamente o domínio de ligação putativa ao receptor celular III da E, continha determinantes importantes da disseminação viral em *Ae. aegypti* <sup>(155)</sup>. A utilização de clones infecciosos permitiu avanço nas investigações. A observação de que um vírus quimérico contendo genes de proteínas M e E do vírus 17D (replicação restrita ao intestino médio) no vírus Asibi foi capaz de se disseminar, mesmo com taxa de disseminação baixa (31%), sugeriu que alguns determinantes genéticos da disseminação viral no mosquito também podem estar localizados fora da região do gene da proteína estrutural. Ou seja, indicou que alguns determinantes genéticos sobretudo da disseminação do YFV em *Ae. aegypti* devem estar em genes proteicos não estruturais ou na região não codificante 3' (NCR). McElroy et al <sup>(164)</sup> investigaram os papéis da NS2A, NS4B e 3'NCR na disseminação do YFV utilizando quimeras e verificaram que a substituição do 17D NS2A ou NS4B pelo Asibi atenuou significativamente a disseminação do YFV, mas não houve diferença na disseminação após a substituição do 17D 3'NCR. Em conjunto, esses resultados demonstram que a capacidade de disseminação é propriedade multigênica.

Na verdade, vários mecanismos e fatores, não mutuamente exclusivos, poderiam explicar a limitação da infecção e a restrição da disseminação do vírus atenuado vacinal (17D ou 17DD). Danet et al <sup>(154)</sup> verificaram que o YFV-17D não é apenas sensível à barreira de escape do intestino médio em *Ae. aegypti*, mas também à barreira de infecção do intestino médio do vetor que ingeriu o vírus, pois quando injetado via intra-torácica (burlando a barreira de escape), o YFV-17D se replica nos tecidos do intestino tão eficientemente quanto o YFV selvagem. Os autores sugerem que a restrição da replicação do YFV-17D no intestino médio de *Ae. aegypti* ocorre no nível das células epiteliais e que a principal restrição ocorreria

em um estágio anterior à produção de RNA viral. Finalmente, sugerem que a baixa diversidade genética do vírus vacinal atenuado YFV-17D <sup>(165)</sup> comparada ao YFV selvagem seria um fator que poderia contribuir para sua baixa capacidade de infectar e inabilidade em se disseminar em *Ae. aegypti*, citando o fato de que cepas do vírus da encefalite equina venezuelana (*Alphavirus*) capazes de se disseminarem nos mosquitos têm uma diversidade maior do que os que não se disseminaram <sup>(166)</sup>.

Independentemente da espécie, os PNHS vacinados recentemente no CPRJ tiveram viremia que não ultrapassou  $10^4$  PFU/mL. O conjunto de informações disponíveis na literatura que comentamos acima, obtidas com o modelo experimental *Ae. aegypti* – YFV-17D, podem indiretamente sugerir que, ainda que algum primata Neotropical vacinado com o YFV-17DD eventualmente apresente viremia tão elevada quanto  $10^5$  a  $10^7$  PFU/mL a infecção nos mosquitos silvestres deverá ser abortada ou ficar restrita ao intestino médio, não havendo transmissão, como visto no caso dos *Sa. albiprivus* e *Hg. leucocelaenus* aqui desafiados artificialmente, respectivamente.

De fato, nossos dados sugerem que as barreiras do intestino médio ao vírus vacinal atenuado 17-DD, especialmente a barreira de infecção, sejam mais importantes em *Sa. albiprivus* comparado ao *Ae. aegypti* e *Hg. leucocelaenus*, uma vez que nenhuma fêmea daquela espécie se infectou mesmo quando ingeriram alta dose viral no repasto ( $1 \times 10^7$  PFU/mL). *Ae. aegypti* e *Hg. leucocelaenus* são filogeneticamente mais próximos e pertencem à mesma tribo (Aedini), ao passo que *Sa. albiprivus* é um Sabethini. Talvez os Sabethini sejam menos permissivos ao YFV-17DD. Mas, vale ressaltar que os resultados aqui apresentados são limitados à uma população para cada espécie testada. Sabe-se, porém, que a competência vetorial pode variar em diferentes espécies de um mesmo gênero e entre populações de mosquitos de uma mesma espécie para um mesmo vírus <sup>(167)</sup>.

Até onde sabemos, diferentemente do nosso estudo, os trabalhos de competência vetorial para o vírus vacinal da febre amarela disponíveis na literatura foram realizados com a cepa YFV-17D e com apenas uma espécie de mosquito, o *Ae. aegypti*. Nosso estudo, devido a sua conceitualização e objetivos, é o primeiro a avaliar a competência vetorial ao vírus vacinal YFV-17DD em mosquitos silvestres, como *Sa. albiprivus*, *Sa. identicus*, *Hg. janthinomys/capricornii* e *Hg. leucocelaenus*, além de testar comparativamente o vetor urbano *Ae. aegypti*. Nosso estudo, portanto, é pioneiro nesse sentido.

Finalmente, no que diz respeito à competência vetorial, o conjunto dos resultados e análise da literatura disponível indicam que as baixa viremia apresentada pelos micos-leões vacinados combinada com a menor capacidade de infecção de mosquitos silvestres ou mesmo domésticos pelo YFV-17DD não sustentariam a transmissão do vírus vacinal atenuado na natureza.

## **5.2 Levantamento faunístico e modelos de distribuição dos espécimes coletados**

O conhecimento da diversidade das espécies de mosquitos em áreas de ambiente natural é de fundamental importância para a avaliação das possíveis mudanças em seus comportamentos e adaptações de acordo com as diversas condições ambientais dessa região ou em áreas onde o ambiente foi submetido e/ou está passando por alteração antrópica <sup>(168, 169)</sup>.

Aos achados experimentais acerca da possibilidade do vírus vacinal ser transmitido na natureza a partir de PNHS vacinados no CPRJ associamos observações de campo sobre os mosquitos que potencialmente picam os animais ali mantidos.

A abordagem incluiu estratégias que empregassem métodos de coleta de imaturos e adultos que permitissem conhecer a diversidade da fauna e avaliar a abundância no tempo e espaço no CPRJ. Com base nas análises dos resultados do conjunto de coletas feitas no CPRJ, observamos que o local apresenta considerável riqueza de espécies de mosquitos, incluindo vetores reconhecidos na transmissão do YFV.

Com efeito, foram identificados 12 gêneros de mosquitos pertencentes a 21 espécies, sem se levar em conta a grande maioria dos indivíduos dos gêneros *Culex* e *Wyeomyia*, cuja identificação específica, reconhecidamente complexa <sup>(63)</sup>, não foi possível durante a realização do estudo. A diversidade de mosquitos já descrita em sítios localizados no mesmo flanco da Serra do Mar foi mais elevada. O número de espécies encontradas no CPRJ foi essencialmente a metade (44 espécies) do reportado por Guimaraes e Arlé (1984)<sup>(170)</sup> ao capturarem mosquitos, semanalmente, durante 24 meses consecutivos, no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, onde os sítios de coleta se localizavam a cerca de 9 km em linha reta do CPRJ, porém, na

porção mais montanhosa do mesmo município, Guapimirim. A cerca de 20 km em linha reta do CPRJ, na Reserva do Guapiaçu, localizada no município de Cachoeira de Macacu, Silva et al. (2014)<sup>(171)</sup> detectou a ocorrência de 59 espécies empregando apenas armadilhas luminosas de diferentes cores.

Como era de se esperar, os métodos usados para a captura selecionariam as espécies e influenciariam no resultado obtido. O uso de ovitrampas selecionou essencialmente a coleta de Aedini - *Hg. leucocelaenus*, *Aedes terreus* e *Hg. janthinomys/capricornii* (9,1%) nas paletas e, com menor expressividade, *Culex urichii* e *Limatus pseudomethysticus* na água. Interessante notar que somada a frequência das duas espécies de *Haemagogus*, obtêm-se 70,8 % do total de imaturos coletados em armadilha de ovitrampa [*Hg. leucocelaenus* (61,7%), *Hg. janthinomys/capricornii* (9,1%)]. Portanto, se considerarmos apenas a coleta de imaturos, a maior frequência e abundância estão entre as principais espécies envolvidas na transmissão do vírus da febre amarela silvestre no estado do Rio de Janeiro e em outras partes do Sudeste na recente epidemia <sup>(91, 99, 100, 172-177)</sup>. A composição da riqueza de espécies de mosquitos encontrados em armadilhas de ovitrampas do presente estudo não diferiu com os resultados faunístico encontrado por Alencar et al. (2016) <sup>(178)</sup> em um fragmento de floresta Atlântica do Município de Cachoeiras de Macacu. Provavelmente o grau de preservação e outras características locais, como a disponibilidade de habitat larval em ambos fragmentos florestais não influenciaram a distribuição das espécies.

Apesar dos pontos de amostragem do CPRJ pertencerem ao mesmo tipo de paisagem, apresentaram diferenças quanto à distribuição das espécies. Cabe ressaltar, que o ponto amostral 3, localizado totalmente dentro da mata do CPRJ, apresentou a maior abundância populacional. Essa diferença observada na distribuição populacional na área do CPRJ pode indicar que o local apresenta uma considerável disponibilidade de hospedeiros. Assim sendo, configura que as espécies de mosquitos não necessitem dispersar para exercer a atividade hematofágica.

Considerando a combinação de armadilhas para coleta de adultos e imaturos, os espécimes de *Haemagogus leucocelaenus* distribuíram-se com maior incidência no sítio amostral 3, diferentemente observado para *Hg. capricornii/janthinomys* que foi encontrado de forma regular em praticamente em todos pontos amostrais. Dajoz (1983) <sup>(179)</sup> referiu que o regime alimentar de uma espécie raramente é constante

durante o ano inteiro em todos lugares e esta variação pode ser influenciada em função das características do meio.

As análises realizadas sobre distribuição biogeográfica das espécies *Haemagogus* revelaram que algumas populações estão bem caracterizadas a determinado tipo de biota. Segundo Forattini (1996)<sup>(180)</sup> são múltiplos fatores que determinam a feição geográfica revelada pela espécie ou comunidade.

Kumm & Cerqueira (1951)<sup>(181)</sup> relataram que no Brasil, *Haemagogus capricornii* e *Hg. janthinomys* não se encontram restritos somente à região de planície, ocorrendo também em zonas de altitudes superiores a 800 m a. n. m.

*Haemagogus janthinomys* é a espécie de maior distribuição geográfica no Brasil, que parece estar altamente adaptada aos diferentes biomas. Entretanto, *Hg. capricornii* ao que tudo indica, pode ser definida como a espécie “característica” da região de Mata Atlântica, enquanto *Hg. janthinomys*, que coabita várias biocenoses poderia ser definida como a espécie “preferente”. A relação real entre as espécies para o espaço geográfico não é significativa, reforçando a ideia de que as duas espécies ocupam habitats diferentes.

Forattini (2002)<sup>(71)</sup> relatou que a sobrevivência das populações depende da habilidade que elas possam apresentar, expressas de múltiplas formas, em conviver com as condições e as características do ambiente, o que recebe o nome genérico de adaptação, e que decorre do equilíbrio atingido entre os mecanismos endógenos, próprios dos organismos que compõem essas populações, e os estímulos exógenos que procedem do meio onde vivem.

Guimarães & Arlé (1984)<sup>(170)</sup> relataram a ocorrência de *Hg. leucocelaenus* em todos meses do ano, exceto junho e novembro, diferindo de *Hg. capricornii/janthinomys* que concentrou 90% dos seus espécimes em dezembro. Essas observações corroboram com o presente estudo, o mês de março foi o mais favorável para *Hg. leucocelaenus*, enquanto que os meses de maio, novembro e dezembro foram os de menores incidência. *Haemagogus capricornii/janthinomys* apresentou maiores incidências nos meses de dezembro e março.

As coletas de adultos foram feitas com armadilhas e diretamente com AHPE, métodos que também podem selecionar as espécies atraídas. *Culex* spp., sem importância epidemiológica no contexto da febre amarela, foram muito frequentes.

Contudo, merece destaque a frequência de *Ae. scapularis*, *Hg. janthinomys/capricornii* e *Hg. leucocelaenus* em comparação com as demais encontradas na área, excetuando-se *Culex*. Por exemplo, *Hg. leucocelaenus* representou 21,7% do capturado diretamente em AHPE, seguida de *Ae. scapularis* (12,9%). A última espécie foi considerada vetora secundária da febre amarela durante a recente epidemia no RJ<sup>(91)</sup> e já havia sido encontrada infectada com o YFV em outras partes do Brasil<sup>(84,173)</sup> e demonstrado experimentalmente ser capaz de transmitir o vírus entre macacos<sup>(182,183)</sup>.

Os citados vetores primários e secundários apresentaram maior abundância na estação das chuvas que coincide com o verão. Trata-se de uma tendência previamente observada especialmente quando se trata de espécies cujos ovos, resistentes à dessecação, acumulados nos criadouros, eclodem em massa com as maiores precipitações<sup>(63,71,116)</sup>. Assim, considerando-se o conjunto das coletas de ovos e adultos, *Hg. leucocelaenus* apresentou picos populacionais nos meses de janeiro e março, embora tenha sido capturado durante todo o ano. Esse comportamento foi semelhante ao encontrado em outras localidades do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e em Trinidad<sup>(184-190)</sup>. Coincidentemente, o vetor primário *Hg. janthinomys/capricornii*, assim como os vetores secundários *Ae. scapularis* e *Sabethes chloropterus* também apresentaram picos populacionais em janeiro. Assim, ainda que os vetores da febre amarela possam picar os PNHs durante todo o ano, nossos dados indicam maior risco de transmissão no mês de janeiro, o que está de acordo com registros de epizootias no Sudeste<sup>(10,124)</sup>.

As jaulas onde os PNHs são mantidos no CPRJ são distribuídas numa área onde a floresta Atlântica pode estar mais próxima ou não. Os mosquitos vetores do YFV detectados no CPRJ se criam dentro da floresta, essencialmente em ocos de árvore, no caso de *Haemagogus* e *Sabethes*, ou solo alagado em área sombreada pela mata, no caso de *Ae. scapularis*<sup>(63)</sup>. Para conhecer a distribuição dos mosquitos no espaço do CPRJ, fizemos coletas em transectos, com pontos de atividade desde o ambiente modificado dentro da mata, a 400 m do primeiro. Verificamos grande heterogeneidade no que diz respeito à abundância e diversidade de espécies entre os pontos de coleta e diferenças significantes foram detectadas entre os resultados das coletas feitas em alguns pontos. Por exemplo, verificamos que o Ponto 3, um dos localizados mais para dentro da mata (400 m do P0) foi onde houve maior abundância de ovos de *Hg. leucocelaenus* e onde *Hg. janthinomys/capricornii* também realizou postura com frequência. Apesar destas

diferenças espaciais, há risco dos PNHs serem picados por vetores do YF em qualquer das gaiolas, considerando-se que *Hg. leucocelaenus* foi encontrado em todos os pontos amostrais e que *Hg. janthinomys* só não foi detectada em um dos pontos. Com efeito, estes dois vetores são capazes de se deslocar por vários quilômetros, cobrindo ambientes de mata e modificados, comportamento que facilita a disseminação espacial do YFV <sup>(191)</sup>. Suas capacidades de se deslocar para fora da floresta onde nasceram ou onde foram desovar e picar PNHs ou humanos no ecótono ou mesmo no ambiente aberto modificado tem sido indicada como importante fator de risco na transmissão do YFV <sup>(122)</sup>.

Em conjunto, esses resultados indicam que os PNHs do CPRJ estão altamente expostos ao risco de infecção pelo YFV selvagem e, caso esses animais vacinados desenvolvessem elevada viremia pelo YFV-17DD, poderiam ser fonte de infecção para os vetores distribuídos de forma ubíqua e com elevada frequência especialmente no verão. Nesse contexto, a proposta de imunização dos animais através da vacinação com o YFV-17DD foi uma estratégia oportuna de profilaxia contra as infecções naturais pelo YFV, especialmente levando-se em conta que a vacina se mostrou segura tanto para os micos-leões quanto para as demais espécies (André T.S. Fernandes - LATEV-Biomanguinhos, informação pessoal) e produziu viremias aparentemente insuficientes para resultar na transmissão vetorial.

## 6 CONCLUSÕES

- Os mosquitos *Ae. aegypti*, *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Sa. albiprivus* e *Sa. identicus* não se infectaram ao se alimentarem diretamente em micos-leões no terceiro dia após a vacinação com o vírus atenuado YFV-17DD, em torno do qual se situa o pico da viremia.

- *Aedes aegypti* e *Hg. leucocelaenus* também não foram capazes de se infectar quando alimentados artificialmente em um repasto contendo título viral de YFV-17DD ( $1 \times 10^4$  PFU/mL) igual a mais elevada viremia desenvolvida em primatas não-humanos vacinados, independentemente da espécie de animal ou tempo pós-vacinal.

- Porém, *Ae. aegypti* e *Hg. leucocelaenus*, mas não *Sa. albiprivus*, infectaram-se ao ingerirem um repasto artificial contendo título viral elevado do YFV-17DD ( $1 \times 10^7$  PFU/mL), mas, ainda assim, o vírus não se disseminou para tecidos secundários.

- Barreiras no intestino médio dos mosquitos desafiados oralmente devem ter bloqueado a disseminação e, por conseguinte, a transmissão vetorial do YFV-17DD nas espécies testadas, mesmo quando ingeriram um repasto contendo elevada carga viral.

- A fauna de mosquitos existente no CPRJ, onde os animais vacinados eram mantidos, é diversa e abundante, incluindo espécies vetoras primárias e secundárias da febre amarela silvestres - *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. scapularis* e *Sa. chloropterus* -, e mesmo o vetor urbano *Ae. aegypti*.

- Existe uma heterogeneidade na abundância, riqueza, diversidade de espécies de mosquitos dos doze pontos amostrais.

- Verificou-se similaridade consideravelmente alta para todas as comparações por pares entre os pontos onde houve combinação de amostragens de adultos com armadilha BG-Sentinel e de imaturos com ovitrampas (P1 a P5).

- Constatou-se que, nas coletas combinada de imaturos e adultos, o ponto de coleta P4, um dos localizados dentro da mata (400 m), apresentou maior riqueza. Acrescenta-se que os pontos de coletas na mata (200 m) onde houve somente amostragem de imaturos (P6 e P9) apresentaram maiores abundância.

- O método de coleta influenciou mais na composição da fauna capturada que a localização. Baseado no índice de similaridade, foi observada maior similaridade na composição de espécies nos pontos onde se realizaram capturas apenas com AHPE.

- As espécies *An. cruzii*, *Ps. ferox*, *Ru. cerqueirai*, *Wy. incaudata* (?), *Wy. theobaldi*, e os vetores secundários da febre amarela *Sa. chloropterus* e *Sa. albiprivus* foram coletadas apenas com AHPE.

- As distribuições temporal e espacial da densidade das espécies vetoras da febre amarela silvestre no CPRJ, especialmente de *Hg. leucocelaenus*, sugerem que os primatas não-humanos ali mantidos estão expostos à picada desses insetos e à transmissão do vírus selvagem, independentemente da localização de sua gaiola e ao longo de todo o ano, embora com maior risco entre janeiro e março.

- Animais vacinados com o vírus atenuado YFV-17DD foram potencialmente picados por esses vetores no CPRJ. Porém, o conjunto de evidências obtido neste estudo indicam que as baixas viremias apresentada pelos micos-leões e outros símios vacinados no CPRJ, combinada com a baixa susceptibilidade de mosquitos silvestres ao YFV-17DD, não sustentariam a transmissão do vírus vacinal atenuado na natureza.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MS/SVS. Ministério da Saúde/ Secretaria de Atenção à Saúde. Febre Amarela: Guia para profissionais de saúde. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
2. Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP, Vasconcelos PFC. Arboviroses. In: Leão, RNQ, coordenador. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997. p207-255.
3. MS. Ministério da Saúde. Febre amarela: sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. [Acesso: 24 mar. 2020]. Disponível em <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>
4. WHO. World Health Organization. Yellow Fever. [Acesso: 24 mar. 2020]. Disponível em <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>
5. OMS. Organização Mundial da Saúde. Diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus da Febre Amarela. Organização Pan-Americana de saúde, 2017
6. GIBNEY, et al. Detection of Anti-Yellow Fever Virus Immunoglobulin M Antibodies at 3–4 Years Following Yellow Fever Vaccination. Am. J. Trop. Med. Hyg. v. 87(6), p. 1112– 1115, 2012
7. CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P.L. Características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, 2000-2012. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 25(1):11-20, jan-mar 2016
8. Grobbelaar AA, Weyer J, Moolla N, Jansen van Vuren P, Moises F, Paweska JT. Resurgence of Yellow Fever in Angola, 2015-2016. Emerg Infect Dis. 2016 Oct;22(10):1854-5. doi: 10.3201/eid2210.160818. Epub 2016

9. WHO. World Health Organization. Yellow Fever Urban Outbreak in Angola and the Risk of Extension. Weekly epidemiological record. 2016;91 (14):186-92. Available from <https://www.who.int/wer/2016/wer9114.pdf?ua=1>
10. MS/SVS. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização. Brasília: Ministério da Saúde, 2019, 520 pp. Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/05/Saude-Brasil-2019-imunizacao.pdf>
11. Galler, R., Freire, M.S., Jabor, A.V., & Mann, G.F. The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector. Braz J Med Biol Res. 1997 Feb; 30( 2 ): 157-168.
12. Gubler DJ, Kuno G, Markoff L. *Flavivirus*. In: Fields Virology, Knipe, D.M. & Howley, P.M. (eds), Philadelphia, USA, Wolters Kluwer Health, 2007. p.1153-1252
13. Vasconcelos PF. Febre amarela. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; v.36 275-293
14. Rice, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. Science, Washington, 1985. v.229, n.4715.p.726-733
15. Monath TP. Yellow fever: an update. Lancet Infect Dis. 2001 Aug;1(1):11-20
16. Lindenbach BD and Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds), Field's Virology, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 991–1041
17. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow Fever. J Clin Virol. 2015 Mar; 64:160- 173.
18. Stiasny, K; Heinz, F.X. *Flavivirus* membrane fusion. Journal of General Virology. 2006; v.87, p. 2755-2766.

19. Gardner, c. L.; Ryman, K. D. Yellow Fever: a reemerging Threat. *Clinics in Laboratory Medicine*. Mar; 2010. v.30, (1), p. 237-260.
20. Lindenbach, B.D.; Evans, M.J.; Syder, A.J.; Wölk, B.; Tellin Ghuisen, Lindenbach, D.B.; Thiel; H-J.; Rice, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication In: *Fields Virology*. Knipe, D.M. & Howley, P.M. (eds), Philadelphia, USA, Wolters Kluwer Health. 2007. p.1101-1152.
21. Clarke, D.H. Antigenic Analysis of Certain Group B Arthropod-borne viruses by Antibody Absorption. *J Exp Med*. 1960. 111 (1): 21–32.
22. Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett AD. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol*. 2001; 75(15):6999-7008.
23. Bryant, J. E.; Holmes, E. C.; Barrett, A. D. T. Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathogens*. 2007. v. 3, p. 668–673.
24. Barrett, a. d. t.; Monath, T. P. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Advances in virus research*. 2003 v. 61, p. 291-315.
25. Vasconcelos PF, Bryant JE, da Rosa TP, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett AD. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(9):1578-84.
26. Nunes MR, Palacios G, Cardoso JF, Martins LC, Sousa EC, Jr., de Lima CP, et al. Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol*. 2012; 86(24):13263-13271.
27. de Souza RP, Foster PG, Sallum MA, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol*. 2010; 82(1):175-185.
28. Bonaldo Myrna C, Gómez Mariela Martínez, dos Santos Alexandre AC, Abreu Filipe Vieira Santos de, Ferreira-de-Brito Anielly, Miranda Rafaella Moraes de et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2017 June; 112 (6): 447-451.
29. Theiler, M.; Smith, H. H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *The Journal of Experimental Medicine*, New York, 1937. v.65, n.6, p.767-786.
30. Jaime Larry Benchimol (coord.). *Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2001. 470 pp.

31. Gubler, D. J.; Kuno, G.; Markoff, L. Flavivirus In: Fields Virology. Knipe, D.M. & Howley, P.M. (eds), Philadelphia, USA, Wolters Kluwer Health, 2007 p. 1153-1252.
32. Staples, J. E.; Monath, T. P. Yellow fever: 100 years of discovery. Journal of the American Medical Association, Chicago, 2008. v.300, n.8, p.960-962.
33. Camacho, L. A. et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. Revista de Saúde Pública, São Paulo, 2004. v.38, n.5, p.671-678.
34. Hahn, C. S. et al. Comparison of the virulent asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, 1987. v.84, n.7, p.2019- 2023,
35. Chambers, T. J.; Nickells, M. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. Journal of Virology, Washington, 2001. v.75, n.22, p.10912-10922.
36. Mandl, C. W. et al. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutant of a flavivirus. Journal of Virology, Washington, 1998. v.72, n.3, p.2132-2140.
37. Nickells, M.; Chambers, T. J. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Determinant in the envelope protein govern neuroinvasiveness for SCID mice. Journal of Virology, Washington 2003, v.77, n.22, p.12232-12242.
38. Barret, A.D.; Teuwen, D.E.F. Yellow fever vaccine-how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? Current Opinion in Immunology. London, 2009. V.21, n 3. P 308 – 313.
39. LANG, J. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of two 17D yellow fever vaccines. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, 1999. v.60, n.6, p.1045-1050.

40. MONATH, T. P. et al. Clinical proof of principle for Chimerivax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine*, Guildford, 2002. v.20, n.7-8, p.1004-1018.
41. MONATH, T. P. et al. Clinical proof of principle for Chimerivax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine*, Guildford. 2002. v.20, n.7-8, p.1004-1018.
42. de Melo AB, da Silva Mda P, Magalhaes MC, Gonzales Gil LH, Freese de Carvalho EM, et al. Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011. 85(4) 739–747. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0496>
43. Costa ZGA, et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde* 2011; 2(1):11-26
44. J. Gordon Frierson. A vacina contra a febre amarela: uma história. *O Yale Journal of Biology and Medicine* , 2010. 83 (2), 77-85
45. Elizabeth D. Barnett, Febre Amarela: Epidemiologia e Prevenção, *Doenças Infecciosas Clínicas*, Volume 44, Edição 6, 15 de março de 2007, Páginas 850–856, <https://doi.org/10.1086/511869>
46. Trindade Gisela F., Marchevsky Renato S., Fillipis Ana M.B. de, Nogueira Rita M.R., Bonaldo Myrna C., Acero Pedro C. et al. 2008. Limited replication of yellow fever 17DD and 17D-Dengue recombinant viruses in rhesus monkeys. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2008 June; 80( 2 ): 311-321
47. OMS. Diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus da Febre Amarela. Organização Mundial de Saúde, Organização Pan-Americana de saúde, 2017.
48. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), *Semanas Epidemiológicas* 1 a 19,

2020. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/May/20/Boletim-epidemiologico-SVS-20-aa.pdf>

49. Ministério da Saúde, 2005 Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos. Brasília: Ministério da Saúde 1.a edição(2005)–56 p.
50. Kleinert, Robin D.; Montoya-Diaz, Eduardo; Khera, Tanvi; Welsch, Kathrin; Tegtmeyer, Birthe; Hoehl, Sebastian; Ciesek, Sandra; Brown, Richard J.. "Yellow Fever: Integrating Current Knowledge with Technological Innovations to Identify Strategies for Controlling a Re-Emerging Virus." *Viruses* 2019. v11, n10: 960p
51. Fundação Nacional da Saúde (Brasil). Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela. Brasília, DF, 1999. 60p.
52. Karina Ribeiro Leite Jardim Cavalcante e Pedro Luiz Tauil. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saude*, Brasília, jul-set 2017. 26(3):617-620.
53. Vasconcelos, P.F.C. Febre Amarela. In: DUNCAN, B. B., SCHMIDT, M. I. E GIUGLIANI, E. R. J. *Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseadas em evidências*. 3ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2004. Cap. 167, p. 1511-1519
54. Ribeiro M e Antunes CMF. Febre amarela: estudo de um surto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009. 42(5):523-531.
55. Mark D. Gershman, J. Erin Staples. Yellow Fever. In: Gary W. Brunette e Jeffrey B. Nemhauser. *CDC Yellow Book 2020*. Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Livro de bolso. Jul, 2019. 720p.
56. Wilson D. E. Reeder D. M. (eds.). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 2005. 2142p.

57. Reis et al 2008 REIS, N. R.; PERACCHI, A. L. & ANDRADE, F. R. Primatas brasileiros. Technical Books. Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil, 2008
58. BARNETT, E. D. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Emerging Infections*, v. 44, n.15, p. 850-856, March, 2007
59. MS/SVS. Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde – Manual de vigilância de epizootias em Primatas não-humanos. Ministério da Saúde, Brasília, 2005. 56p.
60. TIGERTT et al., 1960 apud Vasconcelos 2003. [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(2):275-93.
61. T.P. Monath. Treatment of yellow fever. *Antiviral Research.* 2008. v.78 116–124. doi:10.1016/j.antiviral.2007.10.009
62. Ministério da Saúde. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2014. 2ª ed. – Brasília. 100p
63. Consoli, R.A.G.B., and Oliveira, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 1994. 228p.
64. World Health Organization (WHO), 2004. Manual for the laboratory diagnosis of yellow fever virus infection. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals CH-1211 Geneva 27, Switzerland. April 2004. 62p.
65. Araújo Francisco Anilton Alves, Ramos Daniel Garkauskas, Santos Arthur Levantezi, Passos Pedro Henrique de Oliveira, Elkhoury Ana Nilce Silveira Maia, Costa Zouraide Guerra Antunes et al . Epizootias em primatas não

humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 2011. 20( 4 ): 527-536.

66. Rodhain, F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. 1991. vol.14.nº1, pp. 9-19.
67. Dietz JM, Hankerson SJ, Alexandre BR, Henry MD, Martins AF, Ferraz LP, Ruiz-Miranda CR. Yellow fever in Brazil threatens successful recovery of endangered golden lion tamarins. *Sci Rep*. 2019 Sep 10;9(1):12926. doi: 10.1038/s41598-019-49199-6. PMID: 31506447
68. Abreu FVS, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, de Castro MG, Ribeiro IP, Furtado ND, Vargas WP, Ribeiro MS, Meneguete P, Bonaldo MC, Bello G, Lourenço-de-Oliveira R. Combination of Surveillance Tools Reveals That Yellow Fever Virus Can Remain in the Same Atlantic Forest Area at Least for Three Transmission Seasons *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e190076. doi: 10.1590/0074- 02760190076. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31038550
69. Harbach, 2020. *Culicidae* Meigen, 1818. Mosquito Taxonomic Inventory. 11 de fev. de 2008. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>> Acesso em: 12 de abr. de 2020
70. Neves, David Pereira. *Parasitologia dinâmica. Mosquitos*. Atheneu, 2009. 3ªed. 608p.
71. Forattini Oswaldo Paulo. *Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia*. São Paulo: Editora da USP; 2002. v.2, 864p..
72. Gomes, Adriana dos Santos, Sciavico Célia J. de Sá, Eiras Álvaro Eduardo. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2006; 39( 4 ): 327-332.

73. Lourenço-de-Oliveira R. Biologia e Comportamento do Vetor. *In*: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (org) DENGUE: TEORIAS E PRÁTICAS. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015b. pp 75-92.
74. Pant, CP, e Yasuno, M. Estudos de campo sobre o ciclo gonotrófico de *Aedes Aegypti* em Bangkok, Tailândia. *Journal of Medical Entomology*, 1973. 10 (2), 219-223. <https://doi.org/10.1093/jmedent/10.2.219>
75. CONSOLI, R.A.B.; WILLIAMS, P.; MORENO, E.C.; SANTOS, B.S. Features of reproduction in laboratory reared *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1983. 78:37-47.
76. Lourenço-de-Oliveira R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. *In*: Coura, JoséRodrigues (org). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 2ªed. p75-97.
77. MMA - Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade, 2019. [online]. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade>>. Arquivo consultado em 21 de Maio de 2020
78. MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403, 853-858. 2000
79. ICMBIO - Instituto Chico Mendes da Biodiversidade. Mata Atlântica, 2019. [online]. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/mata-atlantica>>. Arquivo consultado em 21 de Maio de 2020
80. Moraes, D. 2020. Bioma Mata Atlântica. *In Vivo* Fiocruz. [online]. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=964&sid=2>>. Arquivo consultado em: 22/05/2020.

81. Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Contando ciência na Web – Bioma Mata Atlântica. 2020. [online]. <<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/bioma-mata-atlantica>> Arquivo consultado em: 22 de Maio de 2020.
82. GUEDES, MLP. Culicidae (Diptera) no Brasil: Relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. *Oecologia Australis*. 2012. 16(2): 283 – 29
83. Scolforo, José & Oliveira, Antonio & Ferraz Filho, Antonio & Mello, José. (2008). DIVERSIDADE, EQUABILIDADE E SIMILARIDADE NO DOMÍNIO DA CAATINGA.
84. Franco, Odair. História da febre amarela no Brasil. Brasília, Ministério da Saúde, Departamento Nacional de Endemias Rurais, 1969. 209p.
85. Couto-Lima D, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta M de A, Santos FB dos, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep*. 2017;7(1):4848
86. Braks M.A, Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol*. 2003;40(6):785-94
87. EIRAS, A.E. Culicidae. In: NEVES, D.P. (Coord.). *Parasitologia humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.356
88. FUNASA, 2001. *Biologia dos vetores*. In: *Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas*. -3.ed., rev. - Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 2001. 84 p. (11-22).

89. Silva HHG da, Silva Ionizete G da, Lira K da S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop*. 1998. 1;27(1).
90. Arnell H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Cont. Amer. Entomol. Inst.* 1973; 10(2):1-174.
91. De Abreu, F.V.S.; Ribeiro, I.P.; Ferreira-de-Brito, A.; dos Santos, A.A.C.; de Miranda, R.M.; Bonelly, I.; Neves, M.S.A.S.; Bersot, M.I.; dos Santos, T.P.; Gomes, M.Q.; et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes Infect.* 2019, 8, 218–231.
92. Hervé, J.P.; Dégallier, N.; Travassos da rosa, A.P.A.; Pinheiro, F.P., Sá Filho, G.C. Ecologia da Febre Amarela Silvestre no Brasil. *Revista da Fundação SESP, Instituto Evandro Chagas*. 1986.vol. 31, n2. P131-134.
93. Jeronimo Alencar, Hosana Moura de Almeida, Carlos Brisola Marcondes, e Anthony Érico Guimarães "efeito de múltiplas Imersões de ovos e desenvolvimento de imaturos formas de *Haemagogus janthinomys* De Sudeste do Brasil (Diptera: Culicidae)," *Entomological Notícias* 119 (3), 239- 244, (1 de maio de 2008). [https://doi.org/10.3157/0013-72X\(2008\)119\[239:EOMIOEorgeous2.0.CO;2](https://doi.org/10.3157/0013-72X(2008)119[239:EOMIOEorgeous2.0.CO;2)
94. Alencar J, Gleiser RM, Morone F, et al. Estudo comparativo do efeito de múltiplas imersões em ovos de mosquitos *Aedini* (Diptera: Culicidae), com ênfase em vetores silvestres do vírus da febre amarela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . 2014; 109 (1): 114-117. doi: 10.1590 / 0074-0276130168
95. Mondet, B. et al, 2002. Isolation of yellow fever virus from Nulliparous *Haemagogus* (*Haemagogus*) *janthinomys* in eastern amazonia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 2, n. 1, p. 47-50
96. Obara Marcos Takashi, Monteiro Hamilton, Paula Marcia Bicudo de, Gomes Almério de Castro, Yoshizawa Maria Amélia Cavalcanti, Lira Ana Raquel et al.

- 2012 Infecção natural de *Haemagogus janthinomys* e *Haemagogus leucocelaenus* pelo vírus da febre amarela no Distrito Federal, Brasil, 2007-2008. *Epidemiol. Serv. Saúde*; 21( 3 ): 457-463
97. Pajot 1985 Pajot F-X, Geoffroy B, Chippaux J-P.21. Ecologie d' *Haemagogus janthinomys* Dyar (Diptera, Culicidae) en Guyane Française. Premières données. *Cah Orstom, Sér Entomol Méd Parasitol* 1985; 23:209-16.
98. Marcondes, C. B.; Alencar, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera : Culicidae) do Brasil. *Revista Biomédica*, v. 21, n. 3, p. 221–238, 2010.
99. Cardoso J da C, de Almeida MAB, dos Santos E, da Fonseca DF, Sallum MAM, Noll CA, et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(12):1918–24.
100. de Souza RP, Petrella S, Coimbra TLM, Maeda AY, Rocco IM, Bisordi I, et al. Isolation of Yellow Fever virus (YFV) from naturally infected *Haemagogus* (*Conopostegus*) *leucocelaenus* (Diptera, Culicidae) in São Paulo state, Brazil, 2009. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53(3):133–9
101. Camargo-Neves Vera LF de, Poletto Daniela W., Rodas Lílian AC, Pachioli Márcio L., Cardoso Rubens P., Scandar Sirle AS et al. Investigação entomológica de uma área silvestre de febre amarela no Estado de São Paulo, Brasil. *Cafajeste. Saúde Pública*. Agosto de 2005. 21 (4): 1278-1286
102. Gomes Almério de Castro, Torres Maria Amélia Nascimento, Paula Marcia Bicudo de, Fernandes Aristides, Marassá Ana Maria, Consales Cleide Aschenbrenner et al. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizoóticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 2010.; 19( 2 ): 101-113

103. Bersot, 2014 - Bersot MIL. Aspectos bionômicos de *Sabethes (Peytonulus) identicus* Dyar & Knab, 1907 (Diptera: Culicidae) em laboratório. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Entomologia Médica), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34787>
104. Raquel Juliana Vionette do Amaral e Marilvia Dansa-Petretski. Tópicos avançados em entomologia molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. In: Mario Alberto Cardoso da Silva Neto , Carlos Winter, Carlos Termignoni. Interação Patógeno-vetor: Dengue. Itabajara da Silva Vaz Junior, 2013 - 582 páginas
105. BEERNTSEN B. T., JAMES A.A., CHRISTENSEN B. M. Genetics of Mosquito Vector Competence. MICROBIOLOGY AND MOLECULARBIOLOGY REVIEWS, Mar. 2000, p. 115–137; Vol. 64, No. 1
106. William C. Black IV; Kristine E. Bennett; Norma Gorrochótegui-Escalante; Carolina V. Barillas-Mury; Ildfonso Fernández-Salas; María de Lourdes Muñoz; José A. Farfán-Alé; Ken E. Olson; Barry J. Beaty. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. Archives of Medical Research 2002. v33. 379–388
107. Bosio, C.F; Beaty, B. J.; & Black, W. C., Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(6), 1998, pp. 965–970
108. Bosio, C. F., Fulton, R. E., Salasek, M. L., Beaty, B. J., & Black, W. C., 4<sup>th</sup>. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics, 2000. 156(2), 687–698.
109. Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. Annu. Rev. Entomol. 1983; 28:229–262.

110. Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ. Natural cycles of vector-borne pathogens. In *Biology of Disease Vectors*. (Marquardt WC, Beaty BJ eds.) University Press of Colorado, 1996 p.51–72.
111. Guzman, M., Halstead, S., Artsob, H. et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8, S7–S16 2010.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
112. Scott B. Halstead. Dengue Virus–Mosquito Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 2008. 53:273–91
113. Lourenço-de-Oliveira Rb. Transmissão Vetorial. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (org) *DENGUE: TEORIAS E PRÁTICAS*. Rio de Janeiro:Editora Fiocruz; 2015a. pp 127-141.
114. Da Silva, K. A. B. Estudo da competência vetorial de mosquitos *Aedes aegypti* e *Haemagogus leucocelaenus* frente a duas cepas de Vírus da Febre Amarela. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.
115. Jayme A.Souza-Neto, Jeffrey R.Powell, Mariangela Bonizzoni. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. v.67, January 2019, p191-209.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
116. Bates M. The natural history of mosquitoes. Vol. 141, *Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 1949; 956 p. Available from:  
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1949.02910130070038>
117. SMITHBURN KC, HADDOW AJ. Isolation of yellow fever virus from African mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 1946;26:261-71. doi: 10.4269/ajtmh.1946.s1-26.261.

118. HADDOW AJ, SMITHBURN KC, et al. Implication of the mosquito *Aedes (Stegomyia) africanus* Theobald in the forest cycle of yellow fever in Uganda. *Ann Trop Med Parasitol.* 1948;42(2):218-23. doi: 10.1080/00034983.1948.11685365
119. Powell JR. Mosquito-Borne Human Viral Diseases: Why *Aedes aegypti*? *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(6):1563-1565. doi: 10.4269/ajtmh.17-0866. Epub 2018 Mar 15.
120. Girard M, Nelson CB, Picot V, Gubler DJ. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine.* 2020 May 19;38(24):3989-3994. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.04.011
121. Prata A. Yellow fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95 Suppl 1:183-7. doi: 10.1590/s0074-0276200000070003
122. Possas et al. (2018). Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113: e180278.
123. Ministério da Saúde, 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Manual de Vigilância Epidemiológica de febre amarela. Brasília: Ministério da Saúde.
124. Ministério da Saúde. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela – Brasil 2017/2018. Informe nº26. 2018.
125. MS-SVS (Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde). Saúde Brasil 2019: Uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização. Brasília: Ministério da Saúde, 2019, 520 pp. Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/05/Saude-Brasil-2019-imunizacao.pdf>

126. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018.  
Delatorre E, de Abreu FVS, Ribeiro IP, Gómez MM, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, Neves MSAS, Bonelly I, de Miranda RM, Furtado ND, Raphael LMS, da Silva LFF, de Castro MG, Ramos DG, Romano APM, KallásEG, Vicente ACP, Bello G, Lourenço-de-Oliveira R, Bonaldo MC. *Front Microbiol.* 2019 May 24;10:1079. doi: 10.3389/fmicb.2019.01079. eCollection 2019
127. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018.  
Delatorre E, de Abreu FVS, Ribeiro IP, Gómez MM, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, Neves MSAS, Bonelly I, de Miranda RM, Furtado ND, Raphael LMS, da Silva LFF, de Castro MG, Ramos DG, Romano APM, KallásEG, Vicente ACP, Bello G, Lourenço-de-Oliveira R, Bonaldo MC. *Front Microbiol.* 2019 May 24;10:1079. doi: 10.3389/fmicb.2019.01079. eCollection 2019.
128. Abreu FVS, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, deCastro MG, Ribeiro IP, Furtado ND, Vargas WP, Ribeiro MS, Meneguete P, Bonaldo MC, Bello G, Lourenço-de-Oliveira. Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *R. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:e190076. doi: 10.1590/0074-02760190076. Epub 2019 Apr29. PMID: 31038550
129. Ministério da Saúde, 2020. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em saúde. Ministério da Saúde. Volume 51 | Nº 01 | Jan. 2020
130. WHO, 2019. Yellow fever – Brasil. World Health Organization. 18 de abr. de 2019. Disponível em <<https://www.who.int/csr/don/18-april-2019-yellow-fever-brazil/en/>>. Acesso em 22 de abr. de 2020

131. Ministério da Saúde. (2018a). Secretaria de Atenção à Saúde. Febre Amarela: Guia para profissionais de saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. 1.ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2018
132. Medeiros, E. A. (2018). Desafios para o controle e tratamento da febre amarela no Brasil. *Acta paul. enferm.* vol.31 (2) São Paulo Mar./Apr. 2018
133. Beasley et al. (2015). Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Research* 115 (2015) 48–70
134. Whitman L. Failure of *Aedes aegypti* to transmit yellow fever cultured virus (17D) *Am J Trop Med Hyg.* 1939;19:16–19
135. McElroy KL, Girard YA, McGee CE, Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Higgs S. Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct yellow fever virus variants in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008 Oct;8(5):675-87
136. Strode G.K. Yellow Fever. Ed. New York-London: McGraw-Hill, 1951. 710 pp.
137. Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro SES-RJ. Informe Epidemiológico 020/2018. Monitoramento das emergências em saúde pública – Febre amarela. [Internet]. 2018. Available from: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=L4wqOoj4OVw%3D>
138. Tabachnick, W.J. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 249–277, doi:10.3390/ijerph10010249.
139. Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, Barbosa da Silva KA, Castro MG, Raphael LM, Brasil P, Failloux AB, Bonaldo MC, Lourenço-de-Oliveira R. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not

Competent to Transmit the Local Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Sep 6;10(9):e0004993.

140. Fay RW, Eliason DA. A preferred oviposition site as surveillance Method for *Aedes aegypti*. Mosq News. 1966;26(4):531–5.
141. Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of chikungunya virus. J Virol 2014; 88:6294-306
142. Domingo et al. (2012). Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. J Clin Microbiol. 50(12):4054-60
143. Pereira Dos Santos T, Roiz D, Santos de Abreu FV, Luz SLB, Santalucia M, Jiolle D, Santos Neves MSA, Simard F, Lourenço-de-Oliveira R, Paupy C. Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. Emerg Microbes Infect. 2018 Nov 28;7(1):191. doi: 10.1038/s41426-018-0194-y.
144. C. E. Shannon, "A mathematical theory of communication," in The Bell System Technical Journal, vol. 27, no. 3, pp. 379-423, July 1948, doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
145. Hammer, Oyvind & Harper, David & Ryan, Paul. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica. 4. 1-9.
146. Possas *et al.* (2018a). Urgent call for action: avoiding spread and re-urbanisation of yellow fever in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1-2.
147. Massad et al. (2018). Is vaccinating monkeys against yellow fever the ultimate solution for the Brazilian recurrent epizootics? Epidemiol Infect. 146(13):1622-1624.

148. Seligman SJ, Gould EA. Live flavivirus vaccines: reasons for caution. *Lancet*. 2004;363:2073–5.
149. Azar, S.R.; Roundy, C.M.; Rossi, S.L.; Huang, J.H.; Leal, G.; Yun, R.; Fernandez-Salas, I.; Vitek, C.J.; Paploski, I.A.D.; Stark, P.M.; et al. Differential vector competency of *Aedes albopictus* populations from the Americas for Zika virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2017, 97, 330–339, doi:10.4269/ajtmh.16-0969.
150. Theiler M, Hughes TP. Studies of circulating virus and protective antibodies in susceptible and relatively insusceptible monkeys after inoculation with yellow fever virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1935;28(5):481-500. doi:10.1016/S0035-9203(35)90004-9
151. Neves PCC, Rudersdorf RA, Galler R, et al. CD8+ gamma-delta TCR+ and CD4+ T cells produce IFN- $\gamma$  at 5–7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine*. 2010;28(51):8183-8188. doi:10.1016/j.vaccine.2010.09.090
152. THEILER M. 1951. The virus. In: STRODE GK (Ed). *Yellow Fever*. New York, McGraw-Hill Book Company, p. 39–138. apud Trindade 2008
153. R.S. Marchevsky et al. Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys. 2003. *Virology* v.316 n1. p55–63
154. Danet L, Beauclair G, Berthet M, Moratorio G, Gracias S, Tangy F, Choumet V, Jouvenet N. Midgut Barriers Prevent the Replication and Dissemination of the Yellow Fever Vaccine in *Aedes Aegypti* PLoS Negl Trop Dis. 2019 Aug 14;13(8):e0007299. doi: 10.1371/journal.pntd.0007299. eCollection 2019.
155. McElroy KL, Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Higgs S. Role of the yellow fever virus structural protein genes in viral dissemination from the *Aedes aegypti* mosquito midgut. *J Gen Virol*. 2006;87:2993–3001.

156. Vazeille M, Madec Y, Mousson L, Bellone R, Barré-Cardi H, Sousa CA, Jiolle D, Yébakima A, de Lamballerie X, Failloux AB. Zika virus threshold determines transmission by European *Aedes albopictus* mosquitoes. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1668-1678. doi: 10.1080/22221751.2019.1689797
157. Lambrechts, L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: Towards a new paradigm? *Trends Parasitol.* 2011, 27, 111–114, doi:10.1016/j.pt.2010.12.001.
158. Dickson, L.B.; Merklings, S.H.; Gautier, M.; Ghoulane, A.; Jiolle, D.; Paupy, C.; Ayala, D.; Moltini-Conclois, I.; Fontaine, A.; Lambrechts, L. Exome-wide association study reveals largely distinct gene sets underlying specific resistance to dengue virus types 1 and 3 in *Aedes aegypti*. *PLoS Genet.* 2020, 16, 1–19, doi:10.1371/journal.pgen.1008794.
159. Brault AC, Powers AM, Weaver SC, 2002. Vector infection determinants of Venezuelan equine encephalitis virus reside within the E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 76: 6387–6392.
160. Brault AC, Powers AM, Ortiz D, Estrada-Franco JG, Navarro Lopes R, Weaver SC, 2004. Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11344–11349.
161. Ludwig GV, Isreal BA, Christensen BM, Yuill TM, Schultz KT, 1991. Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. *Virology* 181: 564–571.
162. Sundin DR, Beaty BJ, Nathanson M, Gonzales-Scarano F, 1987. A G1 glycoprotein epitope of La Crosse virus: a determinant of infection of *Aedes triseriatus*. *Science* 235: 591–593.
163. Woodward TM, Miller BR, Beaty BJ, Trent DW, Roehrig JT, 1991. A single amino acid change in the E2 glycoprotein of Venezuelan equine

encephalitis virus affects replication and dissemination in *Aedes aegypti* mosquitoes. J Gen Virol 72: 2431–2435.

164. McElroy KL, Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Higgs S. Manipulation of the yellow fever virus non-structural genes 2A and 4B and the 3' non-coding region to evaluate genetic determinants of viral dissemination from the *Aedes aegypti* midgut. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:1158–64
165. Beck A, Tesh RB, Wood TG, Widen SG, Ryman KD, Barrett ADT. Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain asabi by deep sequencing. J Infect Dis. 2014;209: 334–344. 10.1093/infdis/jit546
166. Patterson EI, Khanipov K, Rojas MM, Kautz TF, Rockx-Brouwer D, Golovko G, et al. Mosquito bottlenecks alter viral mutant swarm in a tissue and time-dependent manner with contraction and expansion of variant positions and diversity. Virus Evol. Oxford University Press; 2018;4 10.1093/ve/vey001
167. Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge J-M, Lourenco-De-Oliveira R, Caro V, Lambrechts L, Failloux A-B. 2014 Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. Proc. R. Soc. B 281: 20141078. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1078>
168. Montes J (2005) Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. Rev Saúde Públ 39:578–584. doi: 10.1590/S0034- 89102005000400010
169. Hutchings RSG, Sallum MAM, Ferreira RLM, Hutchings RW (2005) Mosquitoes of the Jaú National Park and their potential importance in Brazilian Amazonia. Med & Vet Entomol 19: 428–441. doi:10.1111/j.1365-2915.2005.00587.x

170. Guimarães AEG & Arlé M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil: I- distribuição estacional. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1984; 79 (3):30-323. doi:10.1590/S0074-02761984000300004
171. Silva JSS, Couri MS, Giupponi APL, Alencar J. Mosquito fauna of the Guapiaçu Ecological Reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil, collected under the influence of different color CDC light traps. J Vector Ecol. 2014;39(2):384-94. doi: 10.1111/jvec.12114.
172. Guilherme Garcia Pinheiro, Marcele Neves Rocha, Maria Angélica de Oliveira, Luciano Andrade Moreira, José Dilermando Andrade Filho Detection of Yellow Fever Virus in Sylvatic Mosquitoes during Disease Outbreaks of 2017–2018 in Minas Gerais State, Brazil. Insects. 2019; 10(5):136. doi: 10.3390/insects10050136
173. Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, Dias JP, Monteiro HA, Oliva OF, Vasconcelos HB, Oliveira RC, Sousa MR, Barbosa Da Silva J, Cruz AC, Martins EC, Travassos Da Rosa JF. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. J Med Virol. 2001 Nov; 65(3):598-604.
174. Soper FL. Yellow fever: The present situation (October 1938) with special reference to South America. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1938 [cited 2018 Sep 4];32(3):297–322. Available from: [https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203\(38\)90045-8](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203(38)90045-8)
175. Kumm HW, Cerqueira NL. The Rôle of *Aedes leucocelaenus* in the Epidemiology of Jungle Yellow Fever in Brazil. Bull Entomol Res. 1951;42(1):195–9.

176. Vasconcelos PFC, Sperb AF, Monteiro HAO, Torres MAN, Sousa MRS, Vasconcelos HB, et al. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(1):60–2.
177. Mascheretti M, Tengan CH, Sato HK, Suzuki A, de Souza RP, Maeda M, et al. Yellow fever: Reemerging in the state of Sao Paulo, Brazil, 2009. *Rev Saude Publica.* 2013;47(5):881–9.
178. Alencar J, Mello CF, Gil-Santana HR, Guimarães AE, Almeida SA, Gleiser RM. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol.* 2016;4:18-26
179. Dajoz, R. *Ecologia Geral.* Vozes. 1983; 472p
180. Forattini OP. *Epidemiologia geral.* 2.ed. São Paulo (SP): Artes Médicas; 1996. p.210.
181. KUMM, HW.; CERQUEIRA NL. The *Haemagogus* mosquitos of Brazil. *Bulletin of Entomological Research.* 48:169-181. 1951.
182. Davis NC, Shannon RC. STUDIES ON YELLOW FEVER IN SOUTH AMERICA: V. TRANSMISSION EXPERIMENTS WITH CERTAIN SPECIES OF *CULEX* AND *AEDES*. *J Exp Med.* 1929;50(6):803-8. doi: 10.1084/jem.50.6.803.
183. Whitman L, Antunes PCA.. Studies on the capacity of various Brazilian mosquitoes, representing the Genera *Psorophora*, *Aedes*, *Mansonia*, and *Culex*, to transmit yellow fever 1. *Am J Trop Med Hyg.* 1937;s1-17:803– 823. doi: 10.4269/ajtmh.1937.s1-17.803
184. J, Morone F, De Mello CF, Degallier N, Lucio PS, de Serra-Freire NM, et al. Flight height preference for oviposition of mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of sylvatic yellow fever virus near the hydroelectric reservoir of Simplicio, Minas Gerais, Brazil. *J Med Entomol.* 2013;50(4):791–5.
185. Silva SOF, Ferreira De Mello C, Figueiró R, De Aguiar Maia D, Alencar J. Distribution of the Mosquito Communities (Diptera: Culicidae) in Oviposition

Traps Introduced into the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2018; 1;18(4):214–21.

186. Ribeiro ALM, Miyazaki RD, Silva M, Zeilhofer P. Spatial and Temporal Abundance of Three Sylvatic Yellow Fever Vectors in the Influence Area of the Manso Hydroelectric Power Plant, Mato Grosso, Brazil. J Med Entomol. 2012;49(1):223–6.
187. Lira-Vieira AR, Gurgel-Gonçalves R, Moreira IM, Yoshizawa MAC, Coutinho ML, Prado PS, et al. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the gallery forest of Brasília National Park, Brazil, with an emphasis on potential vectors of yellow fever. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(5):566–74.
188. Chadee DD, Tikasingh ES. Seasonal incidence and diel oviposition periodicity of *Haemagogus* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Trinidad, W.I. Part III. *Haemagogus celeste* (Dyar and Nunez Tovar) and *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar and Shannon). Ann Trop Med Parasitol. 1991;85(5):543–50.
189. Tátila-Ferreira A, Maia D de A, Abreu FVS de, Rodrigues WC, Alencar J. Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: culicidae), a vector of wild yellow fever in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2017;7;59(0).
190. Couto-Lima et al. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the Atlantic Forest, southeast Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.115 Rio de Janeiro 2020, <https://doi.org/10.1590/0074-02760200218>
191. Causey OR, Kumm HW, Laemmert HW. Dispersion of forest mosquitoes in Brazil; further studies. Am J Trop Med Hyg. 1950;30:301–312.

## 8 ANEXOS

### ANEXO 1



CENTRO UNIVERSITÁRIO SERRA DOS ÓRGÃOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UNIFESO

#### CERTIFICADO (Addendum - 3)

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E DA IMUNOGENICIDADE DE TRES VACINAS PARA FEBRE AMARELA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DAS ESPÉCIES LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS, L. ROSALIA E L. CHRYSOPYGUS**”, registrada com o nº467/17, sob a responsabilidade de **Alcides Pissinatti**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da CEUA-UNIFESO. Nesta etapa os animais serão vacinados com vacina diluída. Os primatas serão submetidos a picada de insetos (*Aedes* sp, *Haemagogus* e *Sabethes*).

<b>FINALIDADE</b>	( ) Ensino ( <b>X</b> ) Pesquisa científica			
<b>VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO</b>	19/10/2019			
<b>ESPÉCIE/LINHAGEM/RAÇA</b>	<b>SEXO</b>	<b>Nº DE ANIMAIS</b>	<b>PESO</b>	<b>IDADE</b>
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	M	3	600gr	-
	F	3	600gr	-
<i>Leontopithecus rosalia</i>	M	4	600gr	-
	F	4	600gr	-
<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	M	3	600gr	-
	F	3	600gr	-
<b>ORIGEM</b>	CPRJ / INEA			

Teresópolis, 19 de outubro de 2018.

  
Coordenação – CEUA – UNIFESO  
PO/GR/A/010/16

Av. Alberto Torres, 111 - Alto - CEP 25964-000 - Teresópolis-RJ - Brasil - Tel.: (21) 2641-7000 - Fax (21) 2741-5270  
CGC/MF nº 32.190.092/0001-06 - Inscrição Estadual Isento  
Est. Wenceslau José de Medeiros s/n°. Vale do Paraíso – Teresópolis/RJ. CEP: 25.976-340.  
Tel: 21-2743-5301. Tel-fax: 21-2743-5321

## ANEXO 2



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 52472-2</b>	<b>Data da Emissão: 29/06/2017 17:23</b>	<b>Data para Revalidação*: 29/07/2018</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Filipe Vieira Santos de Abreu	CPF: 080.429.536-07
Título do Projeto: Qual o risco de reemergência de febre amarela silvestre no Rio de Janeiro?	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta nas fronteiras com Minas Gerais e São Paulo	02/2016	02/2019
2	Coleta na região serrana do Rio de Janeiro	02/2016	02/2019
3	Concomitantemente à análise de vetores, serão analisados os primatas não humanos (sisbio nº 41837-3)	02/2016	06/2019
4	Criação dos imaturos em laboratório	03/2016	06/2019
5	Isolamento viral das amostras	06/2016	01/2019
6	Testes de competência vetorial	08/2016	12/2018