

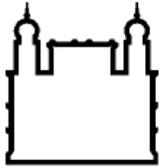
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**Biodiversidade e Interações Ecológicas de *Haemagogus*
(Diptera: Culicidae) nas Situações de Risco de Transmissão de
Arboviroses no Estado do Rio de Janeiro, Brasil**

Shayenne Olsson Freitas Silva

Rio de Janeiro
Janeiro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

Shayenne Olsson Freitas Silva

Biodiversidade e Interações Ecológicas de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) nas Situações de Risco de Transmissão de Arboviroses no Estado do Rio de Janeiro, Brasil

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

Orientador: Prof. Dr. Jeronimo A. F. Alencar

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Figueiró

Rio de Janeiro
Janeiro de 2018

Silva, Shayenne Olsson Freitas .

Biodiversidade e Interações Ecológicas de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) nas Situações de Risco de Transmissão de Arboviroses no Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Shayenne Olsson Freitas Silva. - Rio de Janeiro, 2018.

66 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

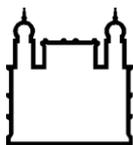
Orientador: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar.

Co-orientador: Ronaldo Figueiró.

Bibliografia: f. 56-66

1. Mosquitos. 2. *Haemagogus*. 3. Culicidae. 4. Febre Amarela. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: Shayenne Olsson Freitas Silva

Biodiversidade e Interações Ecológicas de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) nas Situações de Risco de Transmissão de Arboviroses no Estado do Rio de Janeiro, Brasil

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Jeronimo A. F. Alencar

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ronaldo Figueiró

Aprovada em: 15 / 01 / 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet – FIOCRUZ - Presidente

Prof. Dr. José Mario de Almeida - FIOCRUZ

Prof. Dra. Helena Keiko Toma - UFRJ

Prof. Dra. Nataly Araújo de Souza – FIOCRUZ (Suplente)

Prof. Dra. Renata de Mendonça Campos – UFRJ (Suplente)

Rio de Janeiro, de Janeiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jeronimo A. F. Alencar pelo amparo, paciência, apoio e auxílio durante todo o processo de realização do trabalho e por garantir os recursos e a infraestrutura necessários para a condução e conclusão do projeto.

Ao meu co-orientador Ronaldo Figueiró por me incentivar e acreditar no meu potencial como aluna tanto na graduação quanto no mestrado, por me auxiliar na elucidação de conceitos ecológicos, por ser um excelente professor e uma fonte de inspiração para os seus alunos.

À Esdras Matheus Gomes da Silva por me apresentar o programa de pós graduação na Fiocruz, por ter me motivado e incentivado a estudar exaustivamente. Por ouvir minhas lamurias e me fornecer suporte emocional em momentos de desespero, por não me deixar desistir em situações difíceis que se mostraram mais frequentes do que o esperado durante o período de estudo para a prova. Por sempre ter acreditado na minha capacidade de evolução dentro do meio acadêmico.

À minha família pelo apoio emocional, por me fornecer moradia e apoio financeiro para residência na cidade do Rio de Janeiro, por sempre acreditarem em mim, e em meu potencial até nos momentos em que eu mesma duvidei, por se preocuparem com a minha saúde física e emocional durante momentos em que precisei de amparo, proteção e carinho.

A todos do laboratório de Diptera do Instituto Oswaldo Cruz, em especial à Cecília Ferreira de Mello que me instruiu e me acompanhou no processo de obtenção e retirada de asas de *Haemagogus*, à Daniele de Aguiar Maia pelo esforço durante a coleta do material e manutenção de palhetas, larvas e espécimes adultos de culicídeos, à Aline Tátilla Ferreira pelo companheirismo, e elucidação de dúvidas a respeito do levantamento bibliográfico.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro em especial à Renata Campos Azevedo por garantir os recursos e infraestrutura para a análise e detecção viral em culicídeos, à Alberto Tadeu B. Freire por me instruir e me auxiliar com muita paciência e boa vontade durante esta etapa do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro necessário para a concretização do projeto.

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência cada dia é a preparação do nosso próprio amanhã.”

Chico Xavier

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Shayenne Olsson Freitas Silva

As transformações causadas ao ambiente devido à atividade antrópica, vêm modificando a dinâmica populacional de insetos vetores ao longo dos anos. Frequentemente, insetos que apresentavam hábitos tipicamente silvestres têm-se adaptado a criadouros localizados em áreas urbanas e, por conseguinte, à convivência com o homem. Nesse esteio, este trabalho teve como objetivo geral analisar a fauna de *Haemagogus* em diferentes áreas de fragmento de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, de modo a associar os mosquitos e as condições climáticas e de vegetação avaliando risco de emergência e transmissão de arboviroses. A coleta de mosquitos foi realizada com auxílio de armadilhas luminosas com CO₂ e armadilhas do tipo ovitrampa para coleta de ovos. Após as coletas, os ovos foram submetidos a 40 imersões, para testar a taxa de eclosão e avaliar a imersão de eclotibilidade mais elevada ao longo do período do estudo, as quais foram a 3^a e a 22^a imersão tanto para *Hg. leucocelaenus* quanto para *Hg. janthinomys*. A determinação específica dos culicídeos adultos foi feita por meio da observação direta dos caracteres morfológicos. Realizou-se análise morfométrica das asas para a diferenciação de *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys*. As asas foram montadas entre lâmina e lamínula, fotos foram tiradas com o auxílio do microscópio estereoscópico, com base nessas fotos selecionou-se quatorze pontos da asa utilizados para a realização das análises. Dados de coordenadas, estimador isométrico e o tamanho de centróide (CS), foram utilizados para comparar o tamanho geral das asas entre as espécies, na qual foi visto que o CS de *Hg. capricornii* foi significativamente menor ($P < 0.0001$) que o de *Hg. janthinomys*. Para avaliar a influência das variáveis climáticas (precipitação, ponto máximo de orvalho e direção) ao longo das estações do ano, sobre a densidade populacional das espécies de mosquitos empregou-se a análise da correspondência canônica (CCA), foi possível observar que *Hg. janthinomys* foi correlacionado positivamente com as três variáveis climáticas, enquanto que *Hg. leucocelaenus* apresentou correlação positiva com a precipitação e o ponto máximo de orvalho, e foi correlacionados negativamente com a direção. Este estudo pretende enriquecer o conhecimento da biodiversidade de Culicidae vetores efetivos ou potenciais da Febre Amarela Silvestre nas áreas relatadas (Reserva Biológica de Poços das Antas, Reserva Particular Bom Retiro e Área de Proteção Ambiental do Sana), o que permitirá aquilatar a dinâmica das populações, além de possibilitar a avaliação de novas situações de risco da transmissão de arboviroses no estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Mosquitos; *Haemagogus*; Culicidae; Bioecologia; Febre Amarela Silvestre.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Shayenne Olsson Freitas Silva

The transformations caused to the environment due to anthropic activity, have been modifying the population dynamics of vector insects over the years. Frequently, insects that have typically wild habits have adapted to breeding sites located in urban areas and, consequently, to coexistence with humans. The goal of this study was to analyze *Haemagogus* fauna in different areas of Atlantic Forest fragments in the State of Rio de Janeiro, in order to associate mosquito density, climatic variables and vegetation conditions, thus assessing the risk of transmission and emergence of arboviruses. Mosquito capturing was carried out through the use of CO₂ traps and ovitraps for egg capture. After capture, the eggs were submitted to 40 immersions, to test the hatching rate and to evaluate the immersion with the highest ecotibility throughout the study period, which were the 3rd and 22nd immersion for both *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys*. The specific determination of the adult culicide was done by direct observation of the morphological characters. Morphometric analysis was performed on the wings for the differentiation of *Haemagogus capricornii* and *Haemagogus janthinomys*. The wings were mounted between slide and coverslip, photos were taken with the aid of the stethoscope microscope, based on these photos, fourteen points of the wing were used to perform the analyzes. Coordinate data, isometric estimator and centroid size (CS), were used to compare the overall size of the wings among the species, in which the CS of *Hg. capricornii* was significantly lower ($P < 0.0001$) than that of *Hg. janthinomys*. To evaluate the influence of climatic variables (precipitation, maximum dew point and direction), canonical correspondence analysis (CCA) was used, it was possible to observe that *Hg. janthinomys* was positively correlated with the three climatic variables, while *Hg. leucocelaenus* presented a positive correlation with precipitation and maximum dew point, and was negatively correlated with direction. This study aimed to enrich biodiversity knowledge of potential and known Wild Type Yellow Fever Culicidae vectors, in the studied areas (Poços das Antas Biological Reserve, Bom Retiro Private Reserve and Sana Environmental Protection Area), which will not only allow a better understanding of these vectors' population dynamics, but also make it possible to assess new risk situations for the transmission of this arbovirose in the city of Rio de Janeiro.

Keywords: Mosquitoes; *Haemagogus*; Culicidae; Bioecology; Wild Type Yellow Fever.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Arboviroses	1
1.1.1 Arbovírus.	2
1.2 Febre amarela (FA)	3
1.2.1 Detecção viral.....	5
1.2.2 Epidemiologia da FA	6
1.2.3 Vacinação da FA	12
1.3 Mosquitos como vetores.....	13
1.3.1 Espécies do gênero <i>Haemagogus</i> Williston, 1896 de importância na transmissão do vírus da FA.....	15
1.3.2 Morfometria de asa.....	16
1.3.3 Biologia e Ecologia de espécies do gênero <i>Haemagogus</i> Williston, 1896	17
1.4 Ecloração de ovos de Culicidae	18
1.5 Prevenção de doenças transmitidas por vetores.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Área de estudo	23
3.2 Captura dos espécimes - Culicidae	27
3.3 Processamento dos mosquitos	29
3.4 Detecção de arbovírus em Culicidae.....	29
3.4.1 Maceração dos espécimes.....	29

3.4.2 Extração do RNA.....	29
3.4.3 Detecção Viral.....	30
3.4.4 Eletroforese em Gel de Agarose.....	31
3.5 Análise da morfometria das asas	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Avaliação dos efeitos de múltiplas imersões de ovos de <i>Haemagogus leucocelaenus</i> , <i>Hg. janthinomys</i> e <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae) em condição experimental	33
4.2 Comunidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em armadilhas de oviposição introduzidas em Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	37
4.3 Discriminação morfométrica entre populações de <i>Haemagogus capricornii</i> e <i>Hg. janthinomys</i> (Diptera: Culicidae) em áreas de floresta Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil	43
4.4 Analisar a infecção natural de mosquitos por alguns arbovírus patogênicos ao homem.....	44
5 DISCUSSÃO.....	47
5.1 Avaliação dos efeitos de múltiplas imersões de ovos de <i>Haemagogus leucocelaenus</i> , <i>Hg. janthinomys</i> e <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae) em condição experimental	47
5.2 Comunidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em armadilhas de oviposição introduzidas em Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	50
5.3 Discriminação morfométrica entre populações de <i>Haemagogus capricornii</i> e <i>Hg. janthinomys</i> (Diptera: Culicidae) em áreas de floresta Atlântica.....	52
5.4 Análise da infecção natural de mosquitos por alguns arbovírus patogênicos ao homem.....	54
6 CONCLUSÃO.....	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ANEXO 1: Evaluation of multiple immersion effects on eggs from *Haemagogus leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) under experimental conditions (artigo submetido no Journal of Medical Entomology)

ANEXO 2: Distribution of the mosquito communities (Diptera: Culicidae) in oviposition traps introduced into the Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil (artigo submetido no Vector-Borne and Zoonotic Diseases)

ANEXO 3: Morphological differentiation between Brazilian populations of *Haemagogus capricornii* and *Hg. janthinomys* (Diptera: Culicidae) detected through geometric morphometry of the wings (artigo submetido na Acta Tropica)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclos de transmissão da Febre Amarela.....	04
Figura 2: Áreas com risco de Transmissão do vírus da Febre Amarela na América do Sul.....	07
Figura 3: Distribuição de casos suspeitos e confirmados de FA na região Sudeste do Brasil.....	09
Figura 4: Mapa de epizootias confirmados de FAS no Brasil.....	10
Figura 5: Mapa de casos confirmados de FAS no Brasil.....	11
Figura 6: Mapa da área de recomendação para vacinação da FA no Brasil....	12
Figura 7: Ciclo de vida do mosquito.....	13
Figura 8: Reserva Particular do Patrimônio Natural Bom Retiro (RPPNBR).....	24
Figura 9: Área da Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	26
Figura 10: Área Proteção Ambiental do Sana.....	27
Figura 11: CDCs automática com CO ₂	27
Figura 12: Ovitampas fixadas com nylon aos bambus.....	28
Figura 13: Asa e consenso alar de fêmeas de <i>Haemagogus capricornii</i> (A) e <i>Hg. janthinomys</i> (B), com os 18 pontos anatômicos.....	32
Figura 14: Percentual (%) de ovos eclodidos por mês, de novembro de 2015 a novembro de 2016.....	34
Figura 15: Taxa de eclosão representada por imersão de ovos coletados em armadilha ovitampa, nos meses de outubro e novembro de 2015, Reserva Privada do Patrimônio Natural Bom Retiro (RPPNBR), estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	35
Figura 16: Efeito cumulativo de várias imersões dos ovos de <i>Ae. albopictus</i> , <i>Hg. leucocelaenus</i> e <i>Hg. janthinomys</i> , coletados nos meses de outubro e novembro de 2015, Reserva Natural Privada Bom Retiro (RPPNBR), estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	36

Figura 17: Vetores vermelhos que indicam a direção e a proximidade das variáveis climáticas em relação a cada espécie estudada.....	40
Figura 18: Número de ovos coletados na RPPNBR, estado do Rio de Janeiro, Brasil, de fevereiro a outubro de 2016, e precipitação em mm (INMET).....	42
Figura 19: Avaliação das diferenças significativas entre os locais de coleta (Ponto 1, Ponto 2, Ponto 3, Ponto 4 A, Ponto 4 B e Ponto 5).....	43
Figura 20: Gel de agarose com amostras de mosquitos coletados nas localidades RPPNBR, RPA e APA.....	46
Figura 21: Gel de agarose com amostras de mosquitos coletados nas localidades RPPNBR, RPA e APA.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem e número de espécies coletadas de cada um dos pontos de coleta localizados na Reserva Natural Privada Bom Retiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil, de outubro de 2015 a outubro de 2016.....38

Tabela 2: Abundância relativa e percentual de espécies de mosquitos coletados através de armadilha de ovitrampa na RPPNBR, Rio de Janeiro, de out. 2015 a out. 2016.....39

Tabela 3: Número de ovos eclodidos e não eclodidos coletados de outubro de 2015 a novembro de 2016 na Reserva Natural Privada Bom Retiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil.....41

Tabela 4: Número de ovos coletados na Reserva Natural Privada Bom Retiro, estado do Rio de Janeiro de fevereiro a outubro de 2016, e precipitação em mm de acordo com os dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).....42

Tabela 5: Espécies de Culicidae coletadas nas localidades de Área de Proteção Ambiental Sana (APA), Reserva Particular do Patrimônio Natural Bom Retiro (RBR), Reserva Biológica de Poço das Antas (RPA).....45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

% – Percentual

CCA – Análise da Correspondência Canônica (Canonical Correspondence Analysis)

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CIVES - Centro de Estratégias e Vigilância em Saúde

COES – Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública

CS – Tamanho de Centróide (Centroid Size)

DDT – Dicloro-difenil-tri-cloro-etano

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNERu– Departamento de Endemias Rurais

FA – Febre Amarela

FAS – Febre Amarela Silvestre

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNA – Ácido ribonucleico

RPPNBR – Reserva Privada do Patrimônio Natural Bom Retiro

RSP – Revista de Saúde Pública

SES – Secretaria de Estado de Saúde

SUCAM – Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

SUS – Sistema Único de Saúde

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

WHO – World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

1.1 Arboviroses

As arboviroses são enfermidades infecciosas causadas por vírus transmitidos por artrópodes hematófagos. O termo arbovírus é proveniente da expressão “*arthropod-borne virus*”, referindo-se ao grupo de vírus cuja transmissão é feita através de artrópodes vetores (1). Vírus que possuem parte de seu ciclo replicativo no interior de vetores e dependem destes para a sua veiculação e transmissão são designados arbovírus (2). Tais vírus podem ser transmitidos por artrópodes pertencentes aos seguintes grupos: Arachnida (Acarina: Ixodidae: Acari) ácaros, Insecta (Diptera: Culicidae: Culicinae e Anophelinae) mosquitos, Insecta (Diptera: Ceratopogonidae) mosquito-pólvora, Insecta (Diptera: Psychodidae) mosquitos-palha/flebótomos (3–6). A transmissão ocorre através da picada desses artrópodes ao se alimentarem em vertebrados suscetíveis (7). Trata-se da transmissão biológica, a qual envolve três componentes essenciais: o agente etiológico, o vetor e o vertebrado (8).

Tanto os humanos quanto os animais infectados pelos arbovírus podem sofrer com doenças, as quais apresentam-se ora sob uma forma sub-clínica, febril e encefálica, ora sob formas hemorrágicas, com significativa taxa de letalidade. Em contrapartida, as infecções em artrópodes vetores são quase sempre não patogênicas a eles e, em geral, persistem por toda a vida do inseto transmissor (9). Os arbovírus são fundamentalmente zoonóticos (comuns aos seres humanos e animais) e se propagam na natureza em ciclos de manutenção, que envolvem insetos hematófagos e animais silvestres, tais como aves, roedores e primatas não humanos. Esses vertebrados participam como hospedeiros vertebrados amplificadores, ou seja, ao estarem infectados os mesmos apresentam uma carga viral suficiente para infectar os artrópodes vetores (10). As infecções por arbovírus são mundialmente consideradas um grande problema de saúde pública (11,12).

Acredita-se que o tráfico de escravos advindos da África para as Américas durante o século XVI até meados do século XIX foi a principal atividade responsável pelo estabelecimento de duas importantes arboviroses no Novo Mundo: a Febre Amarela (FA) e a Dengue. Desde então muitas arboviroses

provenientes ou não de navios negreiros, cujos ciclos silvestres já estavam estabelecidos se propagaram globalmente (13). O recrudescimento das arboviroses está relacionado com a modificação dos ecossistemas por ação humana, o crescimento populacional urbano desordenado, o processo de globalização, a ampliação do intercâmbio internacional, mudanças climáticas, dentre outros motivos (14).

1.1.1 Arbovírus

O catálogo internacional de arbovírus mantido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (15) possui 537 vírus registrados, contudo estima-se que haja mais de 545 espécies de arbovírus, sendo aproximadamente 130 destes patogênicos para os seres humanos e 40 para animais domésticos (15). De acordo com um estudo dos arbovírus clinicamente importantes feito por Cleton (2012) existem mais de 150 arbovírus relacionados a doenças em seres humanos (16). Os arbovírus estão classificados nas famílias virais: *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* e ordem Bunyavirales (17). De acordo com inquéritos sorológicos, isolamentos virais e análises moleculares, os arbovírus de maior relevância médica e veterinária estão distribuídos entre as famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e ordem Bunyavirales (18).

Flaviviridae é composta por vírus envelopados de RNA de sentido positivo, e comporta vírus de algumas das doenças mais conhecidas que acometem os países tropicais, como os vírus da FA, dengue, zika, encefalite de Saint Louis, do oeste do Nilo dentre outras (19). Segundo dados da Organização Mundial da saúde e da Organização Pan Americana de Saúde atualizados em agosto de 2017, a sub região do Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) possui 219.577 casos confirmados de Dengue, sendo considerada a sub região com maior número de casos nas Américas. A situação da FA é igualmente preocupante com aproximadamente 900 casos notificados do ano de 2016 a 2017 na América do Sul, sendo 798 destes no Brasil (20).

1.2 Febre amarela (FA)

A FA é uma arbovirose de grande importância no continente americano, com a maioria dos casos ocorrendo no Brasil. Proveniente do continente africano, esta arbovirose foi introduzida em nosso continente com o tráfico de escravos, que trouxeram não só o vírus hospedados nos seres humanos, mas também o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), que se desenvolvia com facilidade nos tonéis de água dos navios. A partir daí essa enfermidade se difundiu desde norte dos Estados Unidos até o Cone Sul (21).

O Brasil sofreu muito com a doença, em termos sanitários e econômicos, e a sua eliminação das zonas urbanas, no início do século XX, foi um grande feito. No entanto, na década de 1920, surgiu a suspeita de transmissão em áreas florestais da Colômbia. A transmissão silvestre foi identificada e comprovada no vale de Canaã, estado do Espírito Santo no Brasil, ficando evidente que o vírus havia se adaptado a mosquitos silvestres. Os reservatórios mais perceptíveis são os bugios, já os macacos-prego parecem ser resistentes, gambás também podem ser reservatórios, mas raramente têm sido analisados (22).

A FA é uma doença infecciosa febril aguda causada por um vírus transmitido por mosquitos. Seu agente etiológico é um vírus de genoma RNA, pertencente ao gênero *Flavivirus*, que está relacionado ao vírus do Oeste do Nilo, da Encefalite de St. Louis e ao da Encefalite Japonesa (15). A relevância epidemiológica da FA relaciona-se com a sua gravidade clínica e seu elevado potencial de disseminação em áreas urbanas com altos índices de infestação de *Aedes aegypti* (23).

Sob o ponto de vista epidemiológico, pode-se dividir a FA em silvestre (FAS) e urbana (FAU). Elas diferem entre si quanto à natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados, bem como do local de ocorrência (24). O ciclo silvestre envolve a transmissão do vírus entre primatas não humanos e espécies de mosquitos que ali se encontram. Na África existe um ciclo intermediário que envolve a transmissão do vírus de mosquitos para humanos que moram ou trabalham nas proximidades das matas. O vírus da FA é transmitido através de

mosquitos, dos macacos para os humanos, quando estes estão visitando ou trabalhando nesses ambientes. A transmissão viral pode ocorrer através de mosquitos tanto de humanos para humanos quanto de macacos para humanos. O ciclo urbano envolve a transmissão do vírus de humanos para mosquitos urbanos e vice-versa, principalmente *Ae. aegypti* (Figura 1). O vírus geralmente é carregado para os centros urbanos por um indivíduo infectado advindo de áreas silvestres em que o ciclo silvestre da FA ocorre.

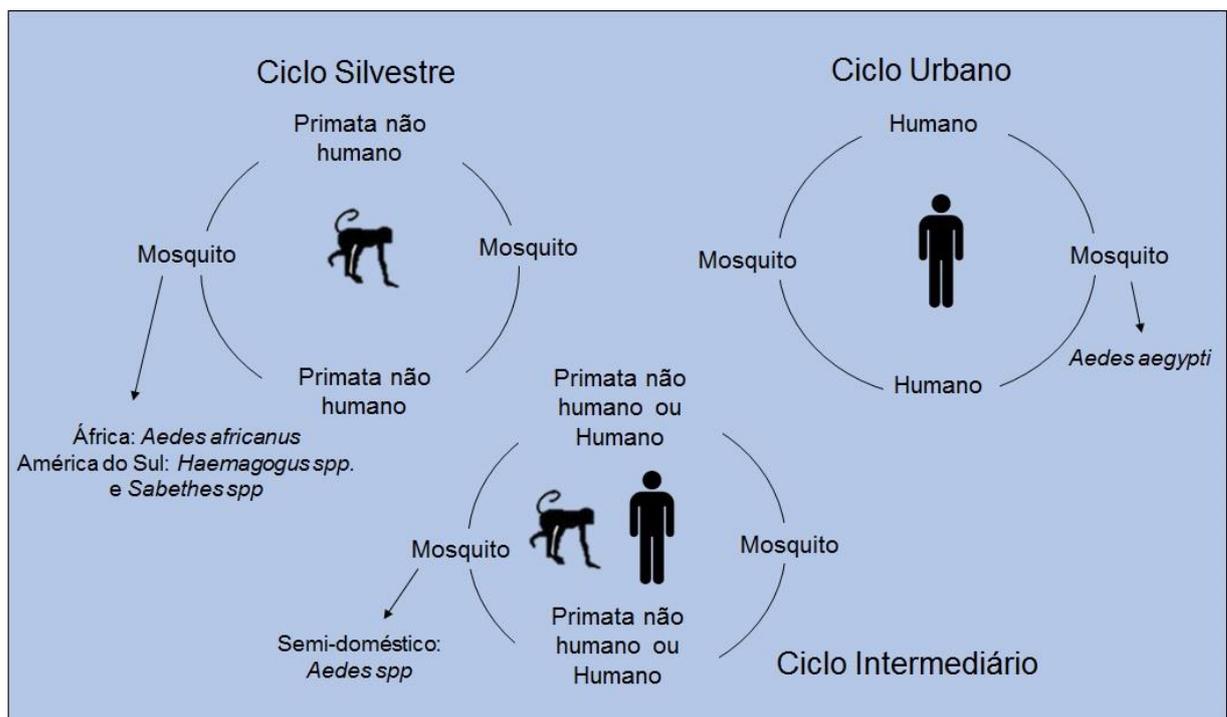


Figura 1 - Ciclos de transmissão da Febre Amarela. Ciclo Silvestre, envolve a transmissão do agente etiológico do mosquito para primatas não humanos e destes primatas para os mosquitos vetores. O Ciclo Urbano, no qual o mosquito transmite o agente etiológico para os humanos e humanos infectados podem transmiti-lo para mosquitos e o Ciclo Intermediário, que envolve a transmissão do agente etiológico tanto de mosquitos para humanos quanto de mosquitos para primatas não humanos e destes para os mosquitos.

Na América do Sul a FA é considerada uma doença ocupacional de trabalhadores de mata que atuam na retirada da madeira (25). A maioria dos indivíduos infectados não apresentam sintomas. Naqueles em que a doença é sintomática, há um período prévio de incubação (tempo de infecção até o aparecimento dos sintomas) de 3 a 6 dias. Os sintomas iniciais incluem febres de início súbito, calafrios, fortes dores de cabeça, dores nas costas e no corpo, náusea e vômito (2). Pode haver bradicardia (frequência cardíaca lenta), característica que está associada a temperatura (sinal de Faget) (26,27).

A doença no Brasil ocorre de forma endêmica nas regiões Norte e Centro-Oeste especialmente em suas porções ocidentais (28). No Brasil a FA silvestre é uma doença endêmica (região Amazônica) e na região extra-amazônica há registros de períodos epidêmicos ocasionais, o que caracteriza a reemergência do vírus no país. O padrão temporal de ocorrência é sazonal, no qual a maioria dos casos ocorre entre os meses de dezembro e maio. O ciclo silvestre de transmissão do vírus da FA inclui primatas não humanos e mosquitos do gênero *Haemagogus* Williston, 1896 e *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827. O homem quando não imunizado pode se infectar acidentalmente ao adentrar regiões de matas e ambientes rurais (2).

1.2.1 Detecção viral

A pesquisa da taxa de infecção em mosquitos fornece informações relevantes a respeito dos sorotipos circulantes nas localidades estudadas, antes mesmo que a enfermidade seja transmitida em níveis preocupantes. Mosquitos infectados podem ser detectados antes do início de surtos. Assim o monitoramento da circulação de arbovírus nos vetores com o uso de diversas metodologias para essa finalidade, permite identificar de forma antecipada e confiável a disseminação viral (29,30).

Um dos métodos de detecção viral em vetores é através da transcrição reversa seguida da reação de cadeia da polimerase (RT-PCR). A RT-PCR possui dois ciclos de reação, sendo o primeiro constituído da transcrição reversa, que é a utilização do RNA como molde para criação de uma molécula complementar de cDNA, e o segundo a amplificação desse segmento por PCR (Reação em cadeia da polimerase). Inicialmente o RNA é transcrito em cDNA que por sua

vez é amplificado por PCR com a utilização de primers específicos. O produto amplificado pode ser visto por meio de gel de agarose, com bandas de diferentes tamanhos. Este é um método de rotina que permite obter o isolamento rápido de sequências específicas de nucleotídeos a partir de uma mistura complexa de sequências genômicas ou de cDNAs, amplificando mínimas quantidades de ácidos nucleicos mesmo em vírus inativos (31).

1.2.2 Epidemiologia da FA

A ocorrência estimada de casos de FA na América do Sul é de cerca de 50 a 120 casos anuais (32), sendo endêmica em 10 países (21). Segundo informações do CDC, os países com risco de transmissão do vírus da FA na América Central e do Sul são: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Panamá, Peru, Suriname, Trindade e Venezuela (20) (Figura 2). As áreas florestais e áreas rurais da América do Sul, como por exemplo, as bacias dos rios Amazonas, Araguaia-Tocantins, Paraná e Orinoco, são locais propícios à circulação do vírus (33).

Na América do Sul, a FA ocorre principalmente na região Amazônica e regiões de pastagens contíguas. Entre 1990 e 1999, 1939 casos e 941 óbitos foram relatados na América do Sul. Peru e Bolívia tiveram a maior incidência, demonstrando baixa cobertura de vacinação. Na porção meridional da América, onde o vírus é transmitido em áreas florestais escassamente povoadas, ele afeta principalmente homens que se ocupam de terrenos pesqueiros ou desmatados para agricultura (34).



Figura 2. Áreas com risco de transmissão do vírus da FA na América do Sul: marcadas em amarelo as áreas nas quais a vacinação é recomendada, em cinza escuro onde geralmente a vacinação não é recomendada e em cinza claro áreas nas quais a vacinação não é recomendada.

Fonte: CDC, 2017 (https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/south_america.html)

O Brasil tem a maior área endêmica do mundo para a FAS. Muitos fatores podem atuar no ciclo silvestre da doença deslocando-a de seu foco natural, onde o vírus se propaga continuamente através de hospedeiros primários, e podem contribuir para a expansão da área epizootica além das áreas de risco pré-estabelecidas (35).

Os locais de risco no Brasil são as regiões de matas e rios, incluindo todos os estados da Região Norte e Centro-Oeste, bem como parte da Região Nordeste (Estado de Maranhão, sudoeste do Piauí, oeste e extremo-sul da Bahia), Região Sudeste (Estado de Minas Gerais, oeste de São Paulo e norte do Espírito Santo) e Região Sul (oeste dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (36).

No Brasil há uma tendência da reemergência da FAS, resultando em surtos de diferentes extensões e magnitudes. Depois do aumento da área de circulação viral ocorrido entre 2007 e 2009, na qual o vírus afetou o Sudeste e o Sul do país, a reemergência deste vírus passou a ser um motivo de preocupação (23). O mapa a seguir mostra a distribuição geográfica de casos suspeitos e confirmados de FA notificados à Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS) até 23 de fevereiro de 2017, com início a partir do dia 01 de dezembro de 2016, por município do Local Provável de Infecção (LPI) (37) (Figura 3).

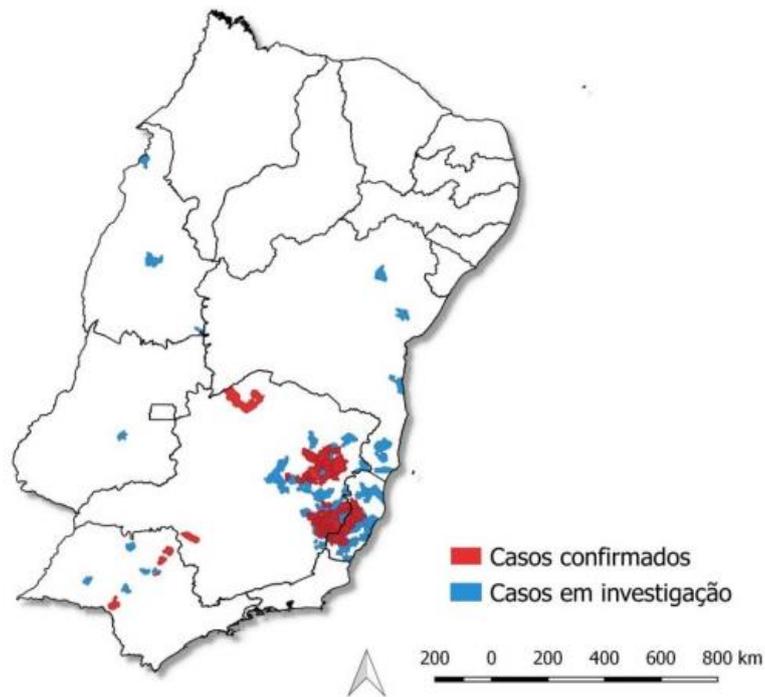


Figura 3. Distribuição de casos suspeitos e confirmados de FAS na região Sudeste e Nordeste do Brasil. Em vermelho estão marcadas as regiões com casos confirmados de FAS e em azul as regiões com casos em investigação.

Fonte: COES Febre Amarela, 2017 (Informe nº 23/2017)

Conforme o Boletim Epidemiológico de 2015 da Secretaria de Vigilância em Saúde, no período de monitoramento de julho de 2014 a junho de 2015 registraram-se alterações no padrão da ocorrência de casos humanos e epizootias em primatas não humanos durante o período sazonal da doença de dezembro a maio (Figura 4), com maior incidência de casos humanos em viajantes que exerciam atividades de turismo e lazer.

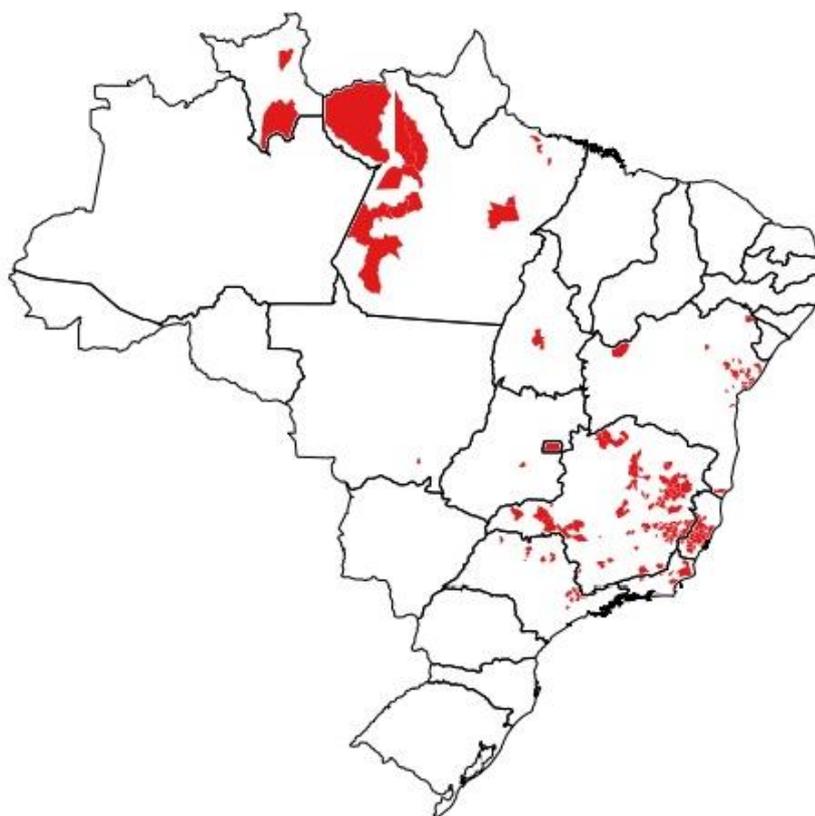


Figura 4. Mapa de epizootias confirmadas de FAS no Brasil. As regiões com epizootias registradas estão marcadas em vermelho.

Fonte: Sala de Apoio à Gestão Estratégica Ministério da Saúde (SAGE/SUS)

De acordo com o Informe Epidemiológico 083/2017 atualizado em novembro de 2017 o MS vem monitorando desde dezembro de 2016 os casos de FAS notificados no Brasil. Até 31 de julho de 2017, foram notificados ao Ministério da Saúde 3.564 casos suspeitos de FAS, desses 213 (6%) permaneceram em investigação, 777 (21,8%) casos foram confirmados, 2.270 (63,7%) foram descartados e 304 (8,5%) foram considerados inconclusivos. No estado do Rio de Janeiro a SES/RJ recebeu notificações de 84 casos suspeitos de FAS, dos quais 29 foram confirmados e 55 foram descartados. Dos 29 casos confirmados, 9 tiveram como Local Provável de Infecção (LPI) o município de Casimiro de Abreu e 2 o município de Silva Jardim (Figura 5).

A circulação do vírus em primatas não humanos, associada espacial e temporalmente aos casos humanos, evidenciam a importância e necessidade de uma estratégia de vigilância voltada para o ciclo silvestre. Essa vigilância pode ser útil no sentido de antecipar as respostas dos serviços de saúde prevenindo assim a ocorrência de casos e óbitos em humanos.



Figura 5. Mapa de casos confirmados de FAS no Brasil. As regiões com casos confirmados registrados estão marcadas em vermelho.

Fonte: Sala de Apoio à Gestão Estratégica Ministério da Saúde (SAGE/SUS)

1.2.3 Vacinação da Febre Amarela

De acordo com o Ministério da Saúde a vacina contra a FA é extremamente eficaz e segura, e é enviada mensalmente para todo o Brasil. Em 2016 foram repassados aos estados mais de 16 milhões de doses, sendo mais de 3 milhões para o estado de Minas Gerais, o qual conta com 250 mil doses de estoque. O mapa demonstra a definição da Área Com Recomendação de Vacina (ACRV), correspondendo àquelas áreas onde se reconhece o risco de transmissão; Área Sem Recomendação de Vacina (ASRV), correspondendo às “áreas indenadas”, sem evidência de circulação viral e a Área com Recomendação Temporária de vacina que cria um cinturão de imunização em municípios localizados na divisa com o estado de Minas Gerais (Figura 6).

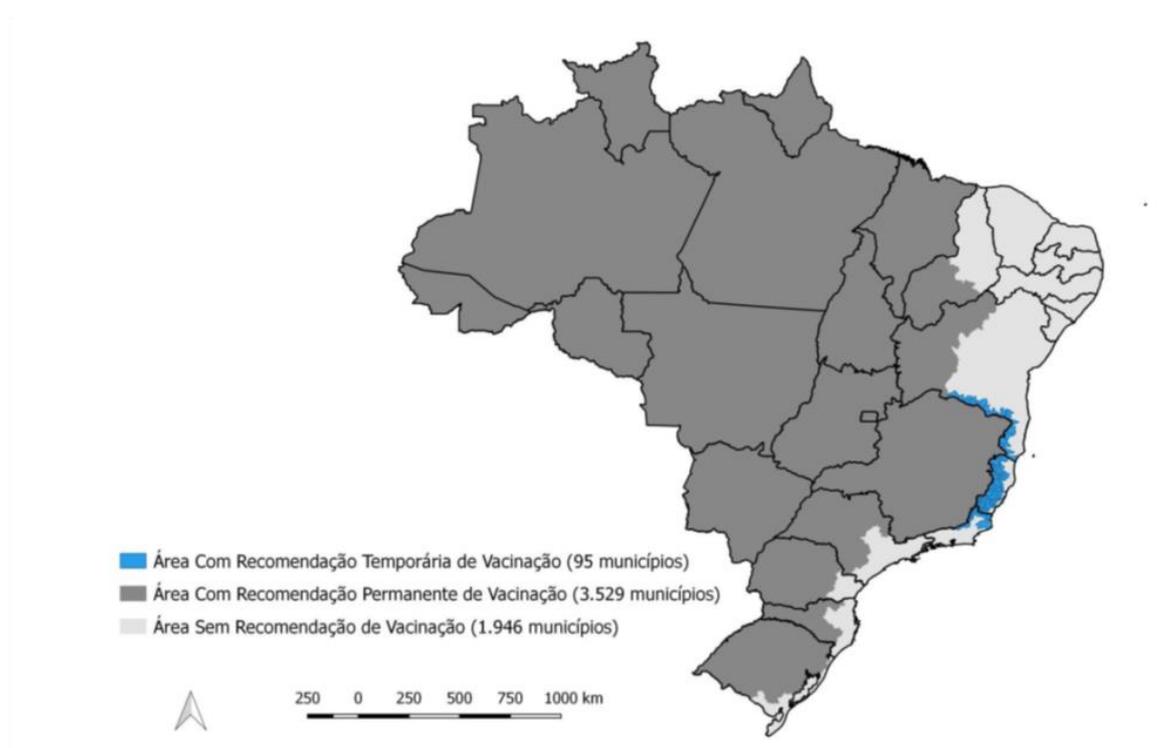


Figura 6. Mapa da área de recomendação para vacinação da FA no Brasil. Em cinza área com recomendação permanente de vacinação, em branco área sem recomendação de vacinação e em azul área com recomendação temporária de vacinação.

Fonte: Portal da Saúde/SUS (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-febreamarela>)

Segundo a Organização Mundial da Saúde a partir da data 11 de Julho de 2016 o certificado de vacinação contra Febre Amarela é válido para toda vida do indivíduo vacinado. Esta validação vitalícia se aplica automaticamente para todos certificados existentes e atuais, tendo início 10 dias após a data de vacinação. Desta forma começando dia 11 de julho de 2016, a dose de reforço da vacina da FA não será mais necessária para viajantes internacionais como uma condição para a entrada em uma região, independentemente da data de emissão do certificado de vacinação internacional (38).

1.3 Mosquitos como vetores

Os culicídeos, de maneira geral, são insetos holometábolos, isto é, possuem metamorfose completa, passando pelos estágios: ovo, larva, pupa e mosquito adulto. Os ovos são postos próximos a lâmina d'água. Quando o nível da água se eleva, os ovos, contendo embriões já desenvolvidos, entram em contato com a água e eclodem, liberando larvas. As larvas passam por quatro estádios ou instares até chegarem ao estágio pupa, no qual não se alimentam. Após alguns dias há a emergência do adulto alado, também conhecido como imago (39) (Figura 7).

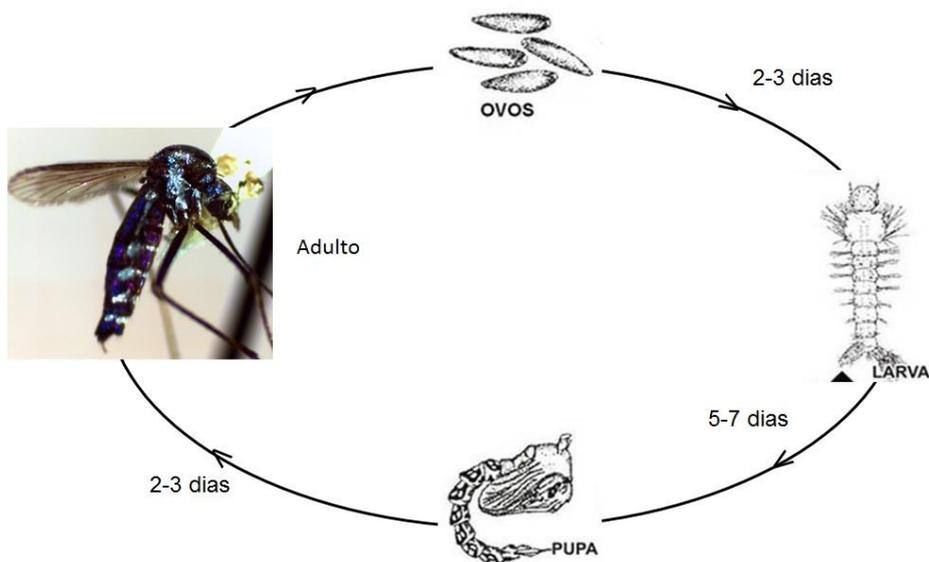


Figura 7. Ciclo de vida do mosquito

Os mosquitos eram vistos apenas como seres desagradáveis, a serem tolerados ou evitados (40). Entretanto, desde os séculos XVII e XVIII, a sua existência já merecia atenção, revelada por descrições das espécies comumente

encontradas no ambiente humano (41,42). Somente a partir de século XIX foram levantadas as primeiras hipóteses sobre o papel desses insetos como transmissores de patógenos (43). Dentre os artrópodes vetores de arboviroses, destacam-se os mosquitos, por serem responsáveis pela transmissão de diversos arbovírus patogênicos para o ser humano, assim como outros agentes patogênicos incluindo protozoários e helmintos (44). Nesse particular, merecem menção os estudos de Beauperthuy (*apud* Gillett 1955) e o de Finlay, 1881), referentes à transmissão da FA (45,46) . O papel epidemiológico dos culicídeos, como vetores biológicos, teve sua primeira comprovação com as observações de Manson em 1879 para a filariose bancroftiana, iniciando a ciência da entomologia médica. Desde aquela época, o número de estudos e pesquisas sobre estes dípteros têm aumentado consideravelmente (47). Graças a eles pôde-se estabelecer a responsabilidade desses insetos na ocorrência de diversos problemas de saúde pública, em especial no que concerne à malária, arboviroses e filarioses (48).

Ao realizar o repasto sanguíneo, mosquitos podem infectar e serem infectados, atuando assim como vetores biológicos, permitindo a multiplicação e desenvolvimento do agente etiológico antes de ser transmitido ao hospedeiro vertebrado (44). Dentro do inseto vetor os arbovírus invadem as células do epitélio do intestino médio, iniciando a replicação viral (49). Esses artrópodes são capazes de desencadear uma epidemia a partir de uma fonte de infecção, situação na qual são considerados vetores primários devido a sua importância epidemiológica (44). Algumas arboviroses são associadas exclusivamente a vetores específicos. Contudo, diversas outras espécies de artrópodes nas quais os vírus já foram identificados podem estar envolvidas na perpetuação do ciclo de vida viral sem nenhuma associação com essas doenças (8,12,50). Estima-se que aproximadamente 300 tipos de mosquitos sejam capazes de transmitir arboviroses (50). O conhecimento acerca da epidemiologia dos arbovírus emergentes é crucial para o desenvolvimento e operação de sistemas de vigilância/controle (51).

1.3.1 Espécies do gênero *Haemagogus* Williston, 1896 de importância na transmissão do vírus da FA

O gênero *Haemagogus* possui importante papel na epidemiologia da FA, uma vez que as espécies desse gênero apresentam grande importância médica e têm ampla distribuição geográfica no continente americano.

De acordo com a revisão de *Haemagogus* Williston do Brasil, de Marcondes e Alencar (2010), este gênero comporta 28 espécies tendo um número significativo destas consideradas de importância epidemiológica por serem vetores do vírus da FA, tornando-se os principais responsáveis pela manutenção do ciclo natural dessa zoonose (52). Os mosquitos desse gênero são restritos ao Novo Mundo e quase todas as espécies apresentam distribuição Neotropical (América Central, Antilhas e América do Sul), com exceção de *Haemagogus equinus* Theobald 1903, que atinge alguns pontos meridionais da região Neártica (53). Os mosquitos do gênero *Haemagogus* são essencialmente silvestres, de atividade diurna e de habitat acrodendrófilo. No Brasil, estes mosquitos habitam primordialmente áreas de florestas densas e de galeria (54).

Cinco espécies, dentre as nove consideradas vetoras potenciais da Febre Amarela Silvestre (FAS), destacam-se pela eficiência na sua transmissão no Brasil: *Haemagogus albomaculatus* Theobald, 1903; *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924); *Haemagogus spegazzini* Bréthes, 1912; *Haemagogus capricornii* Lutz, 1904 e *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921.

A distribuição geográfica de *Haemagogus albomaculatus* é restrita ao norte da América do Sul, ocorrendo no Suriname, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela e no Brasil ao norte do Estado do Pará encontrado naturalmente infectado com vírus em Monte Alegre (PA) (55).

A espécie mais comum apontada como vetor primário da FAS no sudeste brasileiro é *Hg. leucocelaenus*. Esta espécie tem sua distribuição geográfica se estendendo desde de Goiás, no município Trindade ao sul do Brasil, com ocorrência principal nos estados de Mato Grosso, Goiás, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul (52), e Rio Grande do Norte (56). Foi encontrado naturalmente infectado com alguns arbovírus, entre os quais o vírus da FAS,

mostrando-se um vetor mais eficiente deste vírus do que *Ae. aegypti*, segundo estudos experimentais realizados em laboratório (57).

Haemagogus spegazzinii parece ter um papel secundário na transmissão do vírus da FAS (58,59). Ocorre do nordeste ao sudeste do Brasil, de Pernambuco ao Rio de Janeiro, no Paraguai e do norte e centro da Argentina ao leste da Bolívia, já tendo sido assinalado também no Equador (60).

Haemagogus capricornii é importante vetor da FAS no Brasil. Pouco se sabe sobre sua bionomia, tendo sido encontrada em regiões mais temperadas e secas no sudeste do Brasil: desde o sul da Bahia ao norte do Rio Grande do Sul, incluindo os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (59). É espécie genuinamente brasileira e um eficiente vetor do vírus da FAS, como demonstrado em diferentes estudos laboratoriais (57).

Haemagogus janthinomys distribuiu-se amplamente de Honduras ao sudeste do Brasil, incluindo também a Amazônia, além de Peru, Bolívia, Venezuela, Guiana e Argentina (59).

1.3.2 Morfometria de asa

As fêmeas das espécies *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* são indistinguíveis, sendo necessário a obtenção de espécimes machos para a confirmação específica. Nestes, a separação entre essas espécies é levada a efeito com base nos seguintes caracteres da genitália masculina: *Hg. capricornii*: ausência de espiculosidade na face ventral do edeago e *Hg. janthinomys*: presença de numerosa espiculosidade na face ventral do edeago e pela existência de processo medial, em forma de gancho, perto do ápice do paraprocto. A última revisão do gênero foi realizada por Arnell (1973), há 44 anos (59). Contudo, as dúvidas taxonômicas na delimitação desses táxons, ensejam o uso de novas ferramentas de investigação, tanto de abordagem molecular, quanto de melhor comparação morfológica como por exemplo a morfometria geométrica, para que se alcance uma melhor definição sistemática.

Jaramillo, 2011 ressalta que a morfometria geométrica é uma ferramenta matemática baseada em fundamentos biológicos que estuda a co-variação de tamanho e conformação de objetos biológicos com seus fatores causais. Tem

demonstrado ser muito efetiva para separar a variação resultante da fisiologia dos indivíduos (variação de tamanho) daquela mais estável e produto, provavelmente, do componente genético (variação da forma) (72).

De acordo com as observações de algumas espécies de *Haemagogus* da coleção de Culicidae do Centro de Pesquisas René Rachou, feitas pelo líder do instituto Secundino, algumas características morfológicas não correspondiam às descritas por Arnell (1973). Dentre essas diferenças estava o tamanho das células presentes nas asas. Dujardin (2008) afirmou que variações fenotípicas podem aprimorar o conhecimento de insetos de importância médica, uma vez que esses insetos são submetidos a pressões seletivas, como mudanças das paisagens em que vivem por exemplo (73). Assim a morfometria geométrica pode ser utilizada para quantificar essa variação. Segundo Adams et al. (2013) a morfometria geométrica tem demonstrado grande potencial na resolução de problemas taxonômicos, ecológicos e morfométricos, em especial nos insetos (74). Atualmente, esse método tem sido amplamente empregado na distinção de espécies intimamente relacionadas (75–77) e em estudos de microevolução (78–82). Em um estudo realizado por Bruna Demari-Silva (2014) a diversidade do formato de asas de mosquitos da espécie *Culex coronator* foi investigada a fim de estimar a sua diversidade populacional do sul ao sudeste do Brasil. Desta mesma forma este estudo tem como um de seus objetivos específicos a diferenciação de duas espécies crípticas (*Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys*) através da morfometria de suas asas.

1.3.3 Biologia e Ecologia de espécies do gênero *Haemagogus* Williston, 1896

Como os demais mosquitos e insetos em geral, espécies de *Haemagogus* podem ser influenciados por mudanças climáticas, como alterações da temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade (30), o que por conseguinte tem um efeito direto na emergência ou reemergência de doenças infecciosas transmitidas por vetores (61).

Em estudos realizados por Guimarães et al. (1987) e Alencar et al. (2005) foi constatado que o hábito hematofágico de *Hg. janthinomys* é eclético em relação ao hospedeiro, além desta espécie ser altamente adaptativa quanto ao ambiente (62,63). Degallier et al. (2006) observaram que as epizootias e

epidemias em uma área da Amazônia oriental foram associadas ao início da estação chuvosa, quando as densidades de mosquitos são mais altas, acompanhando o incremento do regime pluviométrico da floresta (64).

Os ovos, que resistem por longo tempo antes da eclosão, são colocados isoladamente no substrato úmido de recipientes naturais e eclodem na época mais chuvosa do ano. Os ovos parecem ter respostas diferentes aos estímulos externos para eclosão, como por exemplo, quanto ao número de contatos com a água. Em algumas espécies as primeiras chuvas favorecem ao pronto aparecimento das larvas, enquanto os de outras a eclosão somente ocorre quando a estação chuvosa já está estabelecida (43).

Os ovos de *Hg. janthinomys* eclodem quando entram em contato com água, mas somente parte da postura eclode a cada imersão, com isto permite que os ovos provenientes de uma postura realizada numa época do ano produzam mosquitos em várias épocas (65). No início do período de chuvas no Panamá, ocorre um aumento nas populações de *Hg. equinus* e *Hg. lucifer*, enquanto as populações de *Hg. janthinomys* aumentam 1-2 meses depois (66). Na parte baixa da bacia amazônica, foi calculado que os ovos de *Hg. janthinomys* atingirão sua taxa máxima de eclosão em cerca de dois meses (64). O estudo de Alencar *et al.* (2008) corroborou com os resultados obtidos para *Hg. janthinomys*, *Hg. equinus*, *Hg. lucifer* e *Ochlerotatus terreus* de Galindo, 1955, indicando ser esta uma estratégia comum no gênero e de possível ocorrência em outros gêneros (67).

Os criadouros de *Haemagogus* na sua maioria são representados por ambientes naturais como ocos de árvores, internódios de bambus, cascas de coco, bromélias, dentre outros. (59).

1.4 Eclosão de ovos de Culicidae

A redução da velocidade do desenvolvimento de alguns animais, em especial de insetos, relacionado as estações do ano também conhecido como diapausa, é responsável pela sincronização do ciclo de vida de artrópodes com as mudanças climáticas e as diferentes estações do ano. A dormência dos ovos de algumas espécies de mosquitos pode ser considerada uma estratégia reprodutiva para sobrevivência a longo prazo, principalmente aqueles que se

desenvolvem em habitats considerados temporários, como oco de árvores por exemplo, os quais são submetidos a diversas alterações em seus níveis de água (68).

A diapausa dos ovos envolve um impedimento ou repressão de sua eclosão mesmo quando as condições climáticas estão favoráveis, em contrapartida a quiescência estacional é induzida por condições ambientais desfavoráveis e cessa logo após a exposição a um estímulo adequado para a eclosão dos ovos, como uma inundação (69). Ainda assim alguns ovos em quiescência podem requerer mais de uma inundação para eclodir, o que é conhecido como “incubação em prestações”(45).

Em alguns Aedini como *Haemagogus* spp., *Aedes* spp. e *Psorophora* spp. a dormência acaba assim que as condições ambientais se tornam favoráveis (70). Contudo em um estudo comparativo do efeito de múltiplas imersões de ovos de Aedini conduzido por Alencar et al. 2014, foi visto que embora a maioria dos ovos de *Aedes* e *Ochlerotatus* tenham eclodido na primeira imersão ovos de *Haemagogus* demonstraram uma resposta variada de período de incubação e eclosão (instalment hatching), necessitando de múltiplas imersões nas quais o número necessário para estimular a eclosão dos ovos aumentava para aqueles coletados próximo ao inverno em um período mais seco do ano (71).

1.5 Prevenção de doenças transmitidas por vetores

Uma das causas mais significativas de morbidade no Brasil e no mundo é o acometimento da população por arboviroses. A fim de solucionar esse problema existem algumas estruturas institucionais de âmbito federal no Brasil que atuam no controle dessas doenças, são elas: Departamento de Endemias Rurais (DNERu), Serviço Nacional da Malária, Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) dentre outras. Considerando a complexidade e dificuldade no controle dessas enfermidades é preciso que haja a responsabilização de todos os níveis de governo com ações estaduais e municipais, uma vez que exige atividades realizadas nos locais de habitação e trabalho da população (83).

No ano de 1940 houve a descoberta de inseticidas residuais, o que possibilitou o controle e até mesmo a erradicação de algumas doenças

transmitidas por mosquitos (84–86). Em diversas regiões ao redor do mundo tem sido empregado inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. O mais empregado no Brasil é o DDT (Dicloro-difenil-tri-cloro-etano), este é relativamente barato, possui elevado poder residual, é moderadamente tóxico e possui baixa absorção cutânea, no entanto, ele não é biodegradável. O DDT tem efeito acumulativo na gordura dos animais de sangue quente, pode interferir no mecanismo de sódio/potássio e demonstrou ser carcinogênico em camundongos (86,87). Existem inseticidas químicos alternativos, como por exemplo, os hormônios juvenis, os quais interferem na pupação ou na emergência de adultos. Entre os mesmos, pode-se citar como principal exemplo o Methopreme (Altosid), cuja atividade dura vários dias e este produto possui um dos mais elevados níveis de segurança em relação a outros organismos vivos (88). Existem também os inibidores da formação de quitina, que interferem no processo de muda, e produtos de origem vegetal, como inibidores de crescimento, reprodução e ovoposição ou como repelentes (7).

Organismos que possuem a capacidade de parasitar ou predação mosquitos em suas várias fases evolutivas tem sido alvo de estudos a um bom tempo, prática que se tornou conhecida como controle biológico (7). Segundo Jenkins (1964) já se sabe da existência de 220 predadores invertebrados de larvas de mosquitos, dentre eles se encontram rotíferos, celenterados, platelmintos, moluscos, anelídeos, crustáceos, aracnídeos e insetos (89). Este grupo de organismos foi ampliado por Chapman (1974), incluindo vírus, rickettsias, bactérias, protozoários e fungos. No controle biológico são utilizados parasitas naturais de culicídeos como bactérias, fungos e vírus patogênicos e demais citados acima, que são organismos que retiram recursos do interior do seu hospedeiro para sobreviver, a fim de combater as fases imaturas do mosquito (90–92,92,93). Foi comprovada a atividade larvicida de bactérias do gênero *Bacillus* contra *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (93). As duas espécies mais usadas e estudadas são *Bacillus thuringiensis* H14 (*Bacillus thuringiensis israelensis*) e *Bacillus sphaericus*, pois possuem elevada propriedade larvicida. Ambas contêm endotoxinas proteicas que no momento que são ingeridas pelas larvas causam danos ao epitélio estomacal (7). Contudo, ainda existem desafios relacionados à sensibilidade de formulações de *Bacillus* a fatores externos como luz e calor,

fato que dificulta o uso deste método para o controle de culicídeos de países tropicais (94).

Avanços científicos e tecnológicos nas questões de saúde e ambiente que refletem em uma melhoria nas ações de controle constituem o Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Há também o Sistema de Informação da Vigilância Ambiental em Saúde (SINVAS), que identifica eventos específicos alarmantes a saúde com o acompanhamento dos indicadores de interesse da Vigilância Ambiental. Tanto os determinantes biológicos quanto os não biológicos são levados em consideração pela Vigilância Ambiental, levando em conta características dos vetores e hospedeiros assim como a diversidade e interação de suas populações incluindo fatores ambientais (95).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo analisar a fauna de *Haemagogus* em diferentes áreas de fragmento de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, de modo a associar os mosquitos e as condições climáticas e de vegetação avaliando risco de emergência e transmissão de arbovirose.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de múltiplas imersões de ovos no ciclo biológico das espécies de *Haemagogus* vetores efetivos ou potenciais do vírus da Febre Amarela Silvestre no Brasil;
- Analisar a distribuição das espécies vetores efetivos ou potenciais do vírus da febre amarela silvestre que colonizam as armadilhas de oviposição ovitrampas e avaliar a influência das variáveis climáticas (precipitação, ponto máximo de orvalho e direção) ao longo das estações do ano;
- Determinar e comparar as possíveis diferenças morfométricas entre populações de *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* através da morfometria geométrica de asas;
- Analisar a infecção natural de mosquitos por alguns arbovírus patogênicos ao homem.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Declaração de ética

O projeto teve autorização de coleta com data da emissão em 14/06/2012 e 05/06/2014 da Secretaria de Meio Ambiente e Agricultura. As licenças permanentes para coleta, captura e transporte de material zoológico foram concedida pelo SISBIO N° 34911-1 e N° 44333-1. Todos os membros da equipe de coleta estavam devidamente vacinados contra a FA.

3.1 Área de estudo

As populações dos mosquitos analisadas são provenientes de estudos ecológicos e epidemiológicos coletados pela equipe do Laboratório de Diptera do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz nas seguintes áreas de fragmento de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro: Reserva Biológica de Poços das Antas (Silva Jardim 22° 39' 28.40" S, 42° 23' 47.49" W), Reserva Particular Bom Retiro (Casimiro de Abreu 22° 29' 0.93" S, 42° 12' 5.79" W) e Área de Proteção Ambiental do Sana (Sana 22° 20' 03.9" S, 42° 12' 36.0" W).

Descrição da área

Reserva Particular do Patrimônio Natural Bom Retiro (RPPNBR)

A Fazenda Bom Retiro, está situada no sudeste do Brasil a aproximadamente 140 Km da cidade do Rio de Janeiro, possui área coberta em grande parte por vegetação típica da Mata Atlântica que permanece, durante a maior parte do ano, sob o domínio da Massa Tropical (MTA) originada do Anticiclone Tropical Atlântico. O local apresenta temperaturas médias anuais de 18° a 24°C, devido à intensa radiação solar das latitudes tropicais e forte umidade relativa em razão da intensa evaporação marítima. Por suas características próprias, o domínio dessa massa de ar mantém a estabilidade do tempo, muito embora, durante o ano haja interferência das frentes ou descontinuidades Polares e Linhas de Instabilidade Tropical, que promovem a instabilidade do tempo. Tais correntes perturbadas são responsáveis, em grande parte, pelos totais pluviométricos anuais, em especial, através da contribuição das chuvas estivais. A região da RPPN Fazenda Bom Retiro, localizada na Bacia Hidrográfica do Rio São João, está situada na zona intertropical (latitudes baixas), com radiação solar intensa e grande influência do oceano atlântico, possui clima predominantemente tropical úmido (96) (Figura 8).

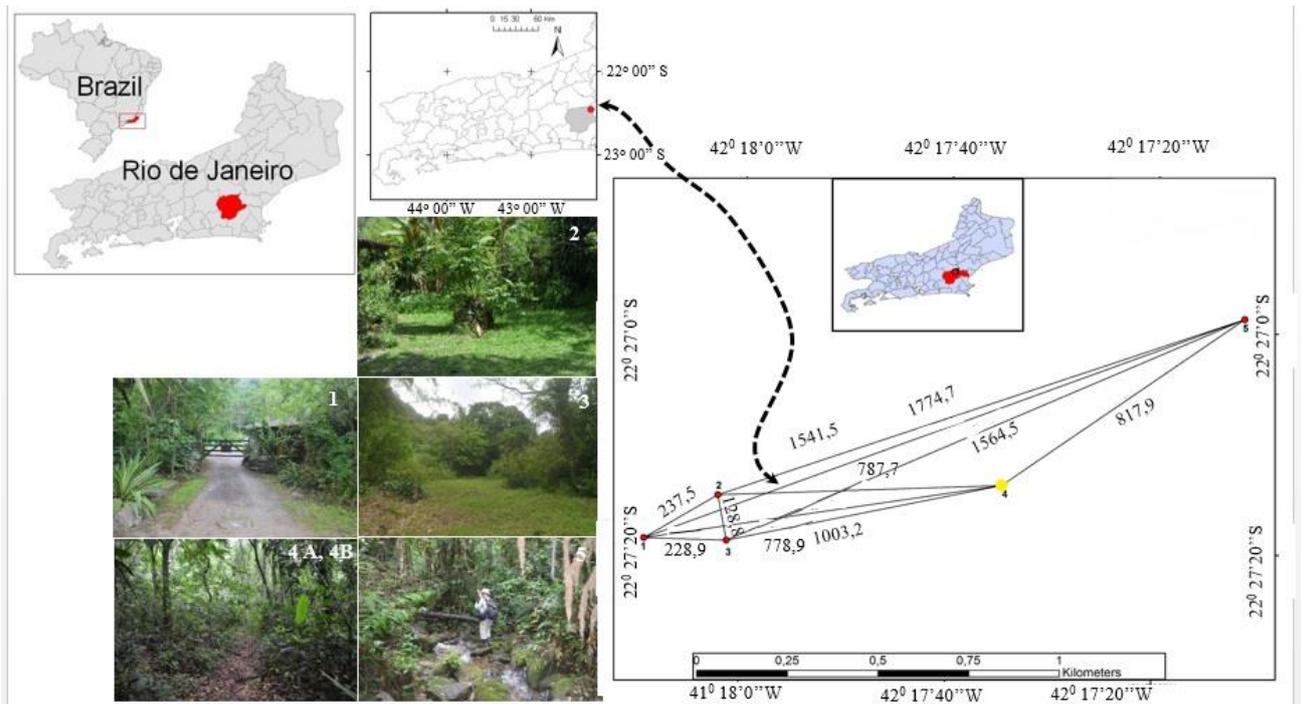


Figura 8. Reserva Particular do Patrimônio Natural Bom Retiro (RPPNBR). Localizada em Aldeia Velha, na divisa dos Municípios Casimiro de Abreu e Silva Jardim no estado do Rio de Janeiro, Brasil (primeira imagem superior a esquerda). As imagens na porção inferior esquerda da figura correspondem a: 1- Entrada da reserva; 2- Localizado próximo à administração; 3- Entrada da floresta; 4- Mata com vegetação original; 5- Apresenta grandes áreas com mata semelhante a estrutura biocenótica original. A imagem na porção inferior direita da figura representa a localização dos pontos de coleta de Culicidae dentro da reserva com as distâncias entre eles.

Reserva Biológica de Poços das Antas

A Reserva de Poço das Antas (22° 30' - 22° 33' S, 42° 5' - 42° 19' W) que está situada no município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, com superfície de cerca de 5000 ha (97) (Figura 9). Nos tempos anteriores à criação da Reserva, a região abrigava diversas fazendas de criação de gado, onde havia algumas culturas de subsistência, pomares, pastos e remanescentes florestais. A cobertura vegetal da Reserva é atualmente constituída por áreas de formação pioneira com influência fluvial, campos antrópicos, capoeiras aluviais, capoeiras submontanas, florestas aluviais e florestas submontanas (98). Os fragmentos florestais remanescentes são testemunhos das matas que originalmente recobriam as planícies aluviais e morros mamelonares da planície costeira fluminense. O clima da região é quente e úmido com estação chuvosa no verão, sem inverno pronunciado e as temperaturas médias anuais são elevadas durante quase todo o ano. A média das temperaturas máximas é de 30°C - 32°C e as mínimas não ultrapassam os 18°C. A precipitação média anual é de 1.000 mm e está concentrada nos meses de outubro a abril, sendo julho e agosto os meses menos chuvosos (97).

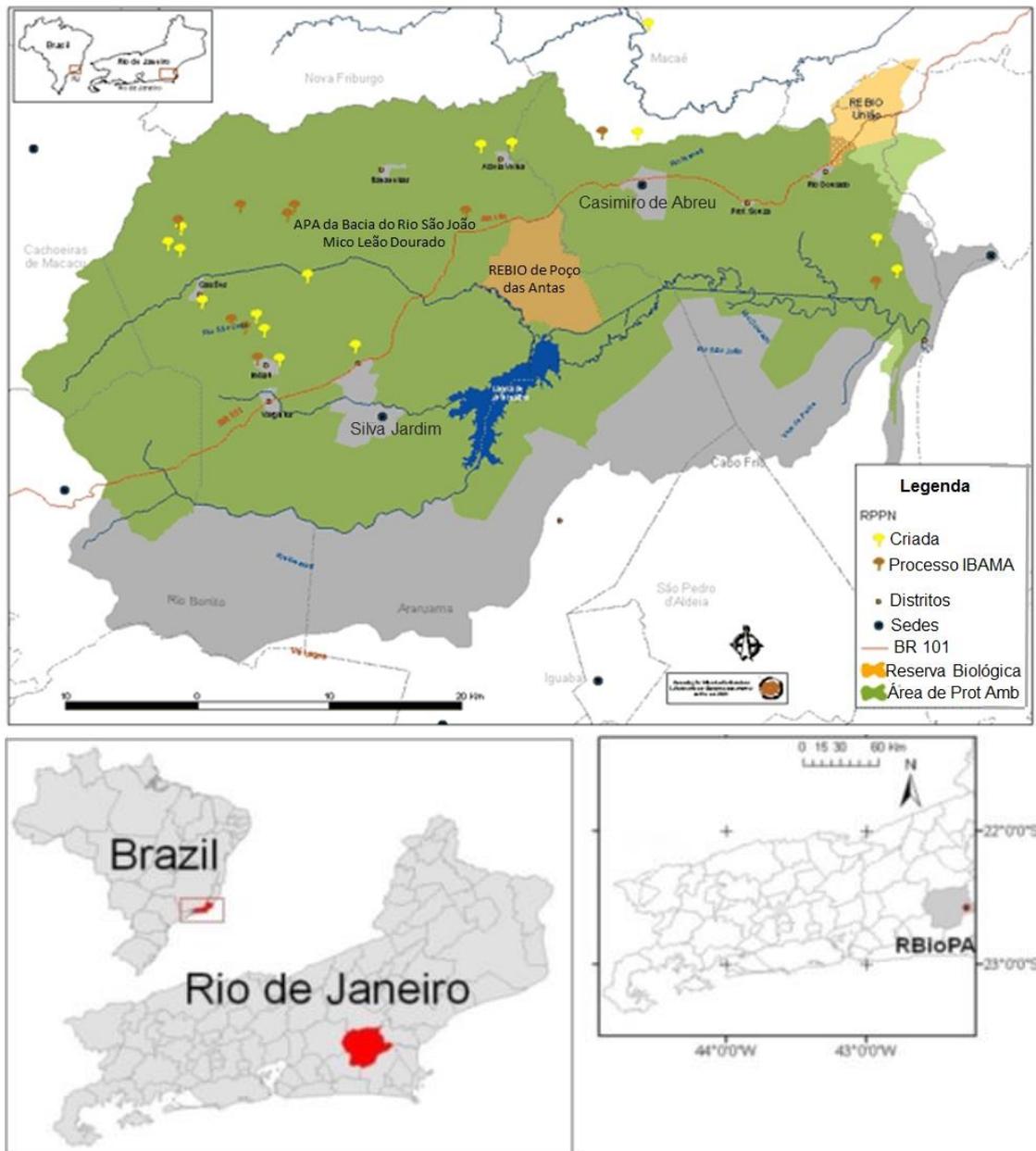


Figura 9: Área da Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. A área de proteção ambiental está marcada em verde e a Reserva Biológica está marcada em laranja.

A área de Proteção Ambiental do Sana (Sana 22° 20' 03.9" S, 42° 12' 36.0" W) está localizada no 6º distrito de Macaé no estado do Rio de Janeiro (99) (Figura10). Foi criada em 2001 pela Lei Municipal 2172, com o objetivo de disciplinar o processo de ocupação, promover o desenvolvimento sustentável a partir dos recursos naturais e proteger a diversidade biológica. Tem como conselho gestor o Sanapa (Conselho Gestor da APA do Sana) criado pelo decreto Municipal nº 075/2002, que é um órgão colegiado, servindo como unidade de planejamento e gerenciamento, desta forma antes que sejam realizadas quaisquer ações nessa área o poder público deve consultar esse conselho (100). O Sana compreende uma área de 15,7 hectares localizada em um vale rodeado de montanhas que apresenta Mata Atlântica do tipo secundária constituída por uma extensa área de Floresta Ombrófila Densa incluindo diversas cachoeiras e uma alta diversidade de espécies da fauna e flora (101,102). A Bacia do Rio Sana, localizada na maior parte do território da APA do Sana, é o maior e mais importante contribuinte hídrico do Rio Macaé (103).

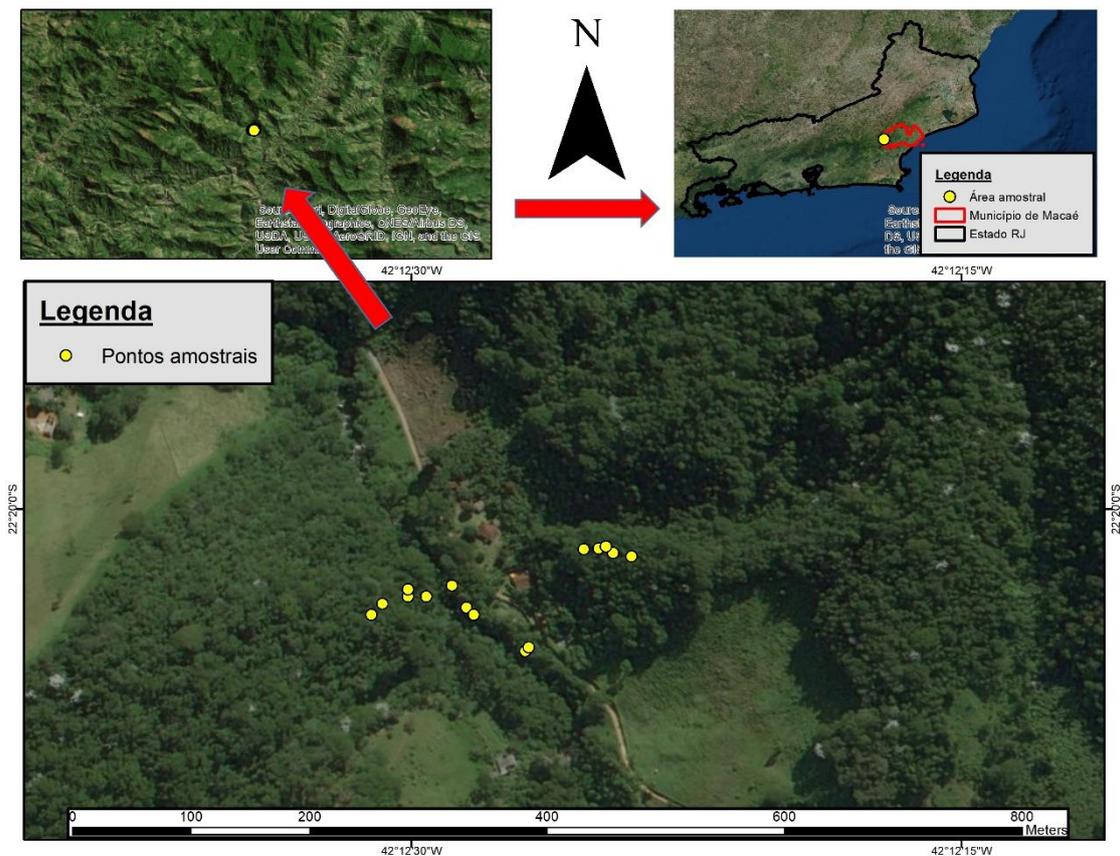


Figura 10: Área Proteção Ambiental do Sana. Imagem superior esquerda: Localização do ponto de coleta dentro da reserva. Imagem superior direita: Localização da reserva dentro do município de Macaé no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Imagem inferior: Localização dos pontos amostrais contendo as ovitrampas dentro do Sana.

3.2 Captura dos espécimes - Culicidae

- Estabelecimento de pontos de amostragens com diferentes coberturas vegetais, nos quais foram realizadas capturas mensais.

- Para a captura dos espécimes adultos utilizou-se armadilha CDC luminosa CO₂[®]. A armadilha é constituída por uma cobertura discoidal metálica, que a protege da chuva e materiais que possam cair sobre ela, possui uma lâmpada de 6V/250mA, um motor (6V) com hélice de aspiração composto por 4 pás de plástico rígido, alimentado por quatro pilhas 1,5 VCC tipo AA, o motor é instalado de forma a sugar o inseto para dentro do saco coletor o qual é formado por uma tela fina de nylon dobrável tendo um elástico na parte superior que prende ao corpo da armadilha possibilitando seu fechamento total e impedindo a fuga dos insetos (Figura 11). A duração da coleta com o uso de CDCs foi de 6:00 hs as 18:00hs, alocadas simultaneamente em pontos fixos, a uma altura de (2,50m).

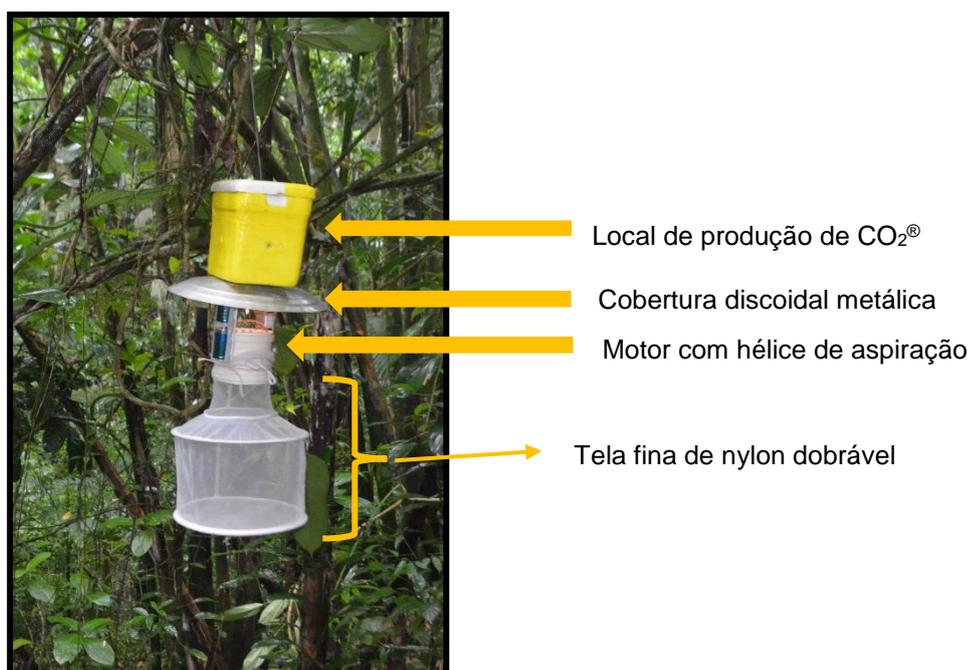


Figura 11. CDCs automática com CO₂[®]

Para coletas dos ovos foram utilizadas armadilhas do tipo ovitrampas, constituídas por pote preto fosco, com capacidade para o volume de um litro, sem tampa com quatro palhetas de madeira compensada (placas de eucatex), de 2,5 cm X 14 cm, presas verticalmente no interior da armadilha por “CLIPS” (Figura 12). No pote adicionava-se água natural e serapilheira, visando reproduzir um ecossistema mais próximo do natural. As armadilhas foram instaladas aleatoriamente entre: (solo, 1,50 a 5,00m do nível do solo) em ambiente florestal, sendo as palhetas substituídas quinzenalmente e identificadas de acordo com o ponto e acondicionadas em uma câmara úmida para transporte ao laboratório de Díptera do Instituto Oswaldo Cruz.



Figura 12. Ovitrapas fixadas com nylon aos troncos de bambus

As palhetas positivas foram separadas no laboratório, submetidas à contagem dos ovos e imersas em bandejas transparentes contendo água MiliQ®. Em seguida os ovos foram colocados em ambiente experimental controlado, em estufa com termoperíodo e fotoperíodo regulada à temperatura de $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 75 a 90% e fotoperíodo de 10 horas, sendo os espécimes mantidos vivos para determinação específica ao atingir a fase adulta.

As variáveis climáticas temperatura, umidade relativa do ar e precipitações pluviométricas foram obtidas junto ao Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (104).

3.3 Processamento dos mosquitos

A identificação das espécies foi realizada a partir da observação direta dos caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio estereomicroscópio (Zeiss®) e consulta às descrições/diagnoses respectivas das spp., utilizando chaves dicotômicas elaboradas por Arnell (1973), Forattini (2002) e Marcondes & Alencar (2010) (52,53,59). As abreviaturas dos nomes genéricos e subgenéricos seguem a proposta de Reinert (2009) (105). Após a determinação específica, todos os espécimes serão incorporados à Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

3.4 Detecção de arbovírus em culicidae

Os culicídeos adultos vivos foram capturados com auxílio de tubos de sucção que se encontravam em repouso sobre a vegetação circunvizinha e através de armadilhas CDC com CO₂. Posteriormente os espécimes coletados foram levados ao laboratório onde foi realizada a identificação através da caracterização morfológica seguindo as chaves dicotômicas elaboradas por Arnell (1973) e Forattini (2002) (49,50).

3.4.1 Maceração dos espécimes

Grupos de até 20 espécimes de culicídeos adultos previamente identificados e separados por espécie, sexo, data e local de captura foram acondicionados em tubos eppendorf de 2mL para a maceração. O meio de cultura utilizado foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) acrescido de antibiótico e 1% de Fungizona (Gibco 20150mg/mL). Esferas de zircônia foram adicionadas aos tubos de 2mL que continham as amostras e o meio DMEM, estes foram submetidos ao processamento no TissueLyser LT (Quiagen) a 50 1/s por 2 min e centrifugados a 12.000 rpm por 10min. O sobrenadante do produto triturado foi aspirado e mantido em criotubos a -70°C.

3.4.2 Extração do RNA

Os sobrenadantes advindos dos macerados foram submetidos a extração de RNA através da utilização do Kit Stratec Molecular RTP Pathogen. Inicialmente adiciona-se 400ul do sobrenadante de cada amostra em Tubos L de Extração, estes são vortexados e incubados por 15 min a 65° C, no Thermomix

C eppendorf. Após esse período os tubos são centrifugados e adiciona-se 400ul do tampão de ligação (Binding Solution), esta mistura é então homogeneizada e transferida para o Filtro RTA Spin, que é então centrifugado por 2min a 11.000 rpm. Partindo desta etapa há a troca do tubo coletor cada vez que o filtro é lavado. São realizadas duas lavagens. Na primeira, adiciona-se 500µl do tampão de lavagem R1 (Wash Buffer R1), as amostras são então centrifugadas a 11.000 rpm durante 1 min. Na segunda, são adicionados 700µL de tampão de lavagem R2 (Wash Buffer R2), novamente submetido a centrifugação de 11.000 rpm por 1 min, com uma etapa adicional de centrifugação, sem reagentes, a 14.000 rpm por 4 min, a fim de retirar todo e qualquer excesso dos reagentes adicionados anteriormente. Ao final desta etapa, descarta-se o tubo coletor e o filtro é então acoplado a um tubo de eluição, no qual fica armazenado o RNA extraído. São adicionados diretamente ao filtro, 60µl do tampão de eluição que é incubado por 3 min à temperatura ambiente e após esse tempo, centrifugado por 1 min a 11.000 rpm. O material extraído é armazenado a -70° C.

3.4.3 Detecção Viral

Foi realizada a pesquisa de flavivirus utilizando a Reação em cadeia da Polimerase precedida da reação de transcrição reversa (RT-PCR). Para isso, foi utilizado o protocolo descrito por Day-Yu e colaboradores (2007) desenhado para detecção dos principais flavivírus de importância médica, realizando pequenas alterações. Foi utilizado o kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR, Catalog number: 12574018, fabricado pela Invitrogen respeitando as recomendações do fabricante. Do RNA extraído foram utilizados 5 µL para a reação. O protocolo possui duas etapas, uma de RT, sendo a primeira de 50°C por 30min e a segunda de 94°C a 2 min – desnaturação de fitas e cDNA-. Após essa etapa, tem-se 3 etapas constituídas de 45 ciclos, sendo 94°C por 15seg, 55°C por 30seg e 72°C por 1min, para a amplificação do fragmento. A etapa final de extensão da fita é feita a 72°C por 5min.

3.4.4 Eletroforese em gel de agarose

As análises dos produtos da amplificação foram feitas, através de eletroforese em gel de agarose. No preparo do gel foi utilizado tampão TAE1X e agarose g/ml (Pronadisa molecular biology) em uma concentração de 2%. O produto da amplificação tem o tamanho aproximado de 470pb. Como tampão de amostra foi utilizado o corante Blue Green Loading Dye I. A eletroforese foi realizada em cuba vertical (Nova) a 101 V, até o corante atingir aproximadamente 2/3 do gel. Foram utilizados 5µl do marcador de padrão molecular (DNA Ladder da Invitrogen100bp), para comparação de tamanho dos fragmentos. Após a corrida, as bandas foram visualizadas através do fotodocumentador Biorad – Gel Doc™ XR+ por incidência de luz UV.

3.5 Análise da morfometria das asas

Insetos: As populações de *Haemagogus* utilizadas neste estudo provieram de estudos ecológicos e epidemiológicos desenvolvidos pela equipe do Laboratório de Díptera e da Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz. Um total de 108 asas direitas e esquerdas de fêmeas pertencentes a *Haemagogus capricornii* (n = 31) e *Hg. janthinomys* (n = 77) provenientes dos estados brasileiros Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia e Alagoas, foram utilizadas neste estudo. Os insetos foram depositados na Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil. As identificações das espécies foram realizadas a partir da observação direta dos caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio óptico (Leica DMD108®) e consulta às descrições/diagnoses respectivas das spp, utilizando chaves dicotômicas elaboradas por Arnell (1973), Forattini (2002) e Marcondes e Alencar (2010) (52,53,59). As abreviaturas dos nomes genéricos e subgenéricos seguem a proposta de Reinert (2009) (105). Uma vez identificadas, as asas foram extirpadas seguindo a metodologia proposta por Alencar et al. (2016) e posteriormente fotografadas sem aumento, usando estereomicroscópio com câmera acoplada (Leica EZ4HDt; Leica, Wetzler, Germany) (106). As imagens incluíram a escala de referência.

Variáveis de tamanho e forma: Quatorze marcos de tipo 1 foram selecionados e incluídos nas análises (107) (Figura 13).

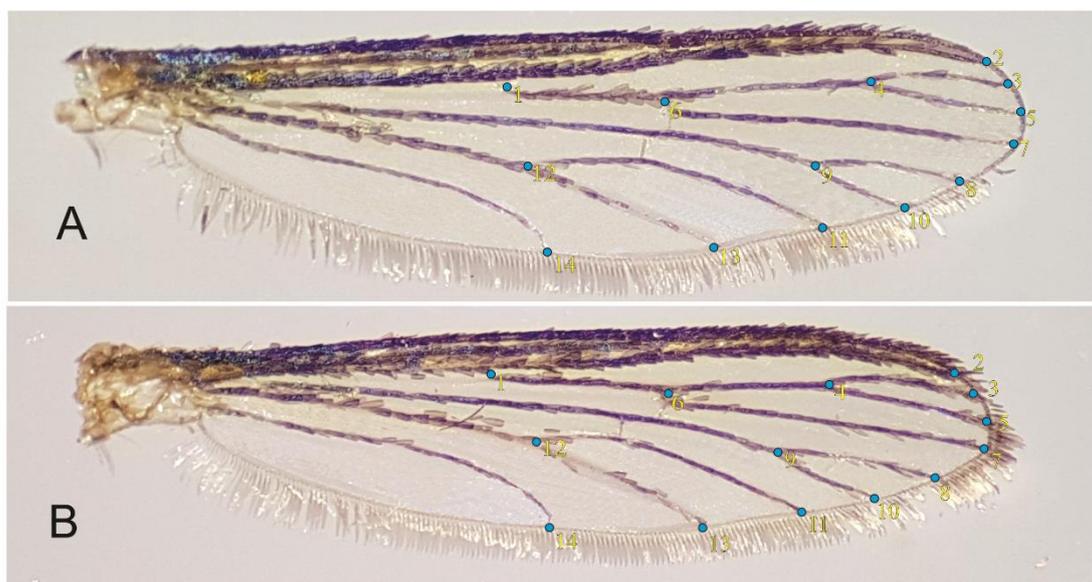


Figura 13. Asa e consenso alar de fêmeas de *Haemagogus capricornii* (A) e *Hg. janthinomys* (B), com os 14 pontos anatômicos.

Foram utilizados dados de coordenadas, o estimador isométrico e tamanho de centróide (CS) para comparar o tamanho geral das asas entre as espécies. O teste de Mann-Whitney foi aplicado a comparações de CS de espécies e populações. As variáveis de forma (urdiduras parciais e componentes uniformes) foram obtidas utilizando o algoritmo de superposição de análise generalizada *Procrustes*: As distâncias de Mahalanobis derivadas das variáveis de forma foram usadas para explorar a proximidade da forma entre as espécies. O significado estatístico foi determinado por testes de permutação (1.000 execuções cada) e corrigidos pelo método de Bonferroni.

A porcentagem de semelhança fenotípica entre espécies e populações foi calculada utilizando o teste de verificação cruzada da análise discriminante. A correlação entre distâncias geográficas e Mahalanobis foi examinada por um teste de Mantel (10.000 permutações) usando distâncias geográficas de linha reta entre os locais de coleta. As variáveis de forma foram regredidas em CS por análise de regressão multivariada para detectar alometria.

As coordenadas geométricas de cada ponto marcado foram digitalizadas usando o programa tpsDig versão 2.09 (108). O tamanho do Centroid, a análise generalizada de Procrustes, as distâncias de Mahalanobis, o teste de permutação e a alometria foram realizados utilizando os módulos VAR, MOG, PAD e COV, respectivamente, incluídos no pacote CLIC93 (109).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos efeitos de múltiplas imersões de ovos de *Haemagogus leucocelaenus*, *Hg. janthinomys* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em condição experimental

Durante o período de amostragens foram coletados 6721 ovos, dos quais 1928 (28,7%) já estavam eclodidos nas palhetas, dos 4793 que não estavam eclodidos, 3833 (57,0%) eclodiram após as imersões em laboratório. Essas eclosões resultaram em três espécies: *Hg. leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924): 1100 espécimes (28,7%); *Hg. (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921: 62 espécimes (1,6%); *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894: 327 espécimes (8,5%), totalizando 1489 (38,8%) espécimes que chegaram à fase adulta em laboratório e 2344 (61,2%) que não obtiveram sucesso. Os somatórios dos ovos não mostraram um padrão de eclosão definido durante os meses de coleta, e ao longo dos meses de amostragem os ovos provenientes dos meses de novembro, dezembro, fevereiro, abril e outubro apresentaram maiores taxas de eclosão. Em contrapartida, as menores taxas de eclosão foram registradas nos ovos oriundos dos meses de janeiro, maio e julho (Figura 14).

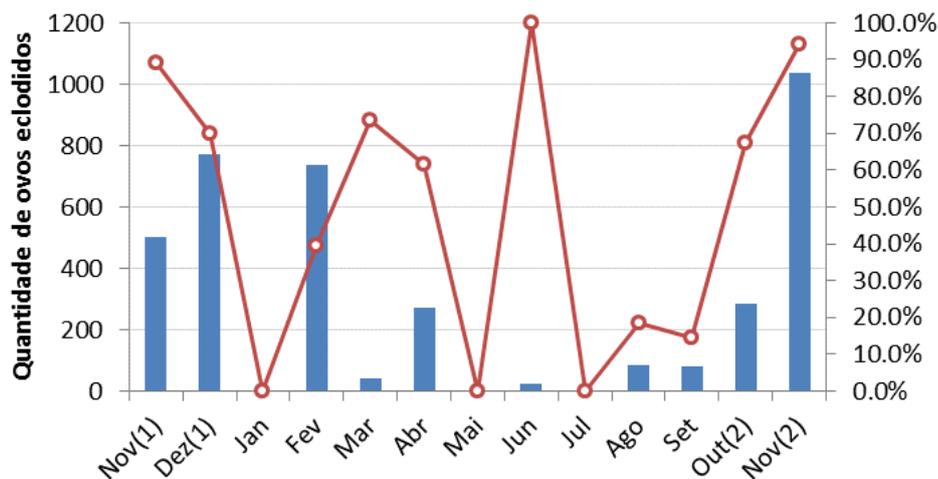


Figura 14. Percentual (%) de ovos eclodidos por mês, de novembro de 2015 a novembro de 2016.

Analisando a totalidade dos ovos coletados, as estações do ano que se mostraram mais favoráveis aos culicídeos foram verão e primavera, principalmente devido à alta frequência nos meses de novembro, dezembro e fevereiro. As estações do ano de menor frequência foram outono e inverno.

Haemagogus leucocelaenus foi a espécie que apresentou maior densidade populacional em todos os períodos amostrais estudados, sendo seguido de forma semelhante no comportamento de oviposição por *Ae. albopictus*. Em contrapartida, *Hg. janthinomys* foi a espécie menos frequente durante as coletas. Os de ovos de *Hg. leucocelaenus* foram coletados em todos meses amostrais, e sempre com maior taxa de viabilidade, exceto nos meses de abril e agosto.

O teste estatístico de Mann-Whitney (0,05) apontou diferença não significativa entre *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus* ($p=0,21$), no entanto, foi observado diferença significativa entre: *Ae. albopictus* vs *Hg. janthinomys*: $p<0,01$, e *Hg. leucocelaenus* vs *Hg. janthinomys*: $p<0,01$.

Foi possível observar que os indivíduos de *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* mantidos em câmara climatizada, apresentaram o ponto mais elevado de eclosibilidade na 3ª e na 22ª imersão (Figura 15).

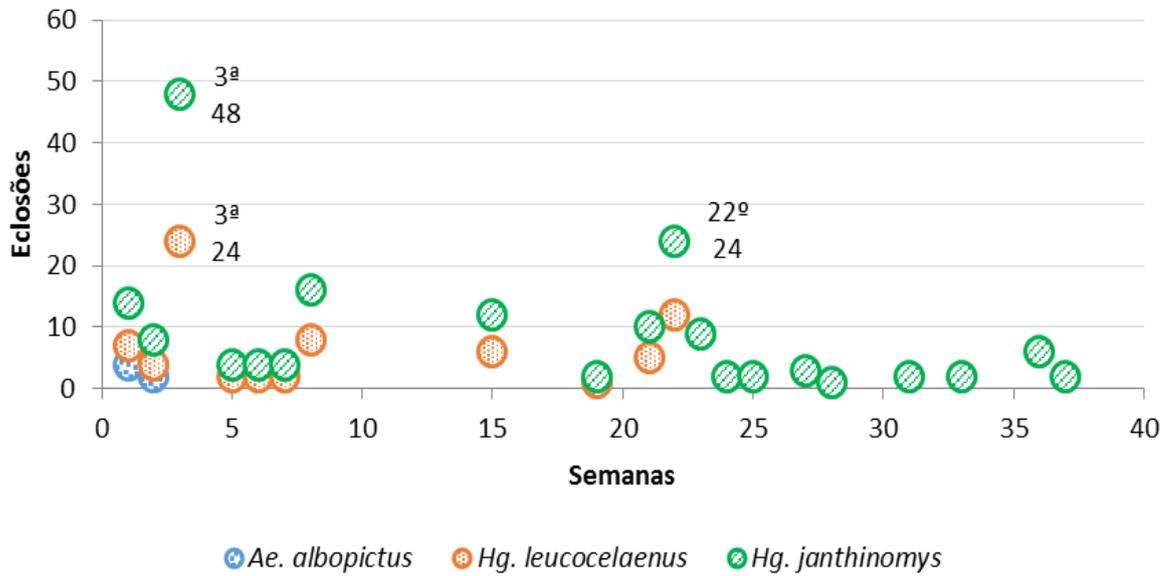


Figura 15. Taxa de eclosão representada por imersão de ovos coletados em armadilha ovitampa, nos meses de outubro e novembro de 2015, Reserva RPPNBR, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Esfera azul pontilhado maior (*Ae. albopictus*), vermelho pontilhado menor (*Hg. leucocelaenus*) e verde listrado diagonal (*Hg. janthinomys*). O ponto mais elevado de eclosibilidade de espécimes de *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*, pode ser observado na 3ª e na 22ª imersão.

Os presentes resultados mostram os efeitos variáveis das imersões, ovos de *Ae. albopictus* apresentou viabilidade e eclosão de seus ovos logo nas primeiras imersões (1ª e 2ª), enquanto *Hg. leucocelaenus* demonstrou viabilidade de eclosão até a 21ª, já a viabilidade dos ovos de *Hg. janthinomys* pode ser observada até a 37ª imersão das quais foram submetidos (Figura 16).

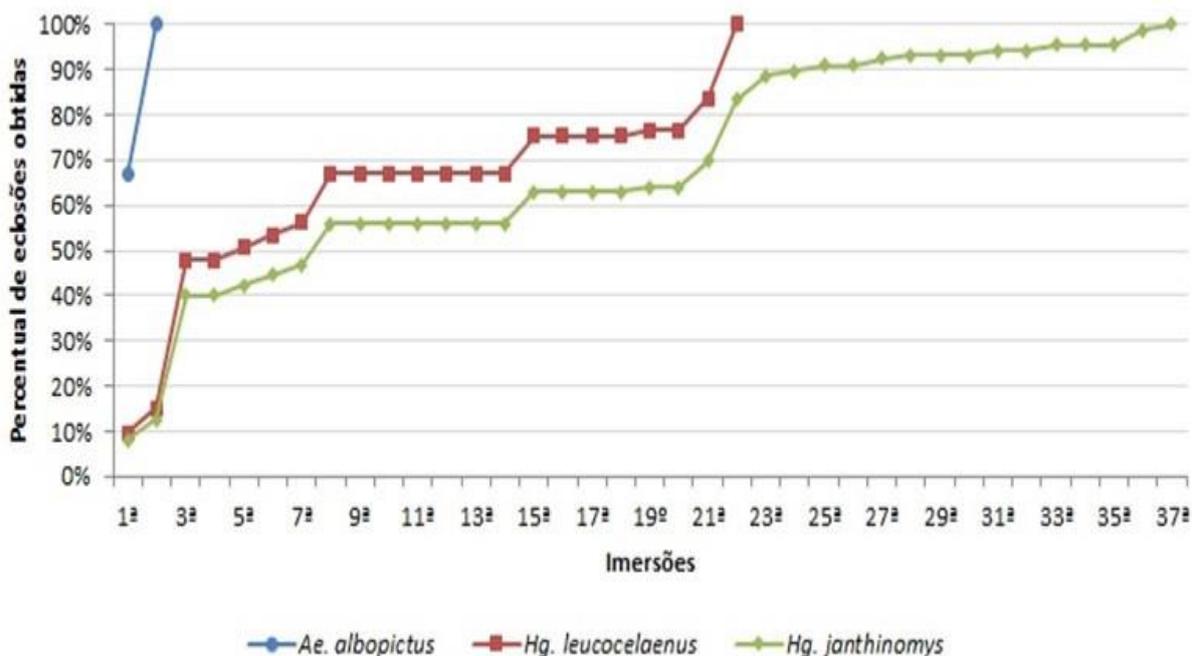


Figura 16. Efeito cumulativo de várias imersões dos ovos de *Ae. albopictus*, *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*, coletados nos meses de outubro e novembro de 2015, RPPNBR, estado do Rio de Janeiro, Brasil. A linha azul com círculo representa a espécie *Ae. albopictus*, linha vermelha com quadrado *Hg. leucocelaenus* e a linha verde com losango representa a espécie *Hg. janthinomys*.

4.2 Comunidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em armadilhas de oviposição introduzidas em Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil

Durante o período de coleta de outubro de 2015 a dezembro de 2016, foram coletados 7186 ovos e 1469 espécimes de Culicidae foram identificados, representando três gêneros e cinco espécies: *Hg. (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924): 935 espécimes; *Hg. (Haemagogus) janthinomys* (Dyar, 1921): 70 espécimes; *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894): 155 espécimes; *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1752): 42 espécimes; *Culex (Carrollia) iridescens* (Lutz, 1905): 4 espécimes; e *Limatus durhamii* (Theobald, 1901): 2 espécimes (Tabela 1).

Varição mensal – A maior abundância de *Hg. leucocelaenus* foi observada em dezembro de 2015 e novembro de 2016, enquanto que *Hg. janthinomys* foi mais frequente nos meses de fevereiro e novembro de 2016. *Ae. albopictus* foi encontrado com maior frequência nos meses de outubro e novembro de 2015, enquanto que *Ae. aegypti* e *Cx. iridescens* foram mais abundantes em outubro de 2015 e novembro de 2015, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1. Porcentagem e o número de espécies coletadas de cada um dos pontos de coleta localizados na Reserva Natural Privada Bom Retiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil, de outubro de 2015 a outubro de 2016.

Espécies	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4 A	Ponto 4 B	Ponto 5	Total	%
<i>Haemagogus janthinomys</i>	0	0	0	1	5	57	63	5.22%
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	2	0	0	137	633	220	992	82.26%
<i>Aedes albopictus</i>	44	55	3	0	1	0	103	8.54%
<i>Aedes aegypti</i>	0	0	0	0	42	0	42	3.48%
<i>Culex iridescens</i>	0	0	0	0	4	0	4	0.33%
<i>Limatus duhamii</i>	0	0	0	2	0	0	2	0.17%
Total	46	55	3	140	685	277	1206	100%

Tabela 2. Abundância relativa e percentual de espécies de mosquitos coletados através de armadilha de ovitrampa na RPPNBR, Rio de Janeiro, de out. 2015 a dez. 2016.

		RPPNBR / Número de espécies por mês						
Espécies		<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	<i>Haemagogus janthinomys</i>	<i>Culex iridescens</i>	<i>Limathus durhami</i>	TOTAL
Período								
2015	Out	42	42	67	4	0	0	155
	%	3.48%	3.48%	5.56%	0.33%	0.00%	0.00%	10.55%
	Nov	54	0	82	2	4	0	142
	%	4.48%	0.00%	6.80%	0.17%	0.33%	0	11.77%
	Dez	6	0	219	2	0	0	227
	%	0.50%	0.00%	18.16%	0.17%	0.00%	0.00%	18.82%
2016	Fev	0	0	132	41	0	0	173
	%	0.00%	0.00%	10.95%	3.40%	0.00%	0.00%	14.34%
	Mar	0	0	14	0	0	0	15
	%	0.00%	0.00%	1.16%	0.00%	0.00%	0.00%	1,24%
	Abr	9	0	22	0	0	0	31
	%	0.75%	0.00%	1.82%	0.00%	0.00%	0.00%	2.57%
	Maio	0	0	0	0	0	2	2
	%	0%	0%	0%	0.00%	0.00%	0.17%	0.17%
	Jun	19	0	0	0	0	0	19
	%	1.58%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.58%
	Jul	0	0	0	0	0	0	0
	%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Ago	0	0	9	0	0	0	9
	%	0.00%	0.00%	0.75%	0.00%	0.00%	0.00%	0.75%
	Set	0	0	26	1	0	0	26
	%	0.00%	0.00%	2.16%	0.08%	0.00%	0.00%	2.16%
	Out	0	0	31	1	0	0	31
	%	0.00%	0.00%	2.57%	0.08%	0.00%	0.00%	2.57%
Nov	25	0	333	18	0	0	376	
%	2.07%	0.00%	27.61%	1.49%	0.00%	0.00%	31.18%	
Dez	0	0	0	0	0	0	0	
%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Total		155	42	935	70	4	2	1206
%		1.85%	3.48%	77.53%	5.80%	0.33%	0.17%	100.00%

As variáveis climáticas que estavam significativamente correlacionadas com as densidades dos mosquitos foram a precipitação (P: 0,0080), o ponto de orvalho máximo (P: 0,0348) e a direção (P: 0,0346). *Hg. janthinomyx* foram correlacionados positivamente com as três variáveis climáticas, enquanto que *Hg. leucocelaenus* apresentaram correlação positiva com a precipitação e o ponto máximo de orvalho, e foram correlacionados negativamente com a direção (Figura 17).

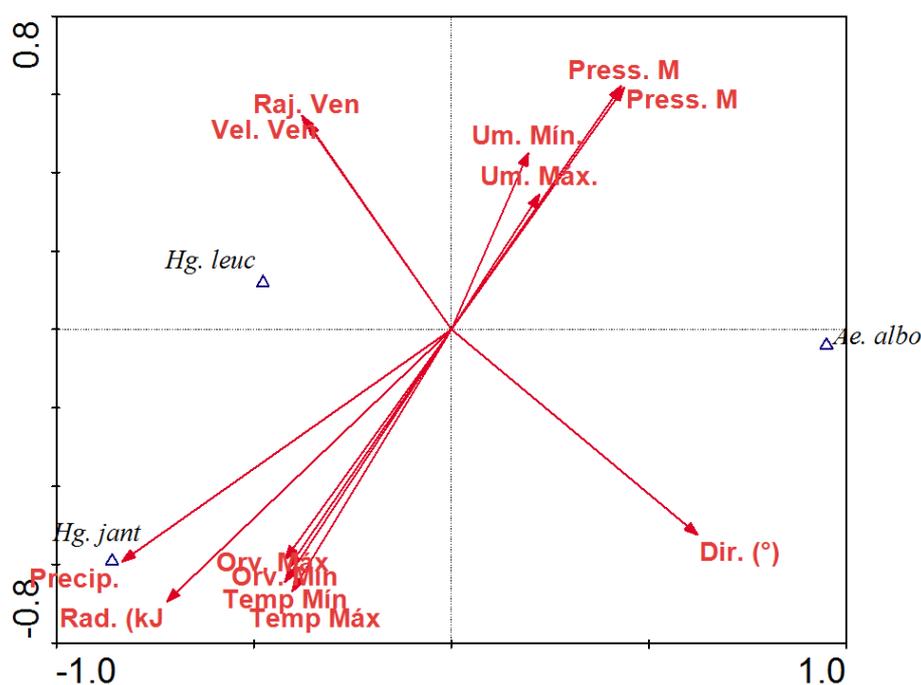


Figura 17. Direção e proximidade das variáveis climáticas. Os vetores vermelhos indicam a direção e a proximidade das variáveis climáticas em relação a cada uma das espécies estudadas. Quanto maior a proximidade destes vetores com as espécies (em triângulo azul representativo das respectivas populações) maior a interação entre os dois. Dir. (°) (Direção), Orv. Max (Ponto máximo de orvalho), Orv. Min (Ponto mínimo de orvalho), Temp Min (Temperatura mínima), Temp Max (Temperatura máxima), Precip. (Precipitação), Rad. (Radiação), Raj. Ven. (Rajadas de vento), Vel. Ven. (Velocidade do vento), Press. M (Pressão máxima), Press Min. (Pressão mínima), Um. Mín. (Úmidade mínima), Um. Max (Úmidade máxima).

Com base no número de ovos de mosquito coletados, os resultados revelaram um alto nível de densidade populacional de vetores no verão e na primavera, incluindo 2002 e 1102 ovos em fevereiro e novembro de 2016, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Número de ovos eclodidos e não eclodidos coletados de outubro de 2015 a novembro de 2016 na Reserva Natural Privada Bom Retiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Meses / Anos	Ovos eclodidos	Ovos não eclodidos	Total
Outubro/2015	36	408	444
Novembro/2015	73	492	565
Dezembro/2015	105	998	1.103
Fevereiro/2016	818	1.184	2.002
Março/2016	14	43	57
Abril /2016	81	281	362
Maio/2016	0	1	1
Junho/2016	0	21	21
Julho /2016	69	42	111
Agosto/2016	168	283	451
Setembro/2016	280	268	548
Outubro/2016	117	302	419
Novembro/16	238	864	1102
Total	1999	5187	7186

Uma regressão linear simples foi realizada usando o software R, versão 3.4.1, com um índice de confiança de 95% e $P < 0,05$ para analisar a correlação entre o número de ovos e as chuvas, utilizando o número de ovos como variável discreta e precipitação como a variável contínua (Tabela 4). A análise de regressão revelou que o número de ovos de Culicidae estava significativamente associado à precipitação ($P: 0,003561$) (Figura 18).

Tabela 4. Número de ovos coletados na Reserva Natural Privada Bom Retiro, estado do Rio de Janeiro de fevereiro a outubro de 2016, e precipitação em mm de acordo com os dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Meses	Ovos	Precipitação (mm)
Fev/16	2002	0.56
Mar/16	57	0.29
Abr/16	362	0.06
Mai/16	1	0.06
Jun/16	21	0.07
Jul/16	111	0.01
Ago/16	451	0.02
Set/16	548	0.07
Out/16	419	0.11
Nov/16	1102	0.39

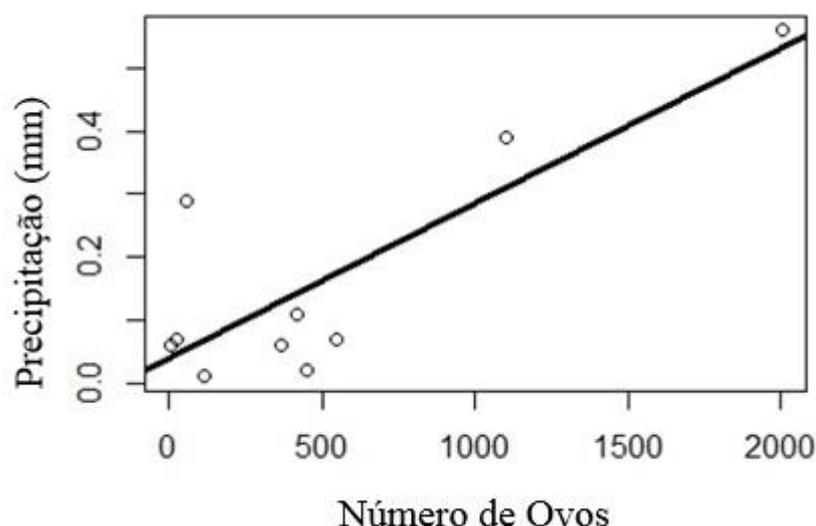


Figura 18. Número de ovos coletados na RPPNBR, estado do Rio de Janeiro, Brasil, de fevereiro a outubro de 2016, e precipitação em mm (INMET).

Para entender as desigualdades ou semelhanças entre as unidades de amostragem, utilizou-se uma escala multidimensional não métrica (NMDS). O objetivo do NMDS foi o de representar a posição original das comunidades de mosquitos no espaço multidimensional com a maior precisão possível usando um pequeno número de dimensões que podem ser facilmente plotadas e visualizadas. A Figura 18 mostra o nível de semelhança e diferenças entre os

pontos de amostragem de coleta com base na proximidade entre eles. As coordenadas 1 e 2 auxiliam na alocação desses pontos em um plano cartesiano.

Os locais de coleta mais distintos observados foram os pontos 4A e 4B. Os locais de amostragem mais semelhantes foram os pontos 1 e 2. Os locais de amostragem 4A e 3 foram semelhantes em relação à coordenada 1; no entanto, demonstraram ser distintos do ponto de vista da coordenada 2. Os pontos 3 e 4 B foram semelhantes em relação à coordenada 2; no entanto, demonstraram ser muito divergentes de acordo com a coordenada 1 (Figura 19).

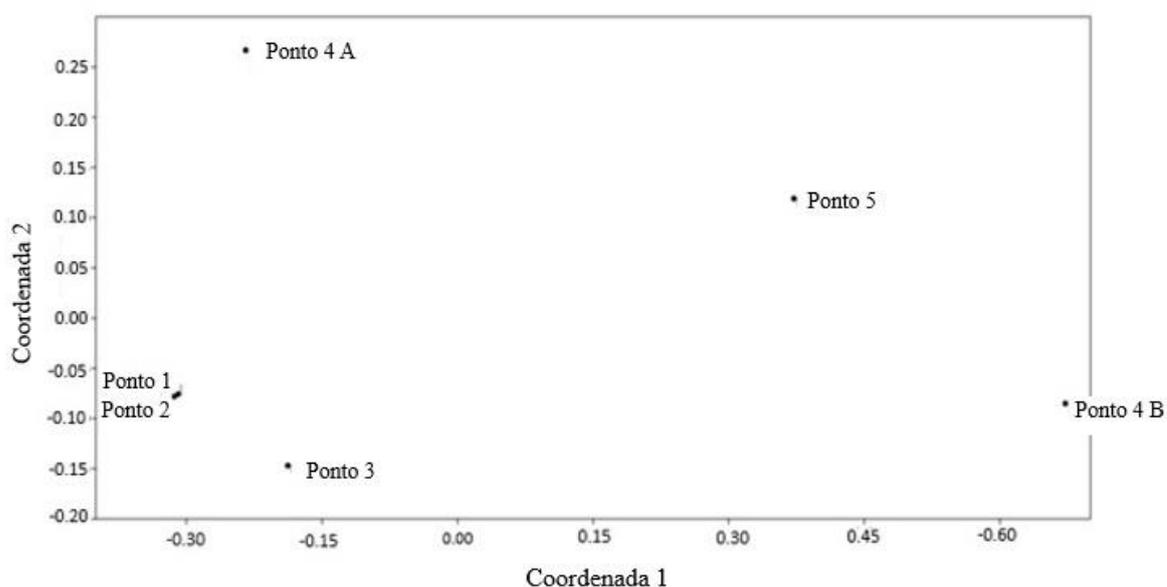


Figura 19. Avaliação das diferenças significativas entre os locais de coleta (Ponto 1, Ponto 2, Ponto 3, Ponto 4 A, Ponto 4 B e Ponto 5).

4.3 Discriminação morfométrica entre populações de *Haemagogus capricornii* e *Hg. janthinomys* (Diptera: Culicidae) em áreas de floresta Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Tamanho: o teste Mann-Whitney revelou que o tamanho centróide das asas de *Hg. capricornii* foi significativamente menor ($P < 0.0001$) que as de *Hg. janthinomys*. A análise entre as populações de *Hg. capricornii* não mostrou

diferenças significativas ($P > 0.06$). Porém, entre as populações de *Hg. janthinomys* foram detectadas diferenças significativas.

Conformação: O teste de permutação baseado nas distâncias de Mahalanobis relevou diferenças significativas para a conformação das asas entre as duas espécies ($p < 0.0001$). A “cross-checked” classificação dos indivíduos de *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* mostraram bons intervalos de reclassificação entre 81% e 67% respectivamente. As análises multivariadas, realizadas para comparar as populações destas espécies, revelaram diferenças significativas entre algumas populações (Tabela 2). A contribuição dos fatores canônicos resultou de 38%, 26% e 15% para o primeiro, segundo e terceiro fator respectivamente. As populações de *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* mostraram aceitáveis rangos de reclassificação variando entre 22% e 77%. Populações de *Hg. capricornii* mostraram baixos rangos de reclassificação (30-42%). Populações de *Hg. janthinomys* exibiram o melhor espectro de reclassificação, de baixo (22% Bahia), médio (42% Rio de Janeiro) a alto (77% Atalaia, Rio de Janeiro). O dendograma UPGMA mostra as semelhanças na conformação das asas encontradas entre as populações.

Alometria: a análise de regressão multivariada mostrou que não há uma pendente comum entre as variáveis de conformação e o CS (teste depois de 1000 permutações = 2.0963×10^{-8} ; $P = 0.110$).

4.4 Analisar a infecção natural de mosquitos por alguns arbovírus patogênicos ao homem

No total foram feitos 43 macerados de pools de mosquitos capturados na RPPNBR, Reserva Biológica de Poço das Antas (RPA), e na Área de Proteção Ambiental Sana (APA) durante o período de outubro de 2016 a abril de 2017 (Tabela 5).

Tabela 5. Espécies de Culicidae coletadas nas localidades de Área de Proteção Ambiental Sana (APA), Reserva Particular do Patrimônio Natural Bom Retiro (RBR), Reserva Biológica de Poço das Antas (RPA).

Num.	Espécie	Local	Data
1	<i>Sabethes purpureus</i>	APA	mar/17
2	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	APA	mar/17
3	<i>Sabethes intermedius</i>	RPA	mar/17
4	<i>Haemagogus janthinomys</i>	RBR	dez/17
5	<i>Haemagogus janthinomys</i>	RPA	mar/16
6	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	RBR	jul/16
7	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	RBR	dez/16
8	<i>Haemagogus janthinomys</i>	RBR	mar/16
9	<i>Sabethes intermedius</i>	RBR	out/16
10	<i>Sabethes cloropterus</i>	APA	mar/17
11	<i>Sabethes identicus</i>	RBR	set/16
12	<i>Aedes scapularis</i>	RBR	out/16
13	<i>Psorophora ferox</i>	RBR	nov/16
14	<i>Psorophora albipes</i>	RPA	nov/16
15	<i>Aedes serratus</i>	RPA	dez/16
16	<i>Aedes serratus</i>	RBR	mar/16
17	<i>Wyeomyia palmata</i>	RBR	out/16
18	<i>Runchomyia frontosus</i>	RBR	out/16
19	<i>Wyeomyia palmata</i>	RBR	out/16
20	<i>Wyeomyia edwardsi</i>	RBR	set/16
21	<i>Wyeomyia edwardsi</i>	RBR	set/16
22	<i>Wyeomyia edwardsi</i>	RBR	out/16
23	<i>Limatus pseudomethiscus</i>	RBR	set/16
24	<i>Limatus durhami</i>	RBR	out/16
25	<i>Runchomyia theobaldi</i>	RBR	set/16
26	<i>Runchomyia frontosus</i>	RBR	set/16
27	<i>Runchomyia frontosus</i>	RBR	out/16
28	<i>Runchomyia reversus</i>	RBR	out/16
29	<i>Aedes albopictus</i>	APA	mar/17
30	<i>Aedes albopictus</i>	RBR	out/16
31	<i>Mansonia titillans</i>	RPA	mar/17
32	<i>Wyeomyia theobaldi</i>	RBR	out/16
33	<i>Wyeomyia theobaldi</i>	RBR	set/16
34	<i>Wyeomyia quaslongirostri</i>	RBR	set/16
35	<i>Coquillettidia venezuelensis</i>	RPA	mar/17
36	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	RBR	abr/17
37	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	APA	jan/17
38	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	APA	jan/17

39	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	RPA	jan/17
40	<i>Haemagogus janthinomys</i>	RBR	abr/17
41	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	RBR	abr/17
42	<i>Haemagogus janthinomys</i>	RBR	abr/17
43	<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	APA	mai/17

Os mosquitos coletados foram agrupados em até 20 espécimes de culicídeos adultos previamente identificados e separados por espécie, sexo, data e local de captura e foram acondicionados em tubos eppendorf de 2mL para a maceração. Posteriormente foi realizado a extração de RNA e as amostras foram analisadas por RT-PCR. Foram feitos géis de agarose dos quais dois apresentaram resultados falso positivos, com bandas de fragmentos de RNA amplificadas na mesma altura do controle positivo. Foi feita a RT-PCR (14 amostras) no qual foi possível observar no gel a presença de bandas nas colunas 6 e 11 aparentemente positivas as quais pertenciam as amostras de *Hg. leucocelaenus* e *Li. durhami* respectivamente (Figura 20).

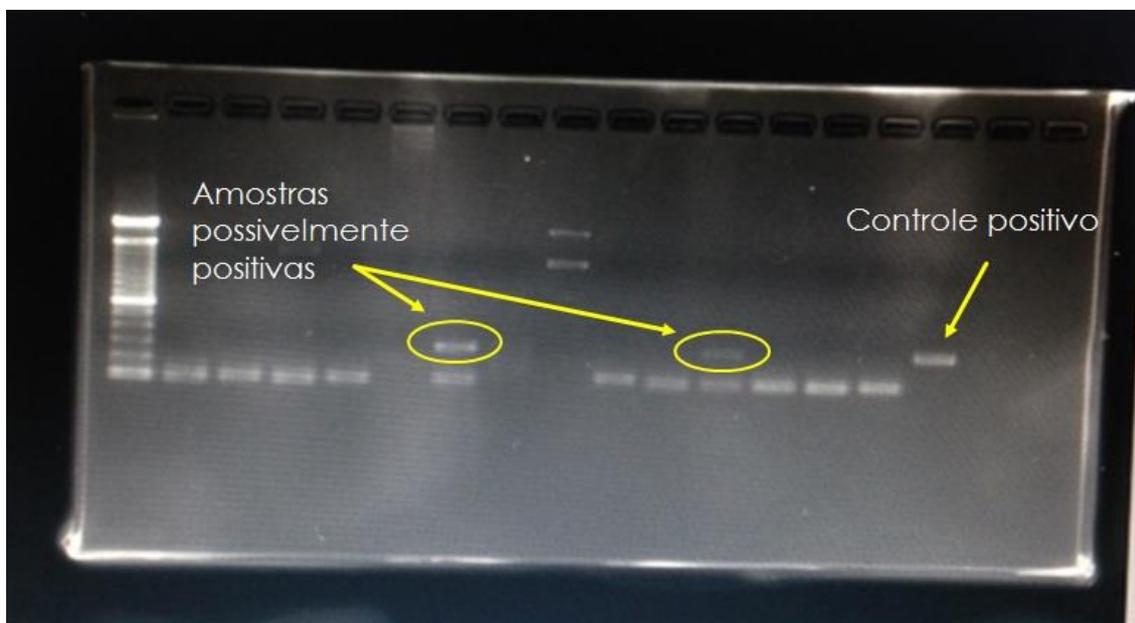


Figura 20. Gel de agarose com amostras de mosquitos coletados nas localidades RPPNBR, RPA e APA.

Do mesmo modo houve suspeita de amostras possivelmente positivas nas colunas 2, 3 e 5 as quais pertenciam as amostras de *Wyeomyia (Pho.) pilicauda* (RBR), *Wyeomyia* spp. (RBR) *Wyeomyia (Pho.) muhensi* (RBR) (Figura 21).

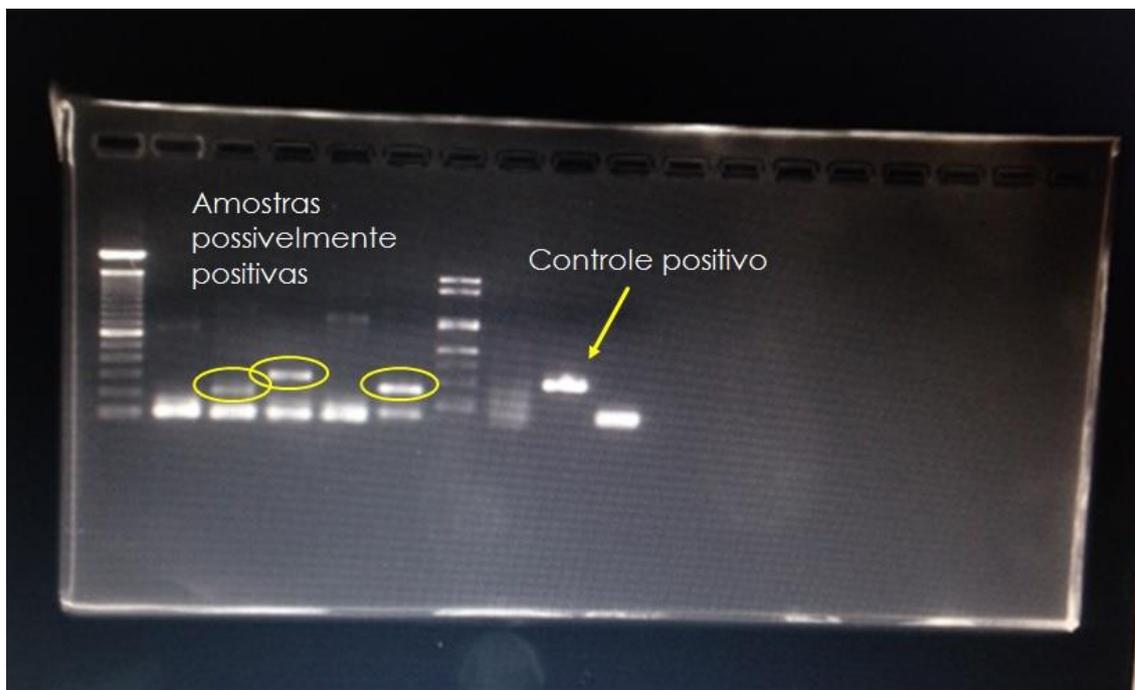


Figura 21. Gel de agarose com amostras de mosquitos coletados nas localidades RPPNBR, RPA e APA.

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos efeitos de múltiplas imersões de ovos de *Haemagogus leucocelaenus*, *Hg. janthinomys* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em condição experimental

O conhecimento sobre a taxa de eclosão e comportamento de oviposição de *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys* e *Aedes albopictus* aqui apresentados contribuiu com dados sobre a biologia das espécies, e conseqüentemente, subsídios que irão auxiliar na vigilância entomológica em áreas de floresta atlântica do Estado do Rio de Janeiro com casos confirmados de FAS.

Os Culicidae utilizam uma diversidade de criadouros durante seus estágios de imaturos, os quais podem ser divididos, basicamente, em dois grupos: os que se criam em ambientes aquáticos transitórios e os de ambientes aquáticos permanentes. Tais habitats influenciam e regulam sua biologia, bem como os tipos de interações ecológicas a que estão sujeitos (110). No estudo comparativo do efeito de múltiplas imersões de ovos de Aedini realizado por Alencar et al. (2014), foi observado que embora a maioria dos ovos de *Aedes* e *Ochlerotatus* tenham eclodido na primeira imersão, ovos de *Haemagogus* demonstraram uma resposta variada de período de incubação e eclosão (instalment hatching), necessitando de múltiplas imersões nas quais o número necessário para estimular a eclosão dos ovos aumentava para aqueles coletados próximo ao inverno em um período mais seco do ano (71).

Hovanitz (1946) observou eclosão de ovos de *Hg. janthinomys* logo após uma imersão, que Segundo Clements 1963, em alguns Aedini como *Haemagogus*, *Aedes* e *Psorophora* os ovos dão origem a larvas de primeiro instar assim que as condições ambientais tornam-se favoráveis (111,112). Estes resultados se assemelham aos encontrados na presente análise, no qual, a eclosão tanto em *Hg. leucocelaenus* quanto em *Hg. janthinomys* foi mais elevada durante as primeiras imersões.

Não foi possível observar um padrão definido de eclosão nos ovos dos Culicidae no presente estudo. Esses resultados corroboram com os achados por Alencar (2014), em um estudo comparativo sobre o efeito de múltiplas imersões em diferentes espécies de mosquitos, os ovos de *Haemagogus* demonstraram variações em seu padrão de eclotibilidade. *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* apresentaram o maior número de ovos eclodidos na 3ª e 22ª imersão, resultados que diferem de Alencar (2008), onde o efeito de imersões subsequentes após a 9ª imersão foi considerado insignificante. Este ocorrido pode ser explicado pelo fato de que a diapausa dos ovos é expressa em intensidades diferentes, não só de ovos expostos a condições distintas, mas também naqueles expostos as mesmas condições e postos pela mesma fêmea. A exposição a temperaturas mais quentes antes e durante a imersão favorecem a eclosão (113).

Ferreira et al. (2017) relatam que embora tenha ocorrido um abrupto declínio das eclosões nos ovos de *Hg. leucocelaenus* após a oitava imersão,

houve viabilidade até a 12^a imersão. Enquanto no presente estudo foi observado um padrão diferenciado de eclosões dos ovos de *Hg. leucocelaenus*, sendo constatado viabilidade dos ovos até a 21^a imersão (114).

Mullen & Durden (2009) relatam que a diapausa dos ovos é uma pausa longa e estável de incubação, mesmo quando as condições ambientais são favoráveis a este processo, enquanto que a quiescência é induzida pelas condições ambientais desfavoráveis e interrompe após a exposição a estímulos de incubação adequados, como inundações (69). No presente estudo, observou-se que estações climáticas verão e primavera foram mais favoráveis para coletas de ovos de Culicidae. Rouquayrol (1994) relatou que os artrópodes podem ser afetados por mudanças climáticas, como por exemplo temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade, o que, por conseguinte tem um efeito direto na emergência ou reemergência de doenças infecciosas transmitidas por estes vetores (61,115).

A maior densidade populacional em todos os períodos amostrais deste trabalho foi representada pela espécie *Hg. leucocelaenus*, resultados similares aos de Alencar (2016), no qual esta foi a espécie com maior frequência de captura representando 73% das espécies coletadas, além de ter a maior densidade populacional, também foi encontrada colonizando todas as alturas, sugerindo que esta seja uma espécie generalista (106). Contudo, já foi observado a maior abundância dessas espécies próxima a copa das árvores, o que aparenta ser devido a uma forte associação da espécie com primatas não humanos, fato que justifica a existência de um elo entre o foco natural de arbovírus e habitações humanas localizadas nos limites de dispersão da espécie (116) .

A carência de informações sobre a biologia de ovos das espécies deste trabalho demonstra a necessidade de estudos adicionais com essa abordagem. Apesar de ter evidências ativas para a transmissão do vírus causador da FAS na área onde foram coletados ovos, consideramos que seja dedicada especial atenção a vigilância para o surgimento de doenças febris nas comunidades localizadas no entorno.

5.2 Comunidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em armadilhas de oviposição introduzidas em Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil

Compreender a biodiversidade das espécies de mosquitos na Mata Atlântica é fundamental para a previsão de possíveis mudanças nessas populações. A fauna de mosquitos presente neste ambiente tem uma grande biodiversidade, incluindo potenciais vetores do vírus da FA e outros arbovírus. Mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* spp. são os principais vetores do vírus da FA de tipo selvagem nas áreas florestais das Américas e são de grande importância na transmissão deste arbovírus (28).

A maioria das espécies encontradas no presente estudo são conhecidas por serem vetores de vários agentes considerados patogênicos para os seres humanos. *Hg. janthinomys* se destaca como o principal vetor do vírus da FAS nas Américas, além de ser um vetor de outros arbovírus, como Mayaro e Ilheus (28). *Hg. leucocelaenus* é um vetor de vírus da FA de tipo selvagem no Brasil (59). *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são conhecidos por serem vetores do vírus da dengue (2); *Ae. aegypti* também é conhecido por sua capacidade de transmitir outras doenças virais, como FA, chikungunya (117) e zika (118). O gênero *Culex* pode transmitir patógenos responsáveis por causar encefalite, filariose linfática e doença do heartworm (119).

Alencar et al. (2015) realizaram um estudo na Reserva Ecológica de Guapiaçu, no Rio de Janeiro, Brasil, e descobriram que o maior número de espécimes foi observado em abril e dezembro (120). Da mesma forma, observou-se um pico no número de *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus* nos meses de abril e dezembro, respectivamente, no presente estudo. O maior número de indivíduos de *Hg. janthinomys* foi observado em fevereiro de 2016. Esse resultado corroborou com os obtidos por Pinto et al. (2009) em um estudo realizado na Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil, onde os autores relataram aumento da abundância de *Hg. janthinomys* no mesmo mês (121).

Neste estudo, observou-se que *Hg. leucocelaenus* mostrou uma correlação positiva com precipitação e ponto de orvalho máximo, indicando uma influência desses fatores abióticos em seu comportamento e subsequente

aumento em sua população. Resultados semelhantes foram relatados por Lira-Vieira (2013), que relatou uma correlação positiva e significativa entre precipitação e frequência mensal de *Hg. leucocelaenus* (122).

Alencar et al. (2010) relataram que as populações de *Hg. janthinomys* analisados foram significativamente influenciados pelas chuvas, levando a uma mudança no ritmo de atividade das espécies, aumentando assim a densidade populacional nos períodos chuvosos(52). O presente estudo também mostrou que *Hg. janthinomys* foram favorecidos pelas três variáveis climáticas; precipitação, ponto máximo de orvalho e direção.

Marteis (2016) descobriu que um alto índice de umidade relativa do ar garantiu a manutenção de locais de reprodução naturais nos ambientes selvagens e promoveu a formação de habitats larvais, influenciando a densidade populacional dos adultos (123). Essas observações corroboraram com os resultados do presente estudo, considerando que ambos os *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* foram positivamente correlacionadas com o ponto máximo de orvalho. WHO (2003) informou que o aumento da precipitação influenciou o comportamento de reprodução dos vetores, conseqüentemente favorecendo o crescimento populacional (124). A mesma tendência também foi observada em ambos *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* que tiveram uma correlação positiva com a precipitação no presente estudo.

Além disso, o fato de que muitas comunidades humanas em diferentes regiões brasileiras fazem trabalho extensivo e / ou atividades de lazer em regiões próximas a matas é digno de atenção especial. Essas atividades aumentam as chances de um encontro desses humanos com os vetores do vírus da FA. Além disso, tais atividades também podem aumentar os casos confirmados de FA em primatas não humanos na região em torno do RPPNBR, o que destaca a importância de realizar a vigilância entomológica nesta área.

5.3 Discriminação morfométrica entre populações de *Haemagogus capricornii* e *Hg. janthinomys* (Diptera: Culicidae) em áreas de floresta Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Este estudo baseado na morfometria geométrica de asas de *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* mostrou que tanto o tamanho centroide como as variáveis de conformação, podem ser utilizados para diferenciar as duas espécies, uma vez que as asas de *Hg. capricornii* demonstraram ser menores. As duas populações de *Hg. capricornii* apresentaram um tamanho centroide menor e não mostraram diferenças significativas entre elas. Porém, o tamanho centroide de todas as populações de *Hg. janthinomys* foi significativamente diferente entre elas. A conformação das asas também conseguiu separar significativamente as duas espécies. Foi possível separar as duas populações *Hg. capricornii* e as populações de *Hg. janthinomys* através da conformação, exceto as duas originárias da Bahia, que não apresentaram diferença estatística. Nossos resultados mostram que a morfometria geométrica auxilia à taxonomia, conseguindo separar *Hg. capricornii* de *Hg. janthinomys*.

A taxonomia é um ramo de importância irrefutável dentro das ciências biológicas, sendo que para um mapeamento eficaz da biodiversidade, na atualidade, deve-se concentrar em estudos com grupos limitados, para que pesquisas mais completas possam ser realizadas com efetividade. Pelos conhecimentos atualmente disponíveis, *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* poderiam constituir, um complexo de espécies cuja diferenciação morfológica é complexa. Para auxiliar na identificação de espécies crípticas e estudar o relacionamento entre elas vem sendo utilizado, além de caracteres morfológicos como morfologia clássica, microscopia eletrônica de varredura e morfometria, outras ferramentas como a biologia molecular e bioquímica (125).

A identificação e discriminação de populações de culicídeos também pode ser realizada por meio de diferentes metodologias moleculares, incluindo observação do fluxo gênico entre populações através de análise de isoenzimas (IEF), baseada na existência de enzimas com especificidade similar ou idêntica, porém diferentes estruturas moleculares (7,125), o estudo da variabilidade genética tendo como umas das técnicas a utilização de Marcadores do Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) (126), a utilização de

microssatélites que também podem servir como marcadores moleculares no estudo de Culicidae (127) dentre outros. Contudo, a maioria das técnicas moleculares requerem materiais frescos ou criopreservados (128), e ao se realizar as análises muitas vezes o material é modificado ou destruído durante esse processo, tendo como exemplo a técnica dos microssatélites e o fato de que estes são geralmente encontrados em regiões não codificantes onde a taxa de substituição de nucleotídeos é maior que nas regiões de codificação, esta se torna uma enorme desvantagem desta técnica, uma vez que eles precisam ser isolados de novo da maioria das espécies que estão sendo examinadas pela primeira vez (129). Em contrapartida a análise de morfometria geométrica é uma ferramenta poderosa, de baixo custo que aborda questões de taxonomia, ecologia e morfologia, particularmente em insetos (74).

Nossos resultados mostraram que é possível realizar a diferenciação de ambas espécies pelo tamanho do centroide. Foi visto também que a conformação, que é pouco afetada pelos fatores ambientais, pode ser uma forma de diferenciar entre as espécies e entre algumas populações. *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* não mostraram uma tendência alométrica comum. A análise de correlação entre o tamanho centroidal e a conformação para estas duas espécies, não estaria interferindo com a qualidade dos “reclassification scores”.

Com base no estudo realizado foi observado que é possível diferenciar fêmeas de *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys* através da utilização de morfometria geométrica. Devido ao poder desta técnica e à importância da taxonomia, a morfometria geométrica pode contribuir para melhorar estratégias entomológicas e planificar atividades de controle vetorial. Uma correta identificação das espécies constitui a base fundamental para construir conhecimentos em ecologia e outras áreas da biologia. As falhas na diferenciação e identificação de espécies podem levar a difundir e amplificar erros conceituais e metodológicos em outras áreas que podem ter implicações não só no nosso conhecimento sobre a natureza, mas na estrutura e no funcionamento do ecossistema, nas decisões de manejo e em programas de controle vetorial focalizados para a saúde humana (130).

5.4 Análise da infecção natural de mosquitos por alguns arbovírus patogênicos ao homem

A febre amarela representa uma doença infecciosa responsável por causar uma proporção significativa de casos e óbitos, sendo uma circulação viral cada vez maior observada rumo a regiões leste e sul do Brasil. O vírus pode ser identificado em áreas que durante décadas haviam permanecido em silêncio (131). A migração viral rumo ao Leste do país é preocupante uma vez que esta região comporta as maiores áreas metropolitanas do país, onde a densidade demográfica é a mais alta, e a maioria da população brasileira vive.

Embora os resultados constatados no presente estudo sejam negativos devendo-se majoritariamente ao baixo número de amostras testadas, a presença de 29 casos confirmados de FAS no estado do Rio de Janeiro dos quais 09 tiveram como Local Provável de Infecção (LPI) o município de Casimiro de Abreu e 02 o município de Silva Jardim, localizados nas proximidades da RPPNBR tornam evidente a presença da circulação deste vírus nestas regiões. Estes ciclos ocorrem em regiões de matas e são mantidos por mosquitos silvestres do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, ambos analisados neste estudo, e hospedeiros vertebrados que ali vivem.

6 CONCLUSÃO

A eclosão de ovos tanto em *Hg. leucocelaenus* quanto em *Hg. janthinomys* foi mais elevada durante as primeiras imersões com picos na 3ª e 22ª. A viabilidade de ovos de *Hg. leucocelaenus* pode ser observada até a 21ª imersão enquanto de *Hg. janthinomys* foi vista até a 37ª demonstrando que alguns ovos possuíam impedimento ou repressão de sua eclosão mesmo em condições favoráveis, a isso dá-se o nome de diapausa. Estes achados diferem de estudos prévios como por exemplo os de Hovanitz (1946) e Clements (1963), que observaram eclosão de ovos de *Haemagogus* assim que as condições ambientais tornavam-se favoráveis, caracterizando uma quiescência.

A carência de informação a respeito da biologia de ovos das espécies avaliadas nesse estudo demonstra a necessidade da realização de mais estudos com esta abordagem. Além da evidência da transmissão viral da FAS na área em que os ovos foram coletados, uma atenção especial deve ser dada no

monitoramento da incidência de casos de enfermidades febris nas comunidades localizadas em torno da RPPNBR. Os resultados encontrados no presente trabalho contribuem com dados inéditos que promovem novos esclarecimentos a respeito de ovos de diferentes espécies do gênero *Haemagogus* auxiliando assim na melhor compreensão da biologia destes culicídeos.

O presente estudo também mostrou que *Hg. janthinomys* foi favorecido por três variáveis climáticas, são elas: precipitação, ponto máximo de orvalho e direção, enquanto *Hg. leucocelaenus* mostrou uma correlação positiva apenas com precipitação e ponto máximo de orvalho, demonstrando uma influência desses fatores abióticos no comportamento dessas espécies e subsequente aumento em sua população. Observou-se um pico no número de *Ae. albopictus* em abril e *Hg. leucocelaenus* em dezembro enquanto o maior número de indivíduos de *Hg. janthinomys* foi observado no mês de fevereiro.

Foi possível demonstrar a utilização de morfometria geométrica na separação de fêmeas de *Hg. capricornii* e *Hg. janthinomys*. Uma correta identificação das espécies constitui a base fundamental para construir conhecimentos em ecologia e outras áreas da biologia. As falhas na diferenciação e identificação de espécies podem levar a difundir e amplificar erros conceituais e metodológicos em outras áreas que podem ter implicações não só no nosso conhecimento sobre a natureza, mas na estrutura e no funcionamento do ecossistema, nas decisões de manejo e em programas de controle vetorial focalizados para a saúde humana.

Com a evidência da transmissão ativa do vírus da FAS próxima a reserva natural estudada nesse trabalho e a abundância de mosquitos vetores para esta doença no Brasil, a compreensão da biodiversidade e distribuição destas espécies de mosquitos na Mata Atlântica é fundamental para a previsão de possíveis mudanças nessas populações.

Referências Bibliográficas

1. WHO. *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores* [Internet]. 719^o ed. Genebra: World Health Organization; 1985 [citado 14 de dezembro de 2017]. 126 p. Disponível em : <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=3&codcol=10&codcch=719>
2. CDC. Symptoms and Treatment | Yellow Fever | CDC [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/symptoms/index.html>
3. Blair CD, Adelman ZN, Olson KE. Molecular Strategies for Interrupting Arthropod-Borne Virus Transmission by Mosquitoes. *Clin Microbiol Rev.* outubro de 2000;13(4):651–61.
4. Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* dezembro de 2004;10(12):1040–55.
5. Mercer DR, Castillo-Pizango MJ. Changes in relative species compositions of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and an outbreak of Oropouche virus in Iquitos, Peru. *J Med Entomol.* julho de 2005;42(4):554–8.
6. Amaro F, Ciufolini MG, Venturi G, Fiorentini C, Alves MJ. Phleboviruses laboratory diagnosis (Toscana virus). *Acta Med Port.* agosto de 2007;20(4):341–6.
7. Consoli RAGB, Oliveira RL de. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.* SciELO - Editora FIOCRUZ; 1994. 224 p.
8. Kuno G, Chang G-JJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev.* outubro de 2005;18(4):608–37.
9. Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* março de 2011;6(3):265–77.
10. Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.* outubro de 2004;2(10):789–801.
11. Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(3):442–50.
12. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* fevereiro de 2010;85(2):328–45.

13. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect.* março de 2015;4(3):e18.
14. Lima-Camara TN, Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saúde Pública* [Internet]. 2016 [citado 14 de dezembro de 2017];50. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-89102016000100602&lng=en&nrm=iso&tlng=en
15. CDC. Arbovirus Catalog - CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD) [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/arboicat/>
16. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke G-J, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* novembro de 2012;55(3):191–203.
17. Benkó M. Adenoviruses: Pathogenesis. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHV, organizadores. *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2008. p. 24–9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744104006816>
18. Liu D. *Molecular Detection of Human Viral Pathogens.* CRC Press; 2016. 1152 p.
19. CDC. Flaviviridae | Viral Hemorrhagic Fevers (VHFs) | CDC [Internet]. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vhf/virus-families/flaviviridae.html>
20. CDC. Yellow Fever - Chapter 3 - 2018 Yellow Book | Travelers' Health | CDC [Internet]. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>
21. da Costa Vasconcelos PF. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(2):275–293.
22. Colfer CJP, Sheil D, Kishi M. *Forests and Human Health: Assessing the Evidence.* CIFOR; 2006. 121 p.
23. SUS M. Ministério da Saúde - Portal da Saúde - O Ministério [Internet]. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/institucional/o-ministerio>
24. Vasconcelos PF, Sperb AF, Monteiro HA, Torres MA, Sousa MR, 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.* fevereiro de 2003;97(1):60–2.

25. Monath TP. Yellow fever: Victor, Victoria? Conqueror, conquest? Epidemics and research in the last forty years and prospects for the future. *Am J Trop Med Hyg.* julho de 1991;45(1):1–43.
26. Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ. *Manson's Tropical Diseases E-Book.* Elsevier Health Sciences; 2013. 1664 p.
27. Peters W. *Color Atlas of Tropical Medicine and Parasitology Tropical Medicine and Parasitology.* Year Book Medical, Chicago; 1977. book.
28. Vasconcelos PF da C. Yellow fever. *Rev Soc Bras Med Trop.* abril de 2003;36(2):275–93.
29. Holmes EC. Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. *Br Med Bull.* 1998;54(3):533–43.
30. Teixeira CF. Epidemiology and health planning. *Ciênc Amp Saúde Coletiva.* 1999;4(2):287–303.
31. De Paula SO, Fonseca BAL da. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* dezembro de 2004;8(6):390–8.
32. Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, et al. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis.* agosto de 2011;11(8):622–32.
33. Vasconcelos P. Nota Informativa SPSP: Febre Amarela [Internet]. SPSP. 2017 [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://www.spsp.org.br/2017/03/13/nota-informativa-spsp-febre-amarela/>
34. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* agosto de 2001;1(1):11–20.
35. Costa ZGA. Estudo das características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, nas áreas fora da Amazônia Legal, no período de 1999 a 2003. Study of the epidemiologic characteristic of the yellow fever in Brazil [Internet]. 2005 [citado 14 de dezembro de 2017]; Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13327>
36. MS M da S. Febre amarela - Ministério da Saúde [Internet]. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/viajantes.php>
37. Sáfadi MAP. Sociedade de Pediatria de São Paulo Nota Informativa: Febre amarela.
38. WHO | New yellow fever vaccination requirements for travellers [Internet]. WHO. [citado 23 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/ith/updates/20160727/en/>

39. SUS S. Guia Orientação Treinamento de técnicos [Internet]. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/capacitacao/guia-orientacao-treinamento-de-tecnicos.pdf>
40. Forattini OP. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2. EdUSP; 1996. 856 p.
41. Redi F. Esperienze intorno alla generazione degli insetti. [Internet]. Rome; 1885. 118 p. Disponível em: <http://archive.org/details/esperienzeintorn00redi>
42. Réaumur RAF (1683-1757 ; seigneur de). Mémoires pour servir à l'histoire des insectes. Tome 5 / par M. de Réaumur,... [Internet]. Paris: Impr. royale; 1734 [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k99227k>
43. Forattini OP. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2. EdUSP; 1996. 856 p.
44. Coura. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan; 2005. 2025 p.
45. Gillett JD. Variation in the Hatching-response of *Aedes* Eggs (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res. agosto de 1955;46(2):241–54.
46. Finlay CJ. El mosquito hipotéticamente considerado como agente de transmisión de la fiebre amarilla. Rev Cuba Salud Pública. 2011;37:555–62.
47. Gurgel CBFM, Carneiro FC, Coutinho EC. Ciência no século XIX: a Contribuição brasileira para a descoberta do agente etiológico da filariose linfática. Rev Patol Trop. 31 de janeiro de 2011;39(4):251–60.
48. To KK, Yuen K-Y. In memory of Patrick Manson, founding father of tropical medicine and the discovery of vector-borne infections. Emerg Microbes Infect. outubro de 2012;1(10):e31.
49. Clements AN. The Biology of Mosquitoes, Volume 3 Transmission of Viruses and Interactions with Bacteria. CABI; 2012. 589 p.
50. Karabatsos edited by N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates [Internet]. 3rd ed. San Antonio, Texas: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses; 1985. Disponível em: https://catalyst.library.jhu.edu/catalog/bib_66192
51. Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA, Cespedes M, Vargas J, Gianella A, et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. PLoS Negl Trop Dis. 10 de agosto de 2010;4(8):e787.

52. Marcondes CB, Alencar J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. Rev Biomed. 2010;21:221–238.
53. Forattini OP. Entomologia médica: Culicini: *Haemagogus*, *Mansonia*, *Culiseta*, *Sabethini*. *Toxorhynchitini*. Arboviroses, Filariose bancroftiana. Genética. Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Depto. de Parasitologia; 1965. 422 p.
54. Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa ES, Travassos da Rosa JFS, Dégallier N, Vasconcelos PFC, Rodrigues SG. Os arbovirus no Brasil: generalidades, metodos e tecnicas de estudo [Internet]. Belem: Instituto Evandro Chagas; 1994 p. 39 multigr. (Documento Tecnico). Disponível em: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010006994>
55. Liria J, Navarro J-C. Modelo de nicho ecológico en *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae), vectores del virus de la fiebre amarilla. Rev Bioméd. 2010;21(3):149–161.
56. Medeiros AS de. Dípteros (Culicidae) transmissores de arbovírus em área de proteção ambiental urbana (Parque das Dunas Natal-RN,) 2004-2006. 26 de agosto de 2009 [citado 14 de dezembro de 2017]; Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/13270>
57. Waddell MB. Comparative efficacy of certain South American *Aedes* and *Haemagogus* mosquitoes as laboratory vectors of yellow fever. Am J Trop Med Hyg. julho de 1949;29(4):567–75.
58. Shannon RC, Whitman L, Franca M. Yellow Fever Virus in Jungle Mosquitoes. Science. 29 de julho de 1938;88(2274):110–1.
59. Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. Contrib Am Entomol Inst. 1973;10(2):ii 1–174.
60. Ludueña Almeida F, Almirón WR, Zapata A, Gorla D. Culicidae (Diptera) del arco sur de la Laguna de Mar Chiquita (Córdoba, Argentina) y su importancia sanitaria. Rev Soc Entomológica Argent. dezembro de 2004;63(3–4):25–8.
61. Anyamba A, Small JL, Britch SC, Tucker CJ, Pak EW, Reynolds CA, et al. Recent weather extremes and impacts on agricultural production and vector-borne disease outbreak patterns. PloS One. 2014;9(3):e92538.
62. Guimarães AÉ, Arlé M, Machado RNM, Guimarães AÉ, Arlé M, Machado RNM. Mosquitoes in Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro State, Brazil: IV Feeding preference. Mem Inst Oswaldo Cruz. junho de 1987;82(2):277–85.
63. Alencar J, Lorosa ES, Dégallier N, Serra-Freire NM, Pacheco JB, Guimarães AÉ. Feeding Patterns of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) in Different Regions of Brazil. J Med Entomol. 1 de novembro de 2005;42(6):981–5.

64. Degallier N, Monteiro HADO, Castro FC, Silva OVD, Filho GCS, Elguero E. An indirect estimation of the developmental time of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), the main vector of yellow fever in South America. *Stud Neotropical Fauna Environ.* 1 de agosto de 2006;41(2):117–22.
65. Alencar J, de Almeida HM, Marcondes CB, Guimarães AÉ. Effect of Multiple Immersions on Eggs and Development Of Immature Forms of *Haemagogus janthinomys* From South-Eastern Brazil (Diptera: Culicidae). *Entomol News.* 1 de maio de 2008;119(3):239–44.
66. Galindo P, Carpenter SJ, Trapido H. Ecological Observations on Forest Mosquitoes of an Endemic Yellow Fever Area in Panama¹. *Am J Trop Med Hyg.* 1 de janeiro de 1951;s1-31(1):98–137.
67. Galindo P, Carpenter SJ, Trapido H. A Contribution to the Ecology and Biology of Tree Hole Breeding Mosquitoes of Panama. *Ann Entomol Soc Am.* 1 de maio de 1955;48(3):158–64.
68. Vinogradova EB. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. In: *Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use.* Springer; 2007. p. 83–113.
69. Mullen GR, Durden LA. *Medical and Veterinary Entomology.* Academic Press; 2009. 646 p.
70. Clements AN. *The Physiology of Mosquitoes: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology.* Elsevier; 2013. 420 p.
71. Alencar J, Gleiser RM, Morone F, Mello CF de, Silva J dos S, Serra-Freire NM, et al. A comparative study of the effect of multiple immersions on Aedini (Diptera: Culicidae) mosquito eggs with emphasis on sylvan vectors of yellow fever virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* fevereiro de 2014;109(1):114–7.
72. Jaramillo O N. *Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo.* 2011. 69 p.
73. Dujardin J-P. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* dezembro de 2008;8(6):875–90.
74. Adams D, Rohlf FJ, Slice D. A Field Comes of Age: Geometric Morphometrics in the 21st Century. *Hystrix.* 1 de janeiro de 2013;7–14.
75. Vidal PO, Peruzin MC, Suesdek L. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). *Rev Bras Entomol.* março de 2011;55(1):134–7.
76. Ruangsittichai J, Apiwathnasorn C, Dujardin J-P. Interspecific and sexual shape variation in the filariasis vectors *Mansonia dives* and *Ma. bonnea*. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* dezembro de 2011;11(8):2089–94.

77. Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors*. 13 de novembro de 2012;5:257.
78. Vicente JL, Sousa CA, Alten B, Caglar SS, Falcutá E, Latorre JM, et al. Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. *Malar J*. 11 de janeiro de 2011;10:5.
79. Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MAM. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. agosto de 2012;12(6):1246–52.
80. Demirci B, Lee Y, Lanzaro GC, Alten B. Altitudinal genetic and morphometric variation among populations of *Culex theileri* Theobald (Diptera: Culicidae) from northeastern Turkey. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol*. junho de 2012;37(1):197–209.
81. Prudhomme J, Gunay F, Rahola N, Ouanaimi F, Guernaoui S, Boumezzough A, et al. Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Phlebotomidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol*. junho de 2012;37(1):137–47.
82. Kaba D, Ravel S, Acapovi-Yao G, Solano P, Allou K, Bosson-Vanga H, et al. Phenetic and genetic structure of tsetse fly populations (*Glossina palpalis palpalis*) in southern Ivory Coast. *Parasit Vectors*. 30 de julho de 2012;5:153.
83. Tauil PL. Controle de doenças transmitidas por vetores no sistema único de saúde. *Inf Epidemiológico SUS*. 2002;11(2):59–60.
84. Wright JW. The WHO programme for the evaluation and testing of new insecticides. *Bull World Health Organ*. 1971;44(1-2-3):9–22.
85. Control WECOV and. Resistance of Vectors and Reservoirs of Disease to Pesticides: Tenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organization; 1986. 92 p.
86. Mariconi FAM. Inseticidas e seu emprégo no combate as pragas: com uma introdução sôbre o estudo dos insetos. *Gazeta Maçonica*; 1971. 305 p.
87. Aldridge WN. Insecticides, past, present and future: practice and the understanding of mechanisms. *Ann Occup Hyg*. 1979;22(4):407–9.
88. Logan TM, Linthicum KJ, Wagateh JN, Thande PC, Kamau CW, Roberts CR. Pretreatment of floodwater *Aedes* habitats (dambos) in Kenya with a sustained-release formulation of methoprene. *J Am Mosq Control Assoc*. 1990;6:736–738.
89. Jenkins DW. Pathogens, Parasites And Predators Of Medically Important Arthropods. Annotated List And Bibliography. *Bull World Health Organ*. 1964;30:SUPPL:1-150.

90. Chapman HC. Biological control of mosquito larvae. *Annu Rev Entomol.* 1974;19:33–59.
91. Floore TG. Mosquito larval control practices: past and present. *J Am Mosq Control Assoc.* setembro de 2006;22(3):527–33.
92. Ghosh SK, Dash AP. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* novembro de 2007;101(11):1063–4.
93. Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23(2 Suppl):133–63.
94. Lima JBP, Melo NV de, Valle D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* junho de 2005;47(3):125–30.
95. Waldman EA. Usos da vigilância e da monitorização em saúde pública. *Inf Epidemiológico Sus.* setembro de 1998;7(3):7–26.
96. Schobbenhaus C, Campos D de A, Derze GR, Asmus HE, Santos JOS, Santos EJ dos, et al. Mapa geológico do Brasil e da área oceânica adjacente incluindo depósitos minerais. 1995 [citado 15 de dezembro de 2017]; Disponível em: <http://rigeo.cprm.gov.br/jspui/handle/doc/8516>
97. IBDF F. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal Apoio Financeiro Polonoroeste [Internet]. [citado 15 de dezembro de 2017]. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-planos-de-manejo/rebio_guapore_pm.pdf
98. Saporta LA da C, Young F, Eduardo C. Créditos de carbono e o reflorestamento do entorno da REBIO de Poços das Antas, Brasil. *Revibec Rev Red Iberoam Econ Ecológica.* 2009;12:017–32.
99. SANA - o Portal do Paraíso das águas na Serra Macaense [Internet]. [citado 27 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.portaldosana.com.br/>
100. Prefeitura Municipal de Macaé [Internet]. [citado 27 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.macaee.rj.gov.br/sema/conteudo/titulo/sanapa-institucional>
101. Prefeitura Municipal de Macaé [Internet]. [citado 27 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.macaee.rj.gov.br/sema/conteudo/titulo/apa-do-sana>
102. Prefeitura Municipal de Macaé [Internet]. [citado 27 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.macaee.rj.gov.br/sema/leitura/noticia/reas-de-protecao-ambiental-abrangem-tres-locais-em-macaee>
103. Jeronymo CAL. Identificação de Áreas Prioritárias, com uso de Geoprocessamento, para Conservação e Recuperação de Área de

- Preservação Ambiental do Sana, Macaé-RJ. [Campos dos Goytacazes/RJ]: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia; 2012.
104. CPTEC I. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - CPTEC/INPE [Internet]. [citado 15 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://www.cptec.inpe.br/>
 105. Reinert FJ. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). Eur Mosq Bull J Eur Mosq Control Assoc ISSN. 1 de janeiro de 2009;27:68–76.
 106. Alencar J, de Mello CF, Gil-Santana HR, Guimarães AÉ, de Almeida SAS, 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 J Soc Vector Ecol. junho de 2016;41(1):18–26.
 107. Bookstein FL. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press; 1997. 459 p.
 108. Rohlf FJ. Software by F. James Rohlf [Internet]. [citado 15 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>
 109. The CLIC Package [Internet]. MoMe-CLIC. [citado 15 de dezembro de 2017]. Disponível em: <http://mome-clic.com/>
 110. Juliano SA. Species interactions among larval mosquitoes: context dependence across habitat gradients. Annu Rev Entomol. 2009;54:37–56.
 111. Hovanitz W. Comparisons of Mating Behavior, Growth Rate, and Factors Influencing Egg-hatching in South American *Haemagogus* Mosquitoes. Physiol Zool. 1946;19(1):35–53.
 112. Fedorov MI. The Physiology of Mosquitoes. 1963. book.
 113. Campos RE, Sy VE. Variation in the hatching response of *Ochlerotatus albifasciatus* egg batches (Diptera: Culicidae) in temperate Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. fevereiro de 2006;101(1):47–53.
 114. Tátilla-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. 7 de agosto de 2017;59:e60.
 115. Ayla. distribuição das doenças e dos agravos à saúde coletiva [Internet]. Passei Direto. [citado 14 de dezembro de 2017]. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/3618942/distribuicao-das-doencas-e-dos-agravos-a-saude-coletiva>
 116. Gomes A de C, Torres MAN, Paula MB de, Fernandes A, Marassá AM, Consales CA, et al. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae)

- em áreas epizoóticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol E Serviços Saúde*. junho de 2010;19(2):101–13.
117. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. dezembro de 2013;108(Suppl 1):11–7.
 118. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. maio de 1969;18(3):411–5.
 119. Chapman, Service MW, Hall. *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods*. Chapman & Hall; 1993. 1006 p.
 120. Alencar J, de Mello CF, Guimarães AE, Gil-Santana HR, Silva JDS, Santos-Mallet JR, et al. Culicidae community composition and temporal dynamics in Guapiaçu Ecological Reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122268.
 121. Pinto CS, Confalonieri UE, Mascarenhas BM. Ecology of *Haemagogus sp.* and *Sabethes sp.* (Diptera: Culicidae) in relation to the microclimates of the Caxiuanã National Forest, Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(4):592–598.
 122. Lira-Vieira AR, Gurgel-Goncalves 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*. outubro de 2013;46(5):566–74.
 123. Marteis L, Delsio N, Sallum M, Medeiros-Sousa A, Oliveira T, Santos R. Mosquitoes of the Caatinga: 1. Adults stage survey and the emerge of seven news species endemic of a dry tropical forest in Brazil. Vol. 166. 2016.
 124. WHO. *Climate Change and Human Health: Risks and Responses*. World Health Organization; 2003. 340 p.
 125. Carvalho-Pinto CJ de, Lourenço-de-Oliveira R. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. agosto de 2004;99(5):471–5.
 126. Hiragi C, Simões K, Martins E, Queiroz P, Lima L, Monnerat R. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. *Neotrop Entomol*. agosto de 2009;38(4):542–7.
 127. Müller GA, Marcondes CB, Navarro-Silva MA. Aplicação de marcadores microsatélites para o estudo de Culicidae (Diptera): revisão com especial referência a *Haemagogus*. *Bol Malariol Salud Ambient*. 2010;175–86.
 128. Sheldon FH. *The Value of Vertebrate Tissue Collections in Applied and Basic Science*. ASC. 1997;151–62.

129. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol.* janeiro de 2002;11(1):1–16.
130. Bortolus A. Error Cascades in the Biological Sciences: The Unwanted Consequences of Using Bad Taxonomy in Ecology. *AMBIO J Hum Environ.* 1 de março de 2008;37(2):114–8.
131. Rossetto EV, Angerami RN, Luna EJ de A. What to expect from the 2017 yellow fever outbreak in Brazil? *Rev Inst Med Trop São Paulo [Internet].* 2017 [citado 15 de dezembro de 2017]; 59(0). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000603&lng=en&tIng=en

**Evaluation of multiple immersion effects on eggs from
 Haemagogus leucocelaenus, Hg. janthinomys, and Aedes
 albopictus (Diptera: Culicidae) under experimental
 conditions**

Journal:	<i>Journal of Medical Entomology</i>
Manuscript ID	JME-2017-0251.R2
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	06-Nov-2017
Complete List of Authors:	Silva, Shayenne ; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, LABORATÓRIO DE DIPTERA Mello, Cecilia; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Diptera Oliveira, Alexandre; Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, , Laboratório de Vigilância Entomológica de Diptera e Hemiptera Maia, Daniele; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, LABORATÓRIO DE DIPTERA ALENCAR, JERONIMO; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, LABORATÓRIO DE DIPTERA
Please choose a section from the list:	Behavior, Chemical Ecology
Field Keywords:	Behavior, Biodiversity, Biology, Ecology & Behavior
Organism Keywords:	Culicidae, Aedes, Mosquitoes

1 Running title: Multiple immersion effects in mosquito eggs

2 Research Article

3

4 Journal of Medical Entomology

5

6

J. Alencar
Avenida Brasil, 4365 Rio de Janeiro

7

Brazil 21040-360

8

Phone: (55-21) 2562-1238

9

Fax: (55-21) 2562 1284

10

E-mail: jalencar@ioc.fiocruz.br

11

12

13 **Evaluation of multiple immersion effects on eggs from *Haemagogus leucocelaenus*,**
14 ***Hg. janthinomys*, and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) under experimental**
15 **conditions**

16

17 Shayenne Olsson Freitas Silva^{1,2}, Cecilia Ferreira de Mello^{1,3}, Alexandre A. Oliveira^{1,4},

18 Daniele de Aguiar Maia^{1,3}, Jeronimo Alencar¹

19

20

21 1- Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil. 2-
22 Postgraduate Program in Tropical medicine, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Rio de
23 Janeiro, Brazil. 3- Postgraduate Program in Animal Biology, Institute of Biology,
24 Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil. 4- Interdisciplinary Entomological
25 Surveillance Laboratory in Diptera and Hemiptera, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz),
26 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

27

28

29

30 **ABSTRACT** Studies on the bioecology of *Haemagogus leucocelaenus*, *Hg.*
31 *janthinomys*, and *Aedes albopictus* mosquitos are extremely important from an
32 epidemiologic point of view, once they are known to be vectors of many important
33 pathogens and, therefore, act as the main factor responsible for the maintenance of
34 several zoonoses natural cycles. The present work aimed to elucidate the egg-hatching
35 rate of these species using the immersion method. Ovitrap were used to collect
36 mosquito eggs from an Atlantic Forest fragment, in the State of Rio de Janeiro, Brazil,
37 from November 2015 to November 2016. After collection, the eggs were immersed 40
38 times in order to assess their hatching rate and evaluate the number of immersions with
39 the highest hatchability during the study period. The Mann-Whitney test (significance
40 level) revealed no significant difference between *Ae. albopictus* and *Hg. leucocelaenus*
41 ($p = 0.21$). However, a significant difference was observed when comparing *Ae.*
42 *albopictus* vs. *Hg. janthinomys* ($p < 0.01$) and *Hg. leucocelaenus* vs. *Hg. janthinomys* (p
43 < 0.01). Higher hatchability of *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* kept in
44 acclimatized chamber, was observed upon the 3rd and 22nd immersion. The assessment
45 of egg hatchability of *Hg. janthinomys* in subsequent immersions revealed that they
46 remained viable until the 37th immersion. The hatching rate of *Hg. leucocelaenus*, *Hg.*
47 *janthinomys*, and *Ae. albopictus* reported in this study helps to elucidate the biology of
48 the species and aids the entomological surveillance of areas in the Atlantic Forest of the
49 State of Rio de Janeiro with confirmed cases of sylvatic yellow fever.

50

51 **KEYWORDS** Culicidae; *Haemagogus leucocelaenus*; *Hg. janthinomys*; *Aedes*
52 *albopictus*; Eggs; Hatching rate

53

54

INTRODUCTION

55 The highly diverse genus *Haemagogus* Williston 1896 currently comprises 28
56 species. From an epidemiologic point of view, they are extremely important as vectors
57 of the yellow fever virus. Thus, they are the main factors responsible for the
58 maintenance of the natural cycle of this zoonosis (Marcondes and Alencar 2010). The
59 species of this genus prefer to lay eggs into hollow trees, although they can be found
60 colonizing bamboo internodes, fruit peels, and puddles formed in stones and tires
61 (Arnell 1973, Chadee 1983).

62 Among the species that have been identified as potential transmitters of the
63 sylvatic yellow fever (SYF) virus, *Hg. janthinomys* Dyar 1921 has been highlighted as
64 its main vector on the American continent, in addition to other viruses such as Mayaro
65 (Vasconcelos et al. 1998), Ilhéus (de Rodaniche and Galindo 1961), Tacaiuma
66 (Contigiani and Diaz, 2009), and Jurona and Mucambo (Hervé et al 1986); its
67 geographic distribution corresponds to endemic areas of this disease (Vasconcelos
68 2003). This species was incriminated as a vector for Mayaro virus in Belterra, Para State
69 (Hoch 1981). Azevedo et al. (2009) reported that this arbovirus occurs in epidemic
70 outbreaks in many areas of Amazonia, causing symptoms similar to those triggered by
71 the dengue fever.

72 *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon 1924), the most common species
73 in Brazil, is considered the primary vector of SYF in the southeastern region of the
74 country. Its geographic distribution extends from Trinidad to southern Brazil and
75 northern Argentina (Arnell 1973). This species was found naturally infected with some
76 arboviruses, including SYF virus, and according to laboratory studies (Waddell 1949),
77 it is a more efficient vector of this virus compared to *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762).

78 *Aedes albopictus* (Skuse 1894) was recently found infected with dengue fever
79 virus in Costa Rica (Calderón-Arguedas et al. 2015). Besides its importance as potential
80 vector for different arboviruses, this species has a higher capacity of transition in
81 different environments, acting as a link between forest areas where yellow fever
82 circulates and urban agglomerations (Gratz 2004).

83 Nowadays, there is a continuous outbreak of SYF in Brazil. The outbreak
84 probably began by the end of 2016, when the first case was reported in the state of
85 Minas Gerais and rapidly spread to the states of Espírito Santo, São Paulo, and Rio de
86 Janeiro. In agreement with the report of the World Health Organization, as of April
87 2017, the transmission of the yellow fever virus (epizooties and human cases) continues
88 to expand to the Atlantic coast of Brazil in areas considered without risk for yellow
89 fever transmission (WHO 2017).

90 The present study aimed to evaluate the effects of multiple immersions of *Hg.*
91 *leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, and *Ae. albopictus* eggs and to assess the highest
92 hatchability rate during the study period.

93

94

METHODS

95 The eggs of *Haemagogus leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, and *Aedes albopictus*
96 were collected using ovitraps, from November 2015 to November 2016. The present
97 study was carried out in the Bom Retiro Private Reserve of Natural Heritage (Reserva
98 Particular do Patrimônio Natural Bom Retiro, RPPNBR), located in southeastern Brazil,
99 approximately 140 km from the city of Rio de Janeiro. The site is mainly covered by a
100 typical vegetation of the Atlantic Forest, the vegetation is constituted of dense
101 ombrophilous sub-mountain forests, with median and advanced stages of regeneration

102 that produce a tropical wet climate. This biome is influenced, for most of the year, by
103 the Atlantic tropical mass. The dominance of this air mass provides stable weather to
104 the region, although polar fronts and tropical squall lines occurring throughout the year
105 bring atmospheric instability. The region of RPPN Fazenda Bom Retiro, located in the
106 hydrographic basin of São João River, is situated in the intertropical zone (at low
107 latitudes) and highly influenced by the Atlantic Ocean. Thus, its climate is
108 predominantly of humid tropical type (Takizawa 1995). The average temperature is
109 26.8°C, with a relative humidity of 56% and 0.2 mm precipitation (INMET, 2017).
110 Samples were collected in the RPPNBR (22°27'14.1"S; 42°17'34.9"W). Geographical
111 coordinates of the sampling sites were obtained using a Garmin GPSMAP 60CS
112 (Garmin International, Inc., Olathe, KA, USA).

113 The ovitraps were made of black plastic containers, with a capacity of 1 L and a
114 cylindrical shape, containing four wooden paddles (2.5 × 14 cm). The traps were placed
115 at a height that varied between 2 and 10 m above soil level. The details on the use and
116 manufacturing of the ovitraps can be found in the studies by Silver (Silver 2008) and
117 Alencar (Alencar et al. 2013). The paddles in traps were examined every 2 weeks to
118 detect and quantify the eggs, the eggs' age were not considered as an additional
119 variable. Immediately after arriving to the laboratory the positive paddles were
120 immersed in white trays filled with dechlorinated water at 29 ± 1 °C, these trays were
121 kept in acclimatized chamber for hatching. After 3 days, the paddles were removed
122 from the water and left to air dry for another 3 days to quantify the hatched larvae.
123 Immature forms were reared as described by Alencar (2008).

124 The adult specimens were identified through direct observation of morphological
125 characters under a stereoscopic microscope and a transmitting light microscope and

126 using the dichotomous keys proposed by Arnell (1973) and Forattini (2002). The
127 abbreviations of generic and subgeneric names follow the proposal by Reinert (2001).

128 To evaluate the influence of multiple immersions on egg hatching in the
129 biological cycle and to observe the highest hatchability in *Haemagogus* species, the
130 collected eggs were immersed 40 times.

131 The difference in the proportion of hatched eggs between the species was
132 evaluated by the Mann-Whitney test (0.05 significance level). This is a non-parametric
133 test, used to compare two independent groups when the data are not normally
134 distributed or does not follow a Gaussian distribution.

135

136 **Ethical considerations**

137 All research was performed in accordance with scientific license number 34911
138 provided by SISBIO/IBAMA (Authorization and Information System on Biodiversity/
139 Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources) for the capture of
140 culicids throughout the Brazilian national territory. All members of the collection team
141 were vaccinated against the yellow fever virus and were aware of the possible risks they
142 could encounter in the study area.

143

143 **RESULTS**

144 During the sampling period, 6721 eggs were collected. Of these, 1928 eggs
145 (28.7%) were already hatched on the paddles. Of 4793 eggs that did not hatch, 3833
146 eggs (57.0%) hatched after being immersed in the laboratory. These hatched eggs
147 belonged to three species: *Hg. leucocelaenus*, 1100 specimens (28.7%); *Hg.*
148 *janthinomys*, 62 specimens (1.6%); *Ae. albopictus*, 327 specimens (8.5%). In total, 1489
149 (38.8%) specimens reached and got to the adult stage in the laboratory and 2344

150 (61.2%) failed to age to adulthood. Overall, the eggs did not show a defined hatching
151 pattern during the sampling period. The highest hatching rate was observed in eggs
152 collected in November, December, February, April, and October, while, the lowest
153 hatching rates were detected for eggs collected in January, May, and July (Figure 1).

154 Based on the total number of collected eggs, summer and spring were the
155 seasons of the year that were more favorable to Culicidae, as indicated by their high
156 frequency in November, December, and February. The seasons with the lowest
157 frequency were autumn and winter.

158 *Haemagogus leucocelaenus* was the species with the highest population density
159 in all sampling periods, followed by *Ae. albopictus*, which showed similar results in
160 regard to egg quantity along the study period. In contrast, *Hg. janthinomys* was the
161 species with the lowest frequency during sampling. The eggs of *Hg. leucocelaenus* were
162 collected in all sampling months and showed the highest viability rate in all months,
163 except in April and August.

164 The Mann-Whitney test (0.05) showed no significant difference between *Ae.*
165 *albopictus* and *Hg. leucocelaenus* ($p = 0.21$). However, a significant difference was
166 observed between *Ae. albopictus* and *Hg. janthinomys* ($p < 0.01$) and *Hg. leucocelaenus*
167 and *Hg. janthinomys* ($p < 0.01$). The individuals of the species *Hg. leucocelaenus* and
168 *Hg. janthinomys* kept in acclimatized chamber, showed highest hatchability upon the
169 3rd and 22nd immersion (Figure 2).

170 These results show the variable effects of immersions on egg hatching, *Hg.*
171 *leucocelaenus* showed a hatching viability up to the 21st immersion, while *Hg.*
172 *janthinomys* eggs remained viable until the 37th (Figure 3).

173

174

DISCUSSION

175 The knowledge on *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, and *Ae. albopictus*
176 hatching rate and oviposition behavior presented herein contributes with important data
177 on the biology of these species, which will aid the entomological surveillance of areas
178 with confirmed SYF cases in Rio de Janeiro's Atlantic Fores.

179 Culicidae breed in different sites during their immature stages, which can be
180 divided, basically, into two groups, those that breed in transitory aquatic environments
181 and those that breed in permanent aquatic environments. Those habitats influence and
182 regulate their biology, as well as their type of ecological interactions (Juliano 2009).

183 However, in their comparative study on the effects of multiple immersions of
184 Aedini eggs, Alencar et al. (2014) observed that most eggs of *Aedes* and *Ochlerotatus*
185 hatched during the first immersion, in contrast, the hatching of the eggs in *Haemagogus*
186 varied according to the incubation period (instalment hatching) and required multiple
187 immersions in order to hatch.

188 Hovanitz (1946) observed hatching of *Hg. janthinomys* eggs right after one
189 immersion. According to Clements et al. (1963), in some Aedini, such as *Haemagogus*,
190 *Aedes*, and *Psorophora*, the eggs hatch to first-instar larvae as soon as the
191 environmental conditions are favorable. Similar results were found in the present
192 analysis, in which the hatching of *Hg. leucocelaenus*, *Aedes albopictus* and *Hg.*
193 *janthinomys* eggs were highest during the first immersions.

194 Mullen and Durden (2009) reported that egg diapause is a long and stable pause
195 during the incubation, even when the environmental conditions are favorable.
196 Quiescence, however, is induced by unfavorable environmental conditions, and it is
197 interrupted after the exposure to appropriate hatching stimuli such as floods.

198 A defined hatching pattern of Culicidae eggs was not observed in the present
199 study, thus corroborating the previous study on the effect of multiple immersions in
200 different species of mosquito in Minas Gerais, Brazil (Alencar et al. 2014) which
201 reported different egg hatching patterns in *Haemagogus*. However, the highest number
202 of hatched eggs in *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* was observed during the 3rd
203 and 22nd immersion, which differed from the results reported by Alencar et al. (2008),
204 conducted in Linhares Municipality, in the Brazilian south-eastern State of Espírito
205 Santo, where the effects of subsequent immersions were not significant after the 9th
206 immersion. This could be explained by the fact that egg diapause is expressed at
207 different intensities, not only in eggs exposed to different conditions, but also in those
208 exposed to the same conditions and laid by the same female. Exposure to warmer
209 temperatures before and after immersion tends to benefit the hatching (Campos and Sy
210 2006).

211 Ferreira et al. (2017) reported that despite an abrupt decrease in egg hatching of
212 *Hg. leucocelaenus* after the 8th immersion, egg viability was observed until the 12th
213 immersion. However, in the present study, a different egg hatching pattern was seen in
214 *Hg. leucocelaenus*, with egg viability observed all the way until the 21st immersion.

215 In the present study, summer and spring were the most favorable seasons for
216 Culicidae egg collecting. Rouquayrol (1994) reported that arthropods can be affected by
217 climatic changes such as changes in temperature, air relative humidity, and rainfall,
218 which in turn have a direct effect on the emergence or re-emergence of infectious
219 diseases transmitted by these vectors (Anyamba et al. 2014).

220 The species with the highest population density in all the sampling periods
221 evaluated in this work was *Hg. leucocelaenus*. We obtained similar results to those

222 reported by Alencar et al. (2016) in which this species was captured at the highest
223 frequency, accounting for 73% of the collected individuals. In addition, it also had the
224 highest population density and was found to colonize all altitudes, suggesting that this is
225 a generalist species. However, Gomes et al. (2010) observed that a higher abundance of
226 *Hg. leucocelaenus* was seen near the top of the trees, possibly due to a strong
227 association of this species with non-human primates. Also in regard to the same paper
228 *Hg. leucocelaenus* presented higher percentage of females with human blood, this
229 notion justifies the existence of a link between the natural focus of arboviruses and
230 human dwellings located within the dispersion limits of the species.

231 The lack of information on the egg biology of the species evaluated in this work
232 shows the need to perform further studies using this approach. Despite the evidence for
233 active SYF viral transmission in the area where eggs were collected, a special attention
234 should be given to monitor the onset of febrile diseases in surrounding communities.

235

236 **Conflict of interest**

237 The authors declare there is no conflict of interest.

238 **Financial support**

239 This work was supported by the Foundation for Research Support of the State of
240 Rio de Janeiro (FAPERJ; grant numbers 26/010.001630/2014, E-26/202.819/2015).

241

242

243

244

245

246

REFERENCES

247 **Alencar J., H. M. de Almeida, C. B. Marcondes and A. É. Guimarães. 2008.** Effect
248 of multiple immersions on eggs and development of immature forms of *Haemagogus*
249 *janthinomys* from south-eastern Brazil (Diptera: Culicidae). Entomol News. 119:139-
250 244.

251

252 **Alencar J., F. Morone, C. F. De Mello, N. Dégallier, P. S. Lucio, N. M. de Serra-**
253 **Freire and A. E. Guimarães. 2013.** Flight height preference for oviposition of
254 mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of sylvatic yellow fever virus near the
255 hydroelectric reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. J Med Entomol. 50:791-5.

256

257 **Alencar J., R. M. Gleiser, F. Morone, C. F. de Mello, J. S. Silca and N. M. Serra-**
258 **Freire. 2014.** A comparative study of the effect of multiple immersions on Aedini
259 (Diptera: Culicidae) mosquito eggs with emphasis on sylvan vectors of yellow fever
260 virus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 109:114-7.

261

262 **Alencar J., C. F. de Mello, H.R. Gil-Santana, A. É. Guimarães, S. A. de Almeida**
263 **and R. M. Gleiser. 2016.** Vertical oviposition of mosquitoes in the Atlantic Forest of
264 Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera:
265 Culicidae). J Vector Ecol. 41:18-26.

266

267 **Anyamba A., J. L. Small, S. C. Britch, C. J. Tucker, E. W. Pak and C. A. Reynolds,**
268 **2014.** Recent weather extremes and impacts on agricultural production and vector-borne
269 disease outbreak patterns. PLoS One, e992538.

270 **Arnell J. H. 1973.** Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXXII. A revision of the
271 genus *Haemagogus*. Contrib Am Entomol Soc. 10:1-174.

272

273 **Azevedo R. S. S., E. V. P. Silva, V. L. Carvalho, S. G. Rodrigues, J. P. N. Neto, A.**
274 **O. Monteiro, V. S. Peixoto, O. Jannifer, Chiang, M. R. T. Nunes and P. F.**
275 **Vasconcelos. 2009.** Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 15:1830-
276 32.

277

278 **Calderón-Arguedas O., A. Troyo, R. D. Moreira-Soto, R. Marin and L. Taylor.**
279 **2015.** Dengue viruses in *Aedes albopictus* Skuse from a pineapple plantation in Costa
280 Rica. J Vector Ecol. 40:184-6.

281

282 **Campos R.E. and V.E. Sy. 2006.** Variation in the hatching response of *Ochelerotatus*
283 *albifasciatus* egg batches (Diptera: Culicidae) in temperate Argentina. Mem Inst
284 Oswaldo Cruz. 101: 47-53.

285

286 **Chadee D. D. 1983.** Rock hole breeding *Haemagogus* mosquitoes on Monos Island,
287 Trinidad, West Indies. Mosq News. 43:236-7.

288

289 **Clements A. N. and Kerkut G. A. 1963.** The physiology of Mosquitoes. Pergamon
290 Press. London. England.

291

292 **Contigiani and Diaz, 2009.** Togaviroses: encefalites e outras doenças. In: Marcondes,
293 C. B. Doenças transmitidas e causadas por artrópodes. Editora Atheneu. SP.

294 **de Rodaniche and P. Galindo. 1961.** Isolation of the virus of Ilheus encephalitis from
295 mosquitoes captured in Panama. Am J Trop Med Hyg. 10: 393–394.

296

297 **Ferreira A. T., D. A Maia, F.V.S Abreau, W.C Rodrigues and A. Jeronimo. 2017.**
298 Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), a vector of
299 wild yellow fever in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. (in-press).

300

301 **Forattini O. P. 2002.** Culicidologia Médica. vol 2: Identificação, biologia,
302 epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil.

303

304 **Gomes A. C., M. A. N Torres, M. B. de Paula, A. Fernandes, A. M. Marassá, A.**
305 **Consales and D. F. Fonseca. 2010.** Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera:
306 Culicidae) em áreas epizoóticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil.
307 Epidemiologia e Serviços de Saúde. 19:101-13.

308

309 **Gratz N. G. 2004.** Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet
310 Entomol. 18:215-27.

311

312 **Hervé J. P., N. Dégallier, P. A. Amélia, T. Rosa, P. F. Pinheiro and C. G. S. Filho.**
313 **1986.** Arboviroses: aspectos ecológicos. In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos. Instituto
314 Evandro Chagas. Belém. Brasil.

315

316 **Hoch A. L., N. E. Peterson, J. W. LeDuc and F. P. Pinheiro. 1981.** An Outbreak of
317 Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III: entomological and Ecological studies. Am
318 J Trop Med Hyg. 30(3):689-98.

319

320 **Hovanitz W. 1946.** Comparisons of mating behavior, growth rate, and factors
321 influencing egg-hatching in South American *Haemagogus* mosquitoes. *Physiol Zool.*
322 19:35-53.

323

324 **National Institute of Meteorology (INMET). 2017.** Estação Meteorológica de
325 Observação de Superfície Automática.
326 (<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesautomaticas>) (accessed
327 14 Sept 2017).

328

329 **Juliano S. A. 2009.** Species interactions among larval mosquitoes: context dependence
330 across habitat gradients. *An Rev Entomol.* 54:37-56.

331

332 **Marcondes C. B and J. Alencar. 2010.** Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston
333 (Diptera:Culicidae) do Brasil. *Revista Biomédica.* 21:221-38.

334

335 **Mullen G. R. and L. A. Durden. 2009.** Medical and veterinary entomology, 2nd ed.
336 Academic Press. Amsterdam. Netherlands.

337

338 **Reinert J. F. 2001.** Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae
339 (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. *J Am Mosq Control Assoc.*

340 17:51-5.

341

342 **Rouquayrol M. Z. 1994.** Distribuição das doenças e dos agravos à saúde. In:
343 Rouquayrol MZ, editor. Epidemiologia & Saúde. MEDSI Editora Médica e Científica
344 Ltda. Rio de Janeiro. Brasil.

345 **Silver, J. B. 2008.** Mosquito ecology: field sampling methods, 3rd ed. Springer, New
346 York. USA.

347

348 **Takizawa, F. H. 1995.** Levantamento pedológico e zoneamento ambiental da Reserva
349 Biológica de Poço das Antas. Piracicaba. Universidade de São Paulo. Brasil.
350

351 **Vasconcelos P. F. C., A. F. Sperb, H. A. O. Monteiro, M. A. N. Torres, M. R. S.**
352 **Souza, H. B. Vasconcelos, B. L. F. Mardini and S. G. Rodrigues. 2003.** Isolations of
353 yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil.
354 Tran R Soc Trop Med Hyg. 97:60-2.

355

356 **Vasconcelos P. F. C., A. P. A. Travassos da Rosa, F. P. Pinheiro, R. E. Shope, J. F.**
357 **S. Travassos da Rosa, S. G. Rodrigues, N. Dégallier and E. S. Travassos da Rosa.**
358 **1998.** Arboviruses pathogenic for man in Brazil: an overview of arbovirology in Brazil
359 and neighboring countries. Instituto Evandro Chagas. Belém. Brasil.

360

361 **Waddell M. B. 1949.** Comparative efficacy of certain South American *Aedes* and
362 *Haemagogus* mosquitoes as laboratory vectors of yellow fever. Am J Trop Med Hyg.
363 29:567-75.

364

365 **World Health Organization. 2017.** Yellow fever – Brazil.

366 (<http://www.who.int/csr/don/04-april-2017-yellow-fever-brazil/en/>) (accessed 10 June

367 2017)

368

369

370 **Figure Legends**

371

372 **Figure 1.** Percentage (%) of hatched eggs per month from November 2015 to

373 November 2016.

374 **Figure 2.** Hatching rate by immersion of eggs collected with ovitraps in October and

375 November 2015, Bom Retiro Private Reserve of Natural Heritage (RPPNBR), State of

376 Rio de Janeiro, Brazil.

377 Blue dotted circles (*Aedes albopictus*), red dotted (*Haemagogus leucocelaenus*) and

378 green striped diagonal (*Hg. janthinomys*). The highest hatchability for the specimens of

379 *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* can be observed upon the 3rd and 22nd

380 immersion.

381 **Figure 3.** Cumulative effect of several egg immersions of *Ae. albopictus* (blue circle),

382 *Hg. leucocelaenus* (red square) and *Hg. janthinomys* (green diamond), collected from

383 November 2015 to November 2016, Bom Retiro Private Reserve of Natural Patrimony

384 (RPPNBR), state of Rio de Janeiro, Brazil.

385

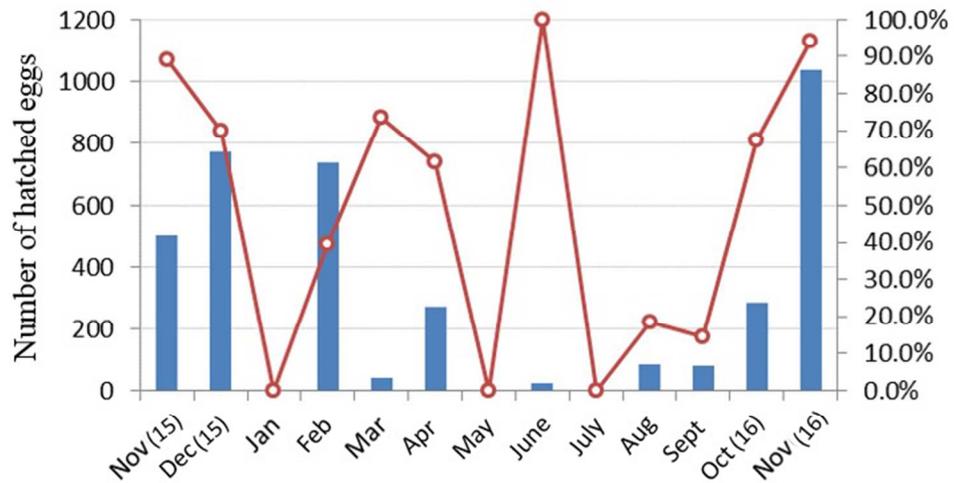


Figure 1. Percentage (%) of hatched eggs per month from November 2015 to November 2016.

63x35mm (300 x 300 DPI)

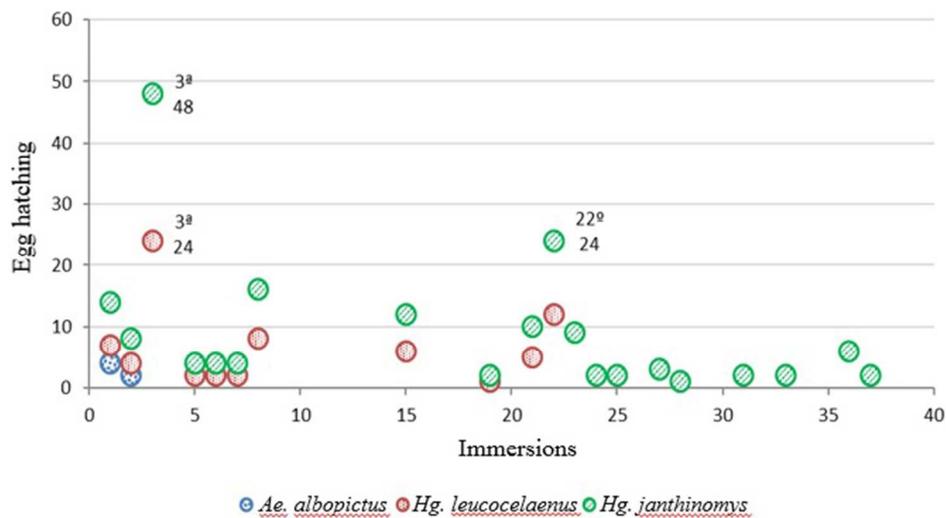


Figure 2. Hatching rate by immersion of eggs collected with ovitraps in October and November 2015, Bom Retiro Private Reserve of Natural Heritage (RPPNBR), State of Rio de Janeiro, Brazil. Blue dotted circles (*Aedes albopictus*), red dotted (*Haemagogus leucocelaenus*) and green striped diagonal (*Hg. janthinomys*). The highest hatchability for the specimens of *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* can be observed upon the 3rd and 22nd immersion.

59x34mm (300 x 300 DPI)

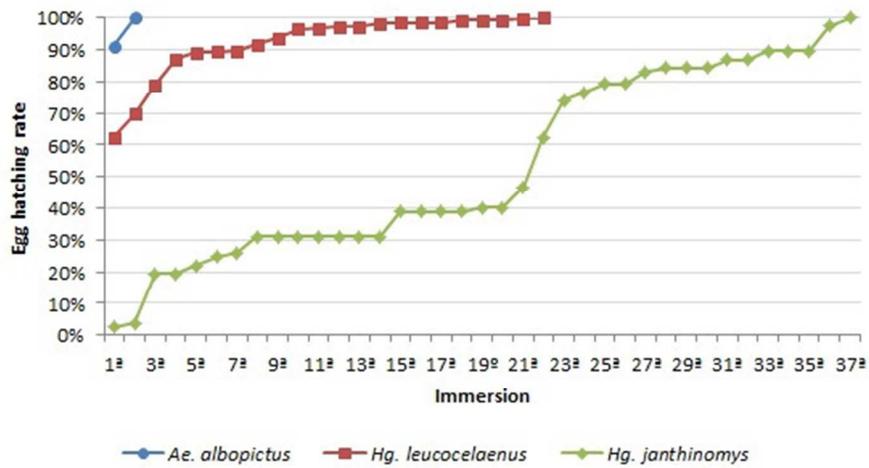


Figure 3. Cumulative effect of several egg immersions of *Ae. albopictus* (blue circle), *Hg. leucocelaenus* (red square) and *Hg. janthinomys* (green diamond), collected from November 2015 to November 2016, Bom Retiro Private Reserve of Natural Patrimony (RPPNBR), state of Rio de Janeiro, Brazil.

52x25mm (300 x 300 DPI)

Vector-Borne and Zoonotic Diseases: <http://mc.manuscriptcentral.com/vbz>

Distribution of the mosquito communities (Diptera: Culicidae) in oviposition traps introduced into the Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil

Journal:	<i>Vector-Borne and Zoonotic Diseases</i>
Manuscript ID	VBZ-2017-2222
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	17-Oct-2017
Complete List of Authors:	Silva, Shayenne; Fundacao Oswaldo Cruz, Laboratório de Diptera Mello, Cecilia; Fundacao Oswaldo Cruz, Laboratório de Diptera Figueiró, Ronaldo; Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Environmental Biotechnology laboratory Maia, Daniele; Fundacao Oswaldo Cruz, Laboratório de Diptera ALENCAR, JERONIMO; Fundacao Oswaldo Cruz, Laboratório de Diptera
Keyword:	Entomology, Mosquito(es), Monitoring, Ovitrap, Population
Manuscript Keywords (Search Terms):	Culicidae, Haemagogus leucocelaenus, Haemagogus janthinomys, Aedes albopictus, Eggs, Climatic Variables
Abstract:	The Atlantic Rainforest of South America is one of the major biodiversity hotspots of the world, and serves as a shelter for a wide variety of Culicidae species. Mosquito studies in the natural environment is of considerable importance because of their role in transmitting pathogens to both humans and other vertebrates. Community diversity can have significant effects on the risk of disease transmission by these arthropods. The present study had the objective of understanding the distribution of mosquito communities that colonize oviposition traps in a region of the Atlantic Forest. Sampling was carried out in Bom Retiro Private Natural Reserve (RPPNBR), located in the city of Casimiro de Abreu, state of Rio de Janeiro, using oviposition traps, which were installed in the forest environment, from October 2015 to December 2016. The canonical correspondence analysis (CCA) was used to assess the influence of the climatic variables (precipitation, maximum dew point, and direction) throughout the seasons on the population density of the mosquito species. The results showed that population density was directly influenced by climatological variables, which acted as a limiting factor for the species studied. The climatic variables that were significantly correlated with the density of the mosquito species were precipitation, maximum dew point, and direction. It was observed that Haemagogus janthinomys was positively correlated with the three climatic variables, whereas Haemagogus leucocelaenus was positively correlated with precipitation and maximum dew point, and negatively correlated with direction.

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only/Not for Distribution

**Distribution of the mosquito communities (Diptera: Culicidae) in oviposition traps
introduced into the Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil**

Running title: Mosquito community composition in Brazil

Shayenne Olsson Freitas Silva ^[1,2], Cecilia Ferreira de Mello^[1,3], Ronaldo Figueiró^[5,6,7],

Daniele de Aguiar Maia^[1,3], Jeronimo Alencar^[1]

[1]. Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Av. Brasil 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil. [2]. Postgraduate Program in Tropical medicine, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Av. Brasil 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil. [3]. Postgraduate Program in in Animal Biology, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, ZIP: 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. [4]. Interdisciplinary Entomological Surveillance Laboratory in Diptera and Hemiptera, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. [5]. Environmental Biotechnology laboratory, Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, 23070-200, Rio de Janeiro, Brazil [6]. Centro Universitário de Volta Redonda (UniFOA), Av. Paulo Erlei de Abrantes, 1325, 27240-560, Volta Redonda, RJ, Brazil [7]. Universidade Castelo Branco (UCB), Av. Santa Cruz, 1631, 21710-250, Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT

The Atlantic Rainforest of South America is one of the major biodiversity hotspots of the world, and serves as a shelter for a wide variety of Culicidae species. Mosquito studies in the natural environment is of considerable importance because of their role in transmitting pathogens to both humans and other vertebrates. Community diversity can have significant effects on the risk of disease transmission by these arthropods. The present study had the objective of understanding the distribution of mosquito communities that colonize oviposition traps in a region of the Atlantic Forest. Sampling was carried out in Bom Retiro Private Natural Reserve (RPPNBR), located in the city of Casimiro de Abreu, state of Rio de Janeiro, using oviposition traps, which were installed in the forest environment, from October 2015 to December 2016. The canonical correspondence analysis (CCA) was used to assess the influence of the climatic variables (precipitation, maximum dew point, and direction) throughout the seasons on the population density of the mosquito species. The results showed that population density was directly influenced by climatological variables, which acted as a limiting factor for the species studied. The climatic variables that were significantly correlated with the density of the mosquito species were precipitation, maximum dew point, and direction. It was observed that *Haemagogus janthinomys* was positively correlated with the three climatic variables, whereas *Haemagogus leucocelaenus* was positively correlated with precipitation and maximum dew point, and negatively correlated with direction.

Keywords: Culicidae; *Haemagogus leucocelaenus*; *Haemagogus janthinomys*; *Aedes albopictus*; Eggs; Climatic Variables

Introduction

The Atlantic Forest comprise a set of forest formations that have a rich diversity of species of the Culicidae family with considerable spatial variability. The topographic complexity of this environment allows the existence of a broad spectrum of microclimates and environmental conditions that influence the availability and sustainability of mosquito habitats (Alencar et al. 2011, Marques 2012, Correa et al. 2014).

Climate change can affect biodiversity at different levels, accelerating the metabolism of some individuals, in addition to affecting the food chains and ecological interactions of populations and communities (Hughes 2000). One of the most critical issues related to climate change is its impact on disease vectors (Chaves & Koenraadt 2010). According to Alencar et al. (2011), the activity level of different Culicidae species is directly influenced by the climatic variables, such as temperature and air humidity. Understanding the biodiversity, richness, and the abundance of Culicidae species and their response to anthropological activities is essential for predicting changes in their populations (Alencar et al. 2016).

Community diversity can significantly increase the risk of pathogen transmission from vector organisms to humans (Keesing et al. 2006). Nevertheless, a greater variety of hosts in a more diverse community with less competent hosts may reduce the incidence of the disease in the focal host by a "dilution effect." This hypothesis was demonstrated by Johnson (2010) in his observational study on the transmission of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, wherein he found that increasing the diversity of a community substantially reduces the transmission of the parasite. This connection

1
2
3 between species diversity and disease transmission by vectors is based on
4
5 zoophylaxis, using animals that attract hematophagous insects away from humans.
6

7
8 However, it has been suggested that high diversity can increase the risk of
9
10 transmission when there is a greater supply of alternative hosts; the amount and activity
11
12 of the insect vectors increases and these hosts function as alternative sources of
13
14 infection. Hence, it is important to know the vector community, and eventually their
15
16 hosts in order to perform an overall assessment of the transmission risk (Holt &
17
18 Pickering 1985; Norman et al. 1999; Gilbert et al. 2001; Schmidt & Ostfeld 2001; Saul
19
20 2003; Dobson 2004).
21

22
23 One of the surveillance methods for these vectors includes the use of oviposition
24
25 traps. It is a sensitive method for mosquito detection (Resende et al. 2014), which can
26
27 generate indices that aid in the early detection of new infestations (Gomes 1998),
28
29 besides being economically and operationally viable (Braga et al. 2007). This trap
30
31 assists in the determination of geographic dispersion, density, frequency, and
32
33 seasonality (Glasser & Gomes 2000, Passos et al. 2003, Juliano 1998). Some
34
35 characteristics observed in the adult insects are largely a product of their larval
36
37 environment (Braks et al. 2004); which may affect their vectorial competence (ability to
38
39 become infected), and consequently, their ability to transmit the pathogen (Hardy 1988).
40
41 Oviposition traps have been successfully used to obtain the eggs of *Haemagogus*
42
43 *leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 (Medeiros et al. 2009), *Haemagogus equinus*
44
45 Theobald, 1903 (Chadee et al. 1990) and *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921
46
47 (Alencar et al. 2004).
48
49
50

51
52 Mosquitoes of the genus *Haemagogus* Williston, 1896 and *Sabethes* Robineau-
53
54 Desvoidy, 1827, are the most epidemiologically important species involved in the
55
56 transmission of wild-type yellow fever virus; thereby acting as biological vectors in the
57
58
59
60

1
2
3 forest areas of the Americas (Arnell 1973). The *Haemagogus* species are wild, with
4 diurnal habits and develop their activities in the tree canopies, and some of these species
5 show a tendency for domiciliation (Marcondes & Alencar 2010). According to the
6
7 Ministry of Health data from December 2016 to May 31, 2017, there were 3240 reports
8
9 of suspected cases of wild-type yellow fever, of which 519 (16%) remained under
10
11 investigation and 792 (24.5%) cases were confirmed; the rest 1,929 (59.5%) cases were
12
13 discarded. About 79 cases were notified to the State Health Department, Rio de Janeiro,
14
15 of which 27 were confirmed and 55 were discarded during the period from January to
16
17 August 2017. Of the 27 confirmed cases, 08 of these had as its origin point the
18
19 municipality of Casimiro de Abreu and 01 the municipality of Silva Jardim.
20
21
22
23
24

25 The present study aimed to observe the distribution of effective or potential
26
27 vector species of wild-type yellow fever virus that colonize the oviposition traps and to
28
29 analyze the influence of climatic variables (precipitation, maximum dew point, and
30
31 direction) on the vector distribution during different seasons of the year in an area of the
32
33 Atlantic Forest with confirmed wild-type yellow fever cases.
34
35

36 **Materials and methods**

37 **Ethics statement**

38
39
40 The permanent license for collecting, capturing, and transporting zoological
41
42 material from the Bom Retiro Private Natural Reserve (RPPNBR) was granted by the
43
44 Environment and Agriculture Secretariat (SISBIO) with number: 34911-1, dated
45
46 06/14/2012 across all the national territory.
47
48

49 **Area of study.** The RPPNBR, Casimiro de Abreu Municipality, Rio de Janeiro State,
50
51 approximately 140 km from the city of Rio de Janeiro, has an area largely covered by
52
53 the typical Atlantic Forest vegetation that persists for most of the year under the control
54
55 of the Tropical Mass (MTA) originated from the Tropical Atlantic Anticline. The
56
57
58
59
60

1
2
3 region experiences average annual temperatures ranging from 18 °C to 24 °C, owing to
4
5 the marked solar radiation of the tropical latitudes, and strong relative humidity due to
6
7 intense sea evaporation. Owing to its own characteristics, the dominance of this air mass
8
9 maintains the stability of the weather, although interference from the Polar fronts or
10
11 discontinuities, and Tropical Instability Lines, which promote weather instability might
12
13 occur during the year. Such disturbed currents are largely responsible for the annual
14
15 rainfall, particularly, along with the contribution of summer rains that generate a
16
17 predominantly tropical humid climate (Takizawa 1995). The area of the RPPNBR in the
18
19 Sao Joao River Basin is located in the intertropical zone (low latitudes), with intense
20
21 solar radiation and great influence of the Atlantic Ocean (Cunha 1995) that produces a
22
23 tropical wet climate. Geographical coordinates of the sampling sites were obtained
24
25 using the Garmin GPSmap 60CS GPS. Maps were prepared in Arcview10 and edited in
26
27 Adobe Photoshop CS5 and CorelDraw X5. The sampling sites are: Sites in Bom Retiro
28
29 Private Natural Reserve (RPPNBR), state of Rio de Janeiro, Brazil; Site 1 – RPPNBR
30
31 entrance, the secondary forest under the direct influence of the river and waterfalls
32
33 (22°27'19.4" S, 42°18'09.5" W); Site 2 – located near the reserve management, an
34
35 anthropogenic environment and composed of forests in the advanced stage of
36
37 regeneration (22°27'15.4" S, 42°18'02.4" W); Site 3 – the entrance to the forest, with
38
39 vegetation in the advanced stage of regeneration (22°27'19.5" S, 42°18'01.5" W); Site 4a
40
41 and 4b - forest with original vegetation and some parts showing bamboo monoculture
42
43 (22°27'14.1" S, 42°17'34.9" W); Site 5 - presents large areas with forests similar to the
44
45 original biocenotic structure (22°26'58.7" S 42°17'11.6" W) (Fig. 1).
46
47
48
49
50

51
52 Monitoring was performed using oviposition traps that consisted of a black pot,
53
54 with a 1 L capacity without a lid, and four plywood pallets (Eucatex® plates) measuring
55
56 2.5 cm × 14 cm, and fixed vertically inside the trap by "CLIPS" (Alencar 2016). Natural
57
58
59
60

1
2
3 water and remains of leaves and animals found on the forest soil were added into the
4
5 trap to generate an ecosystem closer to the natural one. The traps were randomly placed
6
7 at 2.50 m above the soil level and were monitored through October 2015 to December
8
9 2016. All the paddles were sequentially numbered and placed in a humid chamber and
10
11 sent to the Diptera Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute.
12

13
14 In the laboratory, the positive paddles (containing eggs) were separated, their
15
16 eggs were counted, and were then immersed in clear trays containing MilliQ® water.
17
18 The eggs were then placed in a controlled experimental environment at a thermoperiod
19
20 regulated at $28\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, relative humidity of 75 to 90%, and a photoperiod of 10
21
22 hours. The specimens were kept alive for species determination in adulthood. Later, the
23
24 collected eggs were allowed to hatch, and were taxonomically identified upon reaching
25
26 the adult stage by direct observation of the morphological characters using the
27
28 stereomicroscopic microscope (Zeiss®), and by comparing with the respective
29
30 descriptions of the species using the dichotomous keys elaborated by Consoli &
31
32 Lourenço-de-Oliveira (1994), Forattini (2002), and Marcondes & Alencar (2010).
33
34 Abbreviations for the generic and subgeneric names were assigned in accordance to
35
36 Reinert (2001). After the specific determination, all the specimens were incorporated
37
38 into the Entomological Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, under the title
39
40 "Culicidae Mata Atlântica."
41
42
43
44

45
46 The data were analyzed to assess the ecological relationship between the
47
48 Culicidae populations and the climatic variables of the study area. The Canoco 4.5
49
50 program was used to evaluate and compare the differences in the composition of the
51
52 mosquito communities and the relationship between the population density and the
53
54 climatic variables (Precipitation, Maximum dew Point, and Direction) (Ter Braak and
55
56 Simaluaer 2002). The Canonical Correspondence Analysis (CCA) was performed to
57
58
59
60

1
2
3 evaluate the correlation structure between the mosquito community and the climatic
4
5 variables. The Monte Carlo Simulation generates random data matrices to prove the
6
7 presence/absence of the effects of the variables.
8
9

10 11 12 **Results**

13
14 During the collection period from October 2015 to December 2016, a total of
15
16 7186 eggs were collected, and 1469 specimens of Culicidae were identified,
17
18 representing three genera and five species: *Hg. (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar &
19
20 Shannon, 1924): 976 specimens; *Hg. (Haemagogus) janthinomys* (Dyar, 1921): 70
21
22 specimens; *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894): 375 specimens; *Aedes*
23
24 (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1752): 42 specimens; *Culex (Carrollia) iridescens*
25
26 (Lutz, 1905): 4 specimens; and *Limatus durhamii* (Theobald, 1901): 2 specimens
27
28 (Table. 1).
29
30

31
32 *Monthly variation* – Maximum abundance of *Hg. leucocelaenus* was observed in
33
34 December 2015 and November 2016, whereas *Hg. janthinomys* was more frequent in
35
36 the months of February and November 2016. *Ae. albopictus* was found most frequently
37
38 in the months of April and November 2016, whereas *Ae. aegypti* and *Cx. iridescens*
39
40 were more abundant in October 2015 and November 2015, respectively (Table. 2).
41
42

43
44 The climatic variables that were significantly correlated with mosquito densities
45
46 were precipitation (P: 0.0080), maximum dew point (P: 0.0348), and direction (P:
47
48 0.0346). *Hg. janthinomys* individuals were positively correlated with the three climatic
49
50 variables, whereas *Hg. leucocelaenus* individuals showed positive correlation with
51
52 precipitation and maximum dew point, and were negatively correlated with direction
53
54 (Figure. 2).
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Based on the number of the collected mosquito eggs, the results revealed a high
4
5 level of population density of vectors in the summer and spring, comprising 2002 and
6
7 1102 eggs in February and November 2016, respectively (Table. 3). A simple linear
8
9 regression was performed using the software R, version 3.4.1, with a confidence index
10
11 of 95% and $P < 0.05$ to analyze the correlation between the number of eggs and rainfall,
12
13 using the number of eggs as the discrete variable and rainfall as the continuous variable
14
15 (Table. 4). The regression analysis revealed that the number of Culicidae eggs were
16
17 significantly associated with rainfall ($P: 0.003561$) (Figure. 3).
18
19

20
21 In order to understand the dissimilarities or similarities among the sampling
22
23 units, a non-metric multidimensional scale (NMDS) was used. The purpose of the
24
25 NMDS was to represent the original position of the mosquito communities in the
26
27 multidimensional space as accurately as possible using a small number of dimensions
28
29 that can be easily plotted and visualized. Figure 4 shows the level of similarity and
30
31 differences among the sampling points of collection based on their proximity to each
32
33 other. Coordinates 1 and 2 assist in the allocation of these points in a Cartesian plane.
34
35

36
37 The most distinct collection sites observed were site 4A and 4B. The most
38
39 similar sampling sites were sites 1 and 2. The sampling sites 4A and 3 were similar in
40
41 relation to coordinate 1; however, they were distinct from coordinate 2. Sites 3 and 4 B
42
43 were similar in relation to coordinate 2; however, they were very divergent from
44
45 coordinate 1 (Figure. 4).
46

47 **Discussion**

48
49 Understanding the biodiversity of mosquito species in the Atlantic Forest is
50
51 fundamental for the prediction of possible changes in these populations. The mosquito
52
53 fauna present in this environment has great biodiversity, including potential vectors of
54
55 the yellow fever virus and other arboviruses. Mosquitoes of the genus *Haemagogus* and
56
57
58
59
60

1
2
3 *Sabethes* spp. are the main vectors of the wild-type yellow fever virus in the forest areas
4 of the Americas, and are of major importance in the transmission of this arbovirus
5
6 (Vasconcelos 2003).
7
8

9
10 Most of the species found in the present study are known to be vectors of several
11 agents considered pathogenic to humans. *Hg. janthinomys* stands out as the main vector
12 of the wild-type yellow fever virus in the Americas, as well as being a vector of other
13 arboviruses, such as Mayaro and Ilheus (Vasconcelos et al. 2003). *Hg. leucocelaenus* is
14 a vector of wild-type yellow fever virus in Brazil (Arnell 1973). *Ae. aegypti* and *Ae.*
15 *albopictus* are known to be dengue virus vectors (WHO 2015); *Ae. aegypti* is also
16 known for its ability to transmit other viral diseases, such as yellow fever, chikungunya
17 (Powell & Tabachnick 2013) and zika (Marchette 1969; Diallo 2014). The genus *Culex*
18 can transmit pathogens responsible for causing encephalitis, lymphatic filariasis, and
19 heartworm disease (Service 1993).
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31
32 Alencar et al. (2015) carried out a study in the Guapiaçu Ecological Reserve, Rio
33 de Janeiro, Brazil, and found that the largest number of specimens was observed in
34 April and December. Similarly, a peak was observed in the number of *Ae. albopictus*
35 and *Hg. leucocelaenus* in the months of April and December, respectively, in the
36 present study. The highest number of individuals of *Hg. janthinomys* was observed in
37 February 2016. This result corroborated with those obtained by Pinto et al. (2009) in a
38 study conducted in the National Forest of Caxiuanã, Pará, Brazil, wherein the authors
39 reported an increased abundance of *Hg. janthinomys* species in the same month.
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49
50 In this study, it was observed that *Hg. leucocelaenus* showed a positive
51 correlation with precipitation and maximum dew point, indicating an influence of these
52 abiotic factors on its behavior and subsequent increase in its population. Similar results
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 were reported by Resende (2011), who reported a positive and significant correlation
4
5 between rainfall and monthly frequency of *Hg. leucocelaenus*.
6

7 Alencar et al. (2010) reported that the populations of *Hg. janthinomys* analyzed
8
9 were significantly influenced by rainfall, leading to a change in the activity rhythm of
10
11 the species, thereby increasing its population density in the rainy periods. The present
12
13 study also showed that *Hg. janthinomys* individuals were favored by the three climatic
14
15 variables; precipitation, maximum dew point, and direction.
16
17

18 Marteis (2017) found that a high relative air humidity index guaranteed the
19
20 maintenance of natural breeding sites in the wild environments and promoted the
21
22 formation of larval habitats, consequently influencing the population density of adults.
23
24 These observations corroborated with the results of the present study, considering that
25
26 both *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* species were positively correlated with
27
28 maximum dew point. Patz (2003) reported that the increase in rainfall influences the
29
30 breeding behavior of the vectors, consequently favoring population growth. The same
31
32 trend was also observed in both *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* species that had
33
34 a positive correlation with precipitation in the present study.
35
36
37

38 Furthermore, the fact that many human communities in different Brazilian
39
40 regions do extensive work and/or leisure activities in the nocturnal twilight period is
41
42 worthy of special attention. These activities increase the chances of an encounter of
43
44 these humans with the yellow fever virus vectors. In addition, such activities can also
45
46 increase the confirmed yellow fever cases in nonhuman primates in the region
47
48 surrounding the RPPNBR, which highlights the importance for conducting
49
50 entomological surveillance in this area.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Conclusions

Knowledge regarding the distribution of vector species is crucial for the improvement and maintenance of operations that promote the surveillance and control of these arthropods and with evidence of active sylvatic yellow fever virus transmission next to the natural reserve studied in this paper, the abundance of the mosquito vector for this disease in Brazil requires active surveillance on the emergence of the virus in neighboring communities (Forshey 2010).

Acknowledgments:

This work was supported by the Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ, grant numbers 26/010.001630/2014, E-26/202.819/2015).

Disclosure Statement:

The authors declare that they have no competing interests.

References

Alencar JA, Gil-Santana HR, Lopes CM, Santos JS, Guimarães AE. Utilização de armadilha “ovitrampa” para monitoramento de *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) em área de Mata Atlântica. Entomol Vec 2004; 11:369-374.

Alencar J, et al. Biodiversity and times of activity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Biome of the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. J Med Entomol 2011; 48: 223–231.

Alencar J, Mello CF, Guimarães AE, Gil-Santana HR, Silva JS, Santos-Mallet JR., Gleiser RM. Temporal Dynamics in Guapiaçu Ecological Reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. Plos One. 2015; 10(3):e0122268.

Alencar J, et al. Vertical oviposition of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol 2016; 41:18-26.

Arnell J, Hall. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. Los Angeles. California Press; 1973:1-174.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epi Serv da Saúde, vol. 16. 2007:113-118.

1
2
3 Braks MAH et al. Interspecific competition between two invasive species of container
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Braks MAH et al. Interspecific competition between two invasive species of container
mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Brazil. Ann
Entomol Soc Am 2004; 97:130-139.

Chadee DD, Tikasingh WI. Observations on the Seasonal Incidence and Diel
Oviposition periodicity of *Haemagogus* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Trinidad.
Ann Trop Med and Parasitol 1990; 84(3): 267-275.

Clima-data.org. Clima Aldeia Velha. Available at: [https://pt.climate-
data.org/location/316298/](https://pt.climate-data.org/location/316298/).

Clima-data.org. Clima Casimiro de Abreu. Available at: [https://pt.climate-
data.org/location/33703/](https://pt.climate-data.org/location/33703/).

Chaves LF, Koenraadt CJM. Climate change and highland malaria: Fresh air for a hot
debate. Q Rev Biol 2010; 85:27-55.

Consoli RAGB, Oliveira, RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil
Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1994: 1-228.

Correa FF et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) communities in Nova Iguaçu Natural
Park Rio de Janeiro, Brazil. J Am Mosquito Control Assoc 2014; 30: 83–90.

Cunha SB. Impactos das Obras de Engenharia sobre o Ambiente Biofísico da Bacia do
Rio São João (Rio de Janeiro - Brasil). Rio de Janeiro: Edição do Autor; 1995:1-415.

1
2
3
4
5 Dobson AP. Population dynamics of pathogens with multiple host species. *Am Nat*
6
7 2004; 164:S64–S78.
8

9
10
11 Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in
12
13 mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*. 2014; 9(10):e109442.
14
15

16
17
18 Forshey BM et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western South
19
20 America, 2000– 2007. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(8): e787.
21
22

23
24
25 Forattini OP. *Culicidologia Médica*. 2nd vol., Faculdade de Saúde Pública, Universidade
26
27 de São Paulo: São Paulo; 2002:1- 860.
28
29

30
31
32 Gilbert L, Norman R, Laurenson K, Reid, HW, Hudson, PJ. Disease persistence and
33
34 apparent competition in a threehost community: an empirical and analytical study of
35
36 largescale, wild populations. *J Anim Ecol*. 2001; 70:1053–1061.
37
38

39
40
41 Glasser CM, Gomes AC. Infestação do estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes*
42
43 *albopictus*. *Rev Saúde Públ*. 2000; 34: 570-577.
44
45

46
47
48 Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA. Climate variability and change
49
50 in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ*
51
52 *Health Perspect*. 2001; 109(2): 223-33.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Gomes AC. Medidas dos Níveis de Infestação Urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e
4
5 *Aedes (Stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. IESUS VII
6
7 1998; (3) 50-57.
8
9

10
11 Gomes AC et al. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na
12
13 transmissão de febre amarela silvestre. Rev Saúde Públ. 1999: 95-98.
14
15

16
17
18 Hardy JL, Monath TP. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. The
19
20 arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988:87-126
21
22

23
24
25 WHO. Dengue and severe dengue. Available at
26
27 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
28
29

30
31
32 Holt, R.D, Pickering, J. Infectious disease and species coexistence: a model of Lotka–
33
34 Volterra form. Am Nat 1985; 126, 196–211.
35
36

37
38
39 Hughes L. Biological consequences of global warming: Is the signal already apparent?
40
41 Trends Eco Evol 2000; 15:56-61.
42
43

44
45 Johnson PTJ, Thielges, DWJ. Community diversity reduces *Schistosoma mansoni*
46
47 transmission, host pathology and human infection risk. Exp Biol 2010; 213:961-97
48
49

50
51
52 Juliano SA. Species introduction and replacement amount mosquitoes: interspecific
53
54 resource competition or apparent competition? Ecology. 1998; 79:255-268.
55
56

1
2
3 Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. Effects of Species Diversity on Disease Risk. Ecology
4 Letters. 2006; 9:485-498.
5
6

7
8
9 Marques TC et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with
10 Nidularium and Vriesea bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil. Parasit
11 Vectors 2012; 5: 41.
12
13
14

15
16
17
18 Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti*
19 mosquitoes in Malaysia. Am J Trop Med Hyg 1969; 18(3):411–5.
20
21
22

23
24
25 Marcondes CB, Alencar J. Revisão de mosquitos Haemagogus Williston (Diptera:
26 Culicidae) do Brasil. Rev Biomed 2010; 21: 221–238.
27
28
29

30
31
32 Medeiros AS. Dípteros (Culicidae) Transmissores de Arbovírus em Área de Proteção
33 Ambiental Urbana (Parque Estadual das Dunas Natal-RN) 2004-2006. Dissertação de
34 Mestrado (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Rio Grande do
35 Norte, 2009; p.110.
36
37
38

39
40
41
42 Marteis LS, Natal D, Sallum MAM, Medeiros-Sousa AR, Oliveira TMP, La Corrite R.
43 Mosquitoes of the Caatinga: 1. Adults stage survey and the emerge of seven New
44 species endemic of a dry tropical forest in Brazil. Elsevier. 2017; 166:193-201.
45
46
47
48

49
50
51 Montes J. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. Rev Saúde Públ
52 2005; 39:578–584.
53
54
55

1
2
3 MS. Informe Epidemiológico 059/2017. Centro de Informações Estratégicas de
4
5 Vigilância em Saúde/Unidade de Resposta Rápida - CIEVES/URR, 2017.
6
7

8
9 Norman R, Bowers RG, Begon, M, Hudson, PJ. Persistence of tick-borne virus in the
10 presence of multiple host species: tick reservoirs and parasite-mediated competition. J
11
12 Theor Biol 1999; 200:111–118.
13
14
15

16
17
18 Passos RA et al. Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral sudeste
19 do Brasil. Rev. Saúde Públ 2003; 37: 729-734.
20
21
22

23
24
25 Patz JA, et al. Climate change and human health. Risk and responses. WHO. Genova:
26
27 World Health Organization. 2003:103-32.
28
29

30
31
32 Powell JR, Tabachnick, WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A
33
34 Review. vol. 1. Mem Inst Oswaldo Cruz Academic Press, 2013:11–17.
35
36

37
38 Reinert JF. Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae
39 (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. J Am Mosq Control Assoc
40
41 2001; 17:51–55.
42
43
44

45
46
47 Pinto CS, Confaloiari UEC, Mascarenhas BM. Ecology of *Haemagogus* sp. and
48
49 *Sabethes* sp. (Diptera: Culicidae) in relation to the microclimates of the Caxiuanã
50
51 National Forest, Pará, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(4): 592-598.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Resende MC et al. A comparasion of larval ovitrap and MosquitoTRAP surveillance for
4
5 *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Vol. 108. Mem Inst Oswaldo Cruz Academic Press; 2014:
6
7 1024-1030.
8

9
10
11 Saul A. Zooprophyllaxis or zoopotentialion: the outcome of introducing animals on
12
13 vector transmission is highly dependent on the mosquito mortality while searching.
14
15 Malar J 2003; 2:32–50.
16
17

18
19
20 Schmidt KA, Ostfeld, RS. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology.
21
22 Ecology 2001; 82:609–619.
23
24

25
26
27 Service MW. Mosquito ecology: field sampling method. London: Applied Science Publ,
28
29 1993.
30
31

32
33
34 Takizawa FH. Levantamento Pedológico e Zoneamento Ambiental da Reserva
35
36 Biológica de Poço das Antas. Piracicaba, Departamento de Ciência do Solo, Escola
37
38 Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1995:1-176.
39
40

41
42
43 Vasconcelos PF, Sperb AF, Monteiro HA, Torres MA, Sousa MR, Vasconcelos HB.
44
45 Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul
46
47 State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97:60-62.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legend

Figure 1. Sampling sites in the Bom Retiro Private Natural Reserve (RPPNBR), located in the city of Casimiro de Abreu, state of Rio de Janeiro.

Figure 2. The red vectors indicate the direction and proximity of the climatic variables in relation to each species studied. The greater the proximity of these vectors with the species (in blue triangle representative of the respective populations), the stronger the interaction between the two. Dir. (°) (Direction), Orv. Max (Maximum dew point), Orv. Min (Minimum dew point), Temp Min (Minimum temperature), Temp Max (Maximum temperature), Precip. (Precipitation or Rainfall), Rad. (Radiation), Raj. Ven. (Wind Gust), Vel. Ven. (Wind speed), Press. M (Maximum pressure), Press Min. (Minimum pressure), Um. Mín. (Minimum humidity), Um. Max (Maximum humidity).

Figure 3. Number of eggs collected at RPPNBR, state of Rio de Janeiro, Brazil, from February to October 2016, and rainfall in mm (INMET).

Figure 4. Assessment of the significant differences among the collected sites (Site 1, Site 2, Site 3, Site 4 A, Site 4 B, and Site 5).

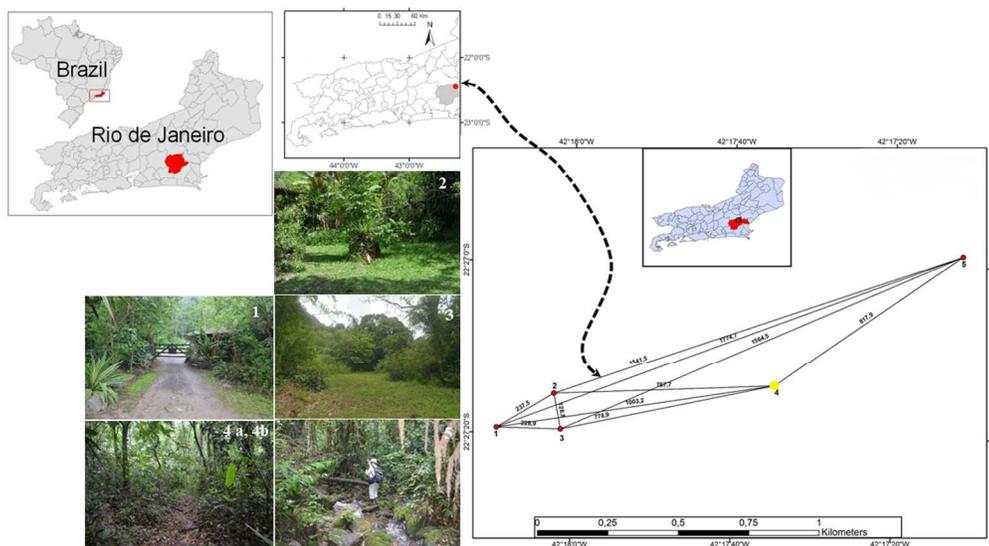


Figure 1. Sampling sites in the Bom Retiro Private Natural Reserve (RPPNBR), located in the city of Casimiro de Abreu, state of Rio de Janeiro.

338x190mm (96 x 96 DPI)

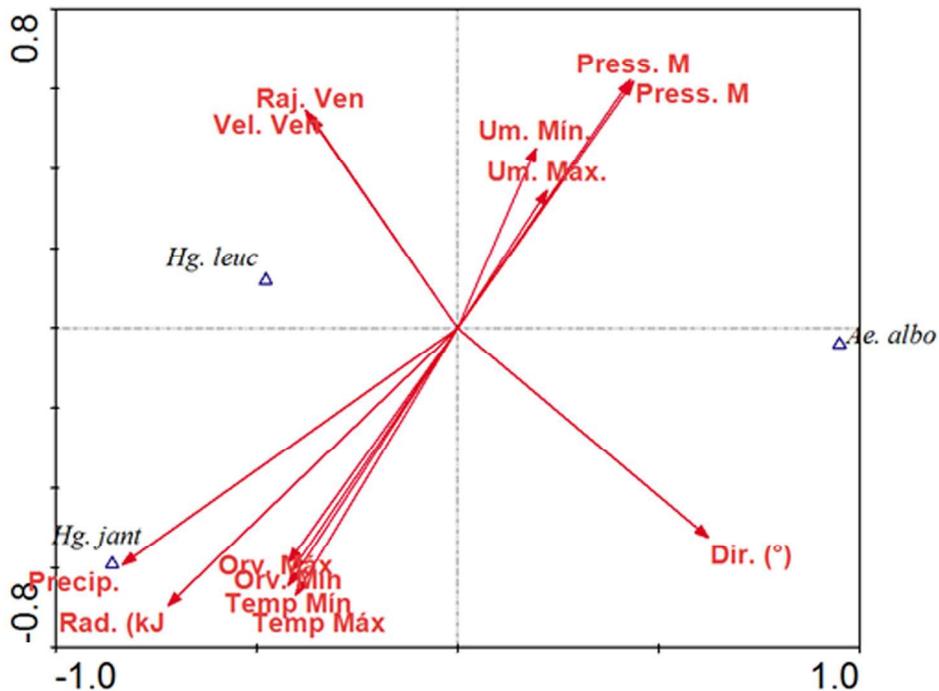


Figure 2. The red vectors indicate the direction and proximity of the climatic variables in relation to each species studied. The greater the proximity of these vectors with the species (in blue triangle representative of the respective populations), the stronger the interaction between the two. Dir. (°) (Direction), Orv. Max (Maximum dew point), Orv. Min (Minimum dew point), Temp Min (Minimum temperature), Temp Max (Maximum temperature), Precip. (Precipitation or Rainfall), Rad. (Radiation), Raj. Ven. (Wind Gust), Vel. Ven. (Wind speed), Press. M (Maximum pressure), Press Min. (Minimum pressure), Um. Mín. (Minimum humidity), Um. Max (Maximum humidity).

143x111mm (300 x 300 DPI)

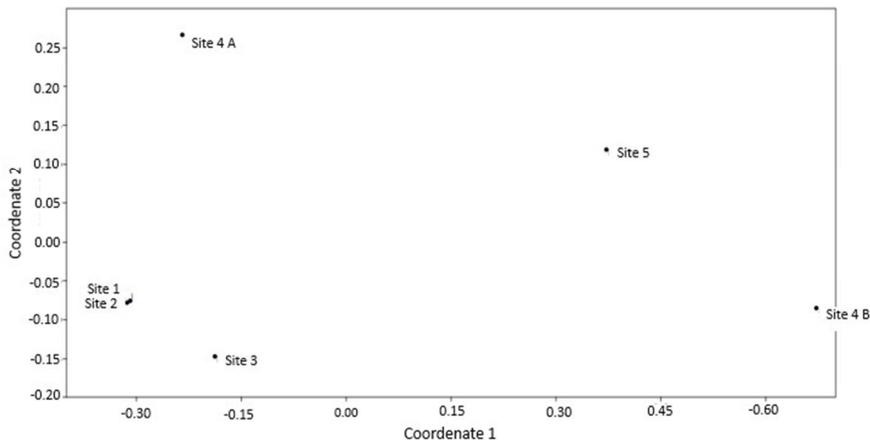


Figure 3. Number of eggs collected at RPPNBR, state of Rio de Janeiro, Brazil, from February to October 2016, and rainfall in mm (INMET).

216x116mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

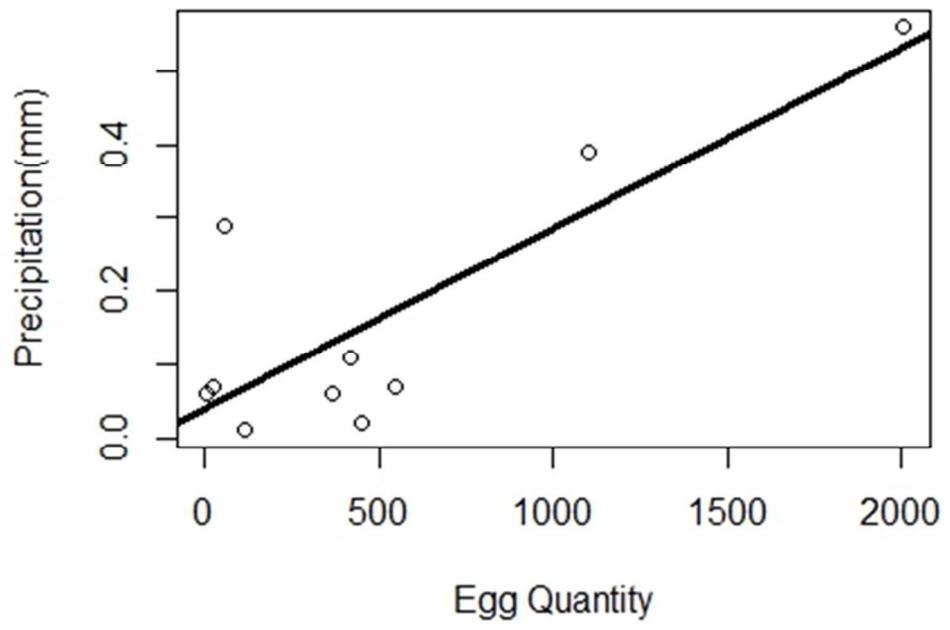


Figure 4. Assessment of the significant differences among the collected sites (Site 1, Site 2, Site 3, Site 4 A, Site 4 B, and Site 5).

105x70mm (300 x 300 DPI)

Not for Distribution

Table 1. The percentage and the number of species collected from each of the collection points located in Bom Retiro Private Natural Reserve, state of Rio de Janeiro, Brazil, from October 2015 to October 2016.

Species	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4 A	Site 4 B	Site 5	Total	%
<i>Hg. janthinomys</i>	0	0	0	1	5	57	63	5.22%
<i>Hg. leucocelaenus</i>	2	0	0	137	633	220	992	82.26%
<i>Ae. albopictus</i>	44	55	3	0	1	0	103	8.54%
<i>Ae. aegypti</i>	0	0	0	0	42	0	42	3.48%
<i>Cx. iridescens</i>	0	0	0	0	4	0	4	0.33%
<i>Li. duhamii</i>	0	0	0	2	0	0	2	0.17%
Total	46	55	3	140	685	277	1206	100%

Table 2. Relative abundance and percentage of mosquito species collected using oviposition traps at the Bom Retiro Private Natural Reserve, state of Rio de Janeiro, Brazil, from October 2015 to October 2016.

		RPPNBR / Number of species per month						
Species		<i>Ae. albopictus</i>	<i>Ae. aegypti</i>	<i>Hg. leucocelaenus</i>	<i>Hg. janthinomys</i>	<i>Cx. iridescens</i>	<i>L. durhamii</i>	TOTAL
Period								
2015	Oct	42	42	67	4	0	0	155
	%	3.48%	3.48%	5.56%	0.33%	0.00%	0.00%	10.55%
	Nov	54	0	82	2	4	0	142
	%	4.48%	0.00%	6.80%	0.17%	0.33%	0	11.77%
	Dec	6	0	219	2	0	0	227
	%	0.50%	0.00%	18.16%	0.17%	0.00%	0.00%	18.82%
2016	Feb	0	0	132	41	0	0	173
	%	0.00%	0.00%	10.95%	3.40%	0.00%	0.00%	14.34%
	Mar	0	0	14	0	0	0	15
	%	0.00%	0.00%	1.16%	0.00%	0.00%	0.00%	1.24%
	Apr	9	0	22	0	0	0	31
	%	0.75%	0.00%	1.82%	0.00%	0.00%	0.00%	2.57%
	May	0	0	0	0	0	0	0
	%	0%	0%	0%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	June	19	0	0	0	0	0	19
	%	1.58%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.58%
	July	0	0	0	0	0	0	0
	%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	Aug	0	0	9	0	0	0	9
	%	0.00%	0.00%	0.75%	0.00%	0.00%	0.00%	0.75%
	Set	0	0	26	1	0	0	26
	%	0.00%	0.00%	2.16%	0.08%	0.00%	0.00%	2.16%
	Oct	0	0	31	1	0	0	31
	%	0.00%	0.00%	2.57%	0.08%	0.00%	0.00%	2.57%
	Nov	25	0	333	18	0	0	376
	%	2.07%	0.00%	27.61%	1.49%	0.00%	0.00%	31.18%
Dec	0	0	0	0	0	0	0	
%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	
Total		155	42	935	70	4	0	1206
%		1.85%	3.48%	77.53%	5.80%	0.33%	0.00%	100.00%

Table 3. Number of hatched eggs, non-hatched eggs, and the total number of hatched and unhatched eggs collected from October 2015 to November 2016 at the Bom Retiro Private Natural Reserve, state of Rio de Janeiro, Brazil.

Months / Years	Hatched Eggs	Non-hatched eggs	Total
October/2015	36	408	444
November/2015	73	492	565
December/2015	105	998	1103
February/2016	818	1184	2002
March/2016	14	43	57
April /2016	81	281	362
May/2016	0	1	1
June/2016	0	21	21
July /2016	69	42	111
August/2016	168	283	451
September/2016	280	268	548
October/2016	117	302	419
November/16	238	864	1102
Total	1999	5187	7186

Table 4. Number of eggs collected at the Bom Retiro Private Natural Reserve, state of Rio de Janeiro from February to October 2016, and rainfall in mm according to the data from the National Institute of Meteorology (INMET).

Months	Eggs	Rainfall (mm)
February /16	2002	0.56
March /16	57	0.29
April /16	362	0.06
May/16	1	0.06
June /16	21	0.07
July /16	111	0.01
August /16	451	0.02
September /16	548	0.07
October /16	419	0.11
November /16	1102	0.39



Morphological differentiation between seven Brazilian populations of *Haemagogus capricornii* and *Hg. janthinomys* (Diptera: Culicidae) detected by geometric morphometry of the wings

Journal:	<i>Medical and Veterinary Entomology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Shayenne ; Oswaldo Cruz Fundation Carbajas de la Fuente, Ana Laura; Laboratorio de Eco-Epidemiología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Mello, Cecilia; Oswaldo Cruz Fundation, Alencar, Jeronimo; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Diptera
Category:	Veterinary
Abstract:	<p>Currently, <i>Haemagogus capricornii</i> and <i>Haemagogus janthinomys</i> females are considered morphologically indistinguishable. As these species are distinguished based on characteristics of the male genitalia, the collection of male specimens is traditionally indispensable. This study aimed to analyze the morphometric variability between Brazilian populations of <i>Hg. capricornii</i> and <i>Hg. janthinomys</i> through the geometric morphometry of the wings. A total of 108 female wings belonging to <i>Hg. capricornii</i> (n = 31) and <i>Hg. janthinomys</i> (n = 77) from Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, and Alagoas states, were used. Size and shape of wings were estimated using centroid size and Procrustes generalized analysis. Comparisons to interspecific level showed that the centroid size of <i>Hg. capricornii</i> was significantly smaller than in <i>Hg. janthinomys</i> and the shape variables also showed significant differences. Comparisons to the intraspecific level showed that the centroid size of all populations of <i>Hg. janthinomys</i> was significantly different and no differences were found between <i>Hg. capricornii</i>. The shape variables showed significant differences between some populations. Additionally, a geographic cline among the most distant populations was observed. At inter- and intraspecific levels, our results showed that females of <i>Hg. capricornii</i> and <i>Hg. janthinomys</i> were correctly identified by geometric morphometry.</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

1
2
3 **Morphological differentiation between seven Brazilian populations of**
4 ***Haemagogus capricornii* and *Hg. janthinomys* (Diptera: Culicidae) detected by**
5 **geometric morphometry of the wings**
6
7
8
9

10 **Shayenne Olsson Freitas Silva^{1,2,*}, Ana Laura Carbajal de la Fuente^{3,*}, Cecilia Ferreira de**
11 **Mello^{1,4}, Jeronimo Alencar¹**
12
13
14

15 ¹ Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil, N° 4365 Manguinhos Rio de
16 Janeiro, 21040-900 RJ Brazil.
17
18

19 ² Interdisciplinary Laboratory of Entomological Surveillance in Diptera and Hemiptera
20 (LIVEDIH/IOC-Fiocruz), Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil, N° 4365 Manguinhos,
21 Rio de Janeiro, 21040-900 RJ Brazil.
22
23

24 ³ CONICET - Buenos Aires' University. Institute of Ecology, Genetics and Evolution
25 (IEGEB), Eco-Epidemiology Laboratory. Buenos Aires, Argentina.
26
27

28 ⁴ Federal Rural University of Rio de Janeiro, Institute of Biology, Graduate Program in
29 Animal Biology, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.
30
31

32 * Authors with equal contributions.
33
34

35 Correspondence: Jeronimo Alencar, Laboratório de Diptera, Instituto Oswaldo Cruz,
36 Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP
37 21040-360, Brazil. Tel.: +55-21-25621238; Fax: +55-21-25621284; E-mail:
38 jalencar@ioc.fiocruz.br
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 **Abstract:** Currently, *Haemagogus capricornii* and *Haemagogus janthinomys* females
6 are considered morphologically indistinguishable. As these species are distinguished
7 based on characteristics of the male genitalia, the collection of male specimens is
8 traditionally indispensable. This study aimed to analyze the morphometric variability
9 between Brazilian populations of *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys* through the
10 geometric morphometry of the wings. A total of 108 female wings belonging to *Hg.*
11 *capricornii* ($n = 31$) and *Hg. janthinomys* ($n = 77$) from Rio de Janeiro, Minas Gerais,
12 Bahia, and Alagoas states, were used. Size and shape of wings were estimated using
13 centroid size and Procrustes generalized analysis. Comparisons to interspecific level
14 showed that the centroid size of *Hg. capricornii* was significantly smaller than in *Hg.*
15 *janthinomys* and the shape variables also showed significant differences. Comparisons
16 to the intraspecific level showed that the centroid size of all populations of *Hg.*
17 *janthinomys* was significantly different and no differences were found between *Hg.*
18 *capricornii*. The shape variables showed significant differences between some
19 populations. Additionally, a geographic cline among the most distant populations was
20 observed. At inter- and intraspecific levels, our results showed that females of *Hg.*
21 *capricornii* and *Hg. janthinomys* were correctly identified by geometric morphometry.

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 **Keywords:** *Haemagogus capricornii*; *Haemagogus janthinomys*; Culicidae; geometric
42 morphometry; Brazil.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

One of the most important genera of mosquitoes capable of infecting and transmitting the wild yellow fever virus (WFV) is the *Haemagogus* Williston, 1896, considered a biological vector and responsible for maintaining the natural cycle of this zoonosis in forested areas of the Americas (Arnell, 1973). Mosquitoes of this genus are restricted to the Americas and almost all species have a Neotropical distribution, except for *Haemagogus equinus* Theobald, 1903, which can be found even in some southern parts of the Nearctic region (Forattini, 1965). These are mainly wild, diurnal, and acrodendrophic mosquitoes inhabiting primarily dense forest and gallery areas (Pinheiro *et al.*, 1978, Dégallier *et al.*, 1992, Alencar *et al.*, 2008, Alencar *et al.*, 2010, Alencar *et al.*, 2013, Alencar *et al.*, 2016 A, B).

Haemagogus presents great diversity, including 28 species of which nine are found in Brazil (Marcondes & Alencar, 2010). Some of these are epidemiologically important in the transmission of wild-type yellow fever virus (Arnell, 1973). Among the nine known vector species, five stand out for the efficiency of their transmission in Brazil: *Haemagogus albomaculatus* Theobald, 1903; *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar and Shannon, 1924); *Haemagogus spegazzini* Bréthes, 1912; *Haemagogus capricornii* Lutz, 1904, and *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921. Larvae and females of *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys* species are currently morphologically indistinguishable, their differentiation being based primarily on characteristics of the male genitalia. The identification is carried out based on the following: the presence (*Hg. Janthinomys*) or absence (*Hg. Capricornii*) of notable spiculosity on the ventral face of the edeago and the existence of a medial process, with a hooked shape, near the apex of the paraprocto in *Hg. janthinomys*. These structures are small and only distinguishable by well-trained personnel and misidentifications can be frequent.

1
2
3 Although traditional morphometry contributed to the identification of these
4 species (Alencar *et al.*, 2010), a more robust approach is necessary. Geometric
5 morphometry is a powerful, low-cost tool that addresses issues of taxonomy, ecology,
6 and morphology, particularly in insects (Adams *et al.*, 2013) and especially in the
7 family Culicidae, which possess wings. These bi-dimensional structures are eminently
8 suitable for morphometrical description (Lorenz *et al.* 2017). Geometric morphometry
9 makes it possible to identify morphological variations and to explore their causes both
10 within and between populations (Lawing and Polly, 2010). In Diptera, it has been
11 widely used to answer questions mainly related to population studies (Lorenz *et al.*,
12 2017). A recent study of *Culex* mosquitoes from the state of Rio de Janeiro showed the
13 effects of seasonal variations on phenotypic variations using this tool (Alencar *et al.*,
14 2016).

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29 Considering the difficulties in the identification of *Hg. capricornii* and *Hg.*
30 *janthinomys* females, the poor knowledge about them, the partial overlap of their
31 geographical distribution, and their eco-epidemiological importance, attention must be
32 taken in the evaluation of old reports of infection of these and similar species, especially
33 in Brazil (Marcondes and Alencar, 2010). In this context, the aim of this study was to
34 determine the phenotypic variability in *Hg. janthinomys* and *Hg. capricornii* females at
35 species and population levels, using the geometric morphometry of the wings. For this
36 purpose, we included populations of the two species that cover a large proportion of
37 their geographic distribution in Brazil.

38 **Material and Methods**

39 *Insects*

40
41
42 A total of 108 right and left wings of females belonging to *Hg. capricornii* ($n = 31$) and
43 *Hg. janthinomys* ($n = 77$) from the Brazilian states of Rio de Janeiro, Minas Gerais,
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Bahia, and Alagoas, were used in this study (Table 1). The *Haemagogus* populations
4 came from ecological and epidemiological studies developed by the Diptera Laboratory
5 team and the Entomological Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Brazil
6 and were deposited in this Institution. Species were identified through direct
7 observation of morphological characters evidenced by the optical microscope (Leica
8 DMD108®) following Arnell (1973), Forattini (2002), and Marcondes & Alencar
9 (2010). The abbreviations of generic and subgeneric names follow the proposal of
10 Reinert (2009). Once identified, the wings were extirpated and later photographed
11 following Alencar *et al.* (2016).
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 *Size and shape variables*

23
24 Fourteen type-1 landmarks (Bookstein 1991) were selected and included in the analyses
25 (Fig. 1). We used coordinate data and the isometric estimator, centroid size (CS), to
26 compare overall wing sizes among species and populations. The Mann-Whitney test
27 was applied to comparisons of CS between species and populations. The shape variables
28 (partial warps and uniform components) were obtained using the generalized Procrustes
29 analysis superimposition algorithm. Mahalanobis distances derived from the shape
30 variables were used to explore shape proximity between the species and populations.
31 Statistical significance was determined by permutation tests (1,000 runs each) and
32 corrected by the Bonferroni method.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 We represented the Mahalanobis distances between species and populations in
45 neighbor-joining (NJ) trees. The percentage of phenotypic similarity between species
46 and populations were calculated using the cross-check test of discriminant analysis.
47 Shape variables were regressed onto CS by multivariate regression analysis to detect
48 allometry. Correlation between geographic and Mahalanobis distances was examined by
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 a Mantel test (1,000 permutations) using straight line geographic distances between
4 collection sites following Rosenberg & Anderson (2011).
5

6
7 The geometric coordinates of each landmark were digitalized using the program
8 tpsDig version 2.09 (available at <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>).
9
10 Centroid size, generalized Procrustes analysis, Mahalanobis distances, permutation test,
11 and allometry were performed using the modules VAR, MOG, PAD, and COV
12 respectively, included in the CLIC98 package (available at www.mome-clic.com).
13
14 Correlation between geographic and Mahalanobis distances were determined by Mantel
15 tests using the PASSaGE 2 software (available at www.passagesoftware.net/).
16
17
18
19
20
21

22 **Results**

23 *Interspecific comparison*

24 For size variable, the Mann-Whitney test revealed that the centroid size of *Hg.*
25 *capricornii* was significantly lower ($P < 0.0001$) than in *Hg. janthinomys* (Fig. 2 a). The
26 permutation test based on the Mahalanobis distances, revealed significant differences
27 for shape variables between the two species ($P < 0.0001$). The "cross-checked
28 classification" of *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys* individuals showed that 81% and
29 67% respectively of all specimens were correctly assigned.
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 *Intraspecific Comparison*

40 For size variable, the Mann-Whitney test revealed that all populations of *Hg.*
41 *janthinomys* were significantly different (Fig. 2 b). However, the analysis between
42 populations of *Hg. capricornii* showed no significant differences ($P > 0.06$). The
43 permutation test based on the Mahalanobis distances revealed significant differences for
44 shape variables among some populations (Table 2). The contribution of the canonical
45 factors resulted from 38%, 26%, and 15% for the first, second and third factors
46 respectively. A "cross-checked classification" in individuals of the seven populations of
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys*, showed acceptable and heterogeneous
4 reclassification scores. *Hg. capricornii* populations showed low reclassification scores
5 (30-42%). Although very heterogeneous, populations of *Hg. janthinomys* had better
6 reclassification scores, from low (22% Bahía), medium (42% Rio de Janeiro) to high
7 (77% Atalaia, Rio de Janeiro). The NJ tree based on the distances of Mahalanobis,
8 showed that the two populations of *Hg. capricornii* (Hgc_RJ, Hgc_Man) were the most
9 similar, followed by the *Hg. janthinomys* (Hgj_RJ) population, and distinct from the
10 population of Campina Verde (Hgj_CaV) (Fig. 3). Conversely, the NJ tree shows the
11 *Hg. janthinomys* populations (Hgj_Atalaia, Hgj_Jac), are different from the Bahia
12 population (Hgj_BA). The Mantel test revealed a positive and significant association
13 between the geographic distances and distances of Mahalanobis ($r = 0.467$; $P < 0.013$).
14 A multivariate regression analysis of shape variables on size variable showed no
15 significant effect (test after 1000 permutations, $P = 0.110$).

31 Discussion

32
33 Our results based on geometric morphometry of wings from *Hg. capricornii* and
34 *Hg. janthinomys*, indicates that both the size and shape variables can differentiate to the
35 interspecific level. However, to the intraspecific level the results show a relative
36 differentiation. The two populations of *Hg. capricornii* show a smaller centroid size
37 with no significant differences between them, whereas the centroid sizes of all *Hg.*
38 *janthinomys* populations showed significant differences. The shape variables were able
39 to separate the two *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys* populations, except for the two
40 originating in Bahia, which were not statistically different.

41
42 The importance of taxonomy in the biological sciences is undeniable. Currently,
43 effective mapping of biodiversity should focus on limited groups so that more complete
44 research can be carried out effectively. Our results are congruent with the hypothesis
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 that suggests that *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys* may constitute a complex of
4
5 species whose morphological differentiation is complex. To help identify these cryptic
6
7 species and to study the relationship between them, new tools, such as molecular
8
9 biology and biochemistry Forattini (1996), have been used in addition to morphological
10
11 characters such as classical morphology, scanning electron microscopy, and
12
13 morphometry.
14

15
16 Modern molecular tools are available to discriminate between sister species
17
18 living in sympatry (Matson *et al.*, 2008; Ruiz-López *et al.*, 2013, Jaramillo *et al.*, 2015).
19
20 However, they are expensive to use and require specialized training (Jaramillo *et al.*,
21
22 2015). Geometric morphometrics may not reach the level of molecular accuracy, but the
23
24 present findings show that it can be highly informative. The technique is fast and
25
26 affordable. With minimal training, it can be used to solve ecological or taxonomic
27
28 questions (Lorenz *et al.*, 2017). This study demonstrates that geometric morphometry
29
30 can discriminate with considerable success *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys*
31
32 females that cannot be identified by traditional morphological criteria.
33
34

35
36 Although the centroid size is not a good indicator to use in species identification
37
38 because it is affected by environmental factors (Gómez *et al.*, 2014), our results show
39
40 that the size variable was able to differentiate between the two species. Already the
41
42 conformation is a reasonably good feature to solve problems of identification, and is
43
44 merely affected by the environmental factors (Marcus *et al.*, 1996; Zelditch *et al.*,
45
46 2004). Our study was able to differentiate between the two species and additionally
47
48 some populations. The correlation analysis between the centroid size and the shape
49
50 variables for *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys* did not show a common allometric
51
52 slope. The association between the shape of the kites and the geographic distance
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 between the populations suggests that the morphological variation could fit a distance
4
5 isolation model.

6
7 Our study had some limitations. The results were obtained from a limited
8
9 number of individuals and were especially more abundant for populations of *Hg.*
10
11 *capricornii*. This type of problem is frequent in works that present data that involve
12
13 field collections.

14
15 Our result supports the use of geometric morphometry in the morphological
16
17 discrimination of *Hg. capricornii* and *Hg. janthinomys* females. Proper identification of
18
19 species is the fundamental basis for building knowledge on biodiversity, ecology and
20
21 other areas of biology. Failures in species identification may lead to the diffusion and
22
23 amplification of conceptual and methodological errors in other areas, with implications
24
25 not only for our knowledge of nature, but also for ecosystem structure functioning,
26
27 management decisions, and human health vector control programs (Bortolus, 2008).
28
29 Additionally, the correct identification of species using geometric morphometry could
30
31 contribute to improve vector control strategies.
32
33
34
35
36
37

38 **Acknowledgements:**

39
40 This work was supported by the Foundation for Research Support of the State of
41
42 Rio de Janeiro (FAPERJ; grant numbers 26/010.001630/2014, E-26/202.819/2015).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- Adams, D.C., Rohlf, F.J. & Slice, D.E. (2013) A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix* **24**:7–14.
- Alencar, J., Dégallier, N., Hannart, A., Silva, J.S., Pacheco, J.B. & Guimarães, A.É. (2008) Circadian and seasonal preferences for hematophagy among *Haemagogus capricornii*, *Hg. janthinomys*, and *Hg. leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *Journal of Vector Ecology* **33**, 389–392,.
- Alencar, J., Serra-Freire, N.M., Marcondes, C.B., Silva, J.S., Correa, F.F. & Guimarães, A.É. (2010) Influence of climatic factors on the population dynamics of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), a vector of sylvatic yellow fever. *Entomological News* **121**, 45-52,
- Alencar, J., Morone, F., De Mello, C.F., Dégallier, N., Lucio, P.S., Serra-Freire, N.M. & Guimarães, A.É. (2013) Flight height preference for oviposition of mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of sylvatic yellow fever virus near the hydroelectric reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Medical Entomology* **50**: 791–795,
- Alencar J., de Mello, C.F., Gil-Santana, H.R., da Silva C.S., Sarmiento J.S., de La Fuente, A.L. (2016) Phenotypical plasticity in response to seasonal variation in populations of *Culex* (Melanoconion) *bastagarius*. *Journal of the American Mosquito Control Association* **32(4)**: 333–336.
- Alencar, J., Mello, C.F., Gil-Santana, H.R., Guimarães, A.É., Almeida, S.A.S. & Gleiser, R.G. (2016) Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology* **41**: 18–26,.
- Arnell JH. (1973) Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contributions of the American Entomological Institute* **10**:1–174.
- Bookstein, F.L. (1991) Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 198.

- 1
2
3 Bortolus, A. (2008) Error cascades in the biological sciences: the unwanted
4 consequences of using bad taxonomy in ecology. *AMBIO* **37**(2):114–118.
5
6
7 Dégallier, N. (1992) A comparative study of yellow fever in Africa and America South.
8 *Ciência e Cultura* **44**: 143–151,
9
10 Forattini, O.P. (1965) Medical Entomology. University of Public Health and Hygiene,
11 São Paulo, Brasil.
12
13 Forattini, O. P. (1996) Medical Culicidology. São Paulo: University of São Paulo
14 Publisher, São Paulo, Brasil.
15
16 Forattini, O.P. (2002) Medical Culicidology, 2° Volume: Identification, Biology,
17 Epidemiology. University of São Paulo Publisher, São Paulo, Brasil.
18
19
20
21
22 Gómez, G.F., Márquez, E.J., Gutiérrez, L.A., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2014)
23 Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera:
24 Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and
25 presence of a metapopulation. *Acta Tropica* **135**: 75–85.
26
27
28
29 Jaramillo-O, N., Dujardin, J.P., Calle-Londoño, D., Fonseca-González, I. (2015)
30 Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species
31 of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) mosquitoes. *Med Vet Entomol* **29**: 26–36.
32
33 pmid:25393150.
34
35
36
37 Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P. & Slice, D.E. (eds) (1996) Advances in
38 morphometrics. Proceedings of the 1993 NATO-ASI on Morphometrics. Plenum
39 Press, New York, NY.
40
41
42 Matson, R., Rios, C.T., Chavez, C.B., Gilman, R.H., Florin, D., Sifuentes, V.L., Greffa,
43 R.C., Yori, P.P., Fernandez, R., Portocarrero D.V., Vinetz, J.M., Kosek, M.
44 (2008) Improved molecular technique for the differentiation of neotropical
45 anopheline species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **78**:
46 492–498.
47
48
49
50 Lawing, A.M. & Polly, P.D. (2010) Geometric morphometrics: recent applications to
51 the study of evolution and development. *Journal of Zoology*. **280**(1): 1–7.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Lorenz, C., Almeida, F., Almeida-Lopes, F., Louise, C., Pereira, S. N., Petersen, V. &
4 Suesdek, L. (2017) Geometric morphometrics in mosquitoes: what has been
5 measured?. *Infection, Genetics and Evolution* **54**: 205–215.
6
7
8 Marcondes, C.B. (2010) Alencar, J. Revision of *Haemagogus* mosquitoes Williston
9 (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Rev Biomed* **21**: 221–238.
10
11
12 Pinheiro, F.P., Travassos da Rosa, A.P.A., Moraes, M.A.P., Nero, J.C.A., Camargo, S.
13 & Filgueiras, F.P. (1978) An epidemic of yellow fever in central Brazil, 1972-
14 1973. I. Epidemiological studies. *American Journal of Tropical Medicine and*
15 *Hygiene* **27**: 125–132.
16
17
18
19 Reinert, J.F. (2009) List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in Family
20 Culicidae (Diptera). *European Mosquito Bulletin* **27**: 68–76,
21
22
23 Rosenberg, M. S. & Anderson, C. D. (2011) PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial
24 Statistics and Geographic Exegesis. Version 2. *Methods in Ecology and*
25 *Evolution* **2**: 229–232. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00081.x
26
27
28
29 Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R.C., Ponsonby, D.J., Herrera, M., Sallum, M.A., Velez,
30 I.D., Quiñones, M.L, Flores-Mendoza, C., Chadee, D.D., Alarcon, J., Alarcon-
31 Ormasa, J., Linton, Y.M. (2013) Systematics of the Oswaldoi complex
32 (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) in South America. *Parasites & Vectors* **6**: 324.
33
34
35
36 Zelditch, M.L., Swiderski, D.L. & Sheets, H.D. (2004) Geometric morphometrics for
37 biologists: A Primer. Elsevier Academic Press, London and New York, NY.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1 Geographical location, coordinates, altitude, origin, and number of wigs ($N = 108$) of the sampled females of *Haemagogus janthinomys* and *Hg. capricornii* populations from Brazil.

Species	Locality/ State	Population code	Wings (N)	Latitude	Longitude	Altitude (m)
<i>Hg. janthinomys</i>	Atalaia/ Alagoas	Hgj_Atá	9	-9.538056	-36.132778	54
	Jacarandá/ Bahía	Hgj_Jac	27	-15.863056	-38.882778	8
	Canavieiras/ Bahía	Hgj_BA	4	-15.675000	-38.947222	4
	Campina Verde/ Minas Gerais	Hgj_Cav	18	-19.538611	-49.486389	494
	Duque de Caxias/ Rio de Janeiro	Hgj_RJ	19	-22.785556	-43.311667	19
<i>Hg. capricornii</i>	Duque de Caxias/ Rio de Janeiro	Hgc_RJ	10	-22.578611	-43.314722	24
	Mangari/ Minas Gerais	Hgc_Man	21	-18.587222	-46.514444	950

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Table 2 Mahalanobis distances in wings of females of *Haemagogus janthinomys* and *Hg. capricornii* from four states of Brazil.

Species	Code	Mahalanobis distances						
		Hgj_Ata	Hgj_Jac	Hgj_BA	Hgj_CaV	Hgj_RJ	Hgc_RJ	Hgc_Man
<i>Haemagogus janthinomys</i>	Hgj_Ata	0.00						
	Hgj_Jac	3.60*	0.00					
	Hgj_BA	5.02	3.30	0.00				
	Hgj_CaV	5.41*	3.74*	4.38	0.00			
	Hgj_RJ	4.54*	1.89	3.54	3.73*	0.00		
<i>Haemagogus capricornii</i>	Hgc_RJ	5.32*	3.86*	4.20	5.44*	3.57*	0.00	
	Hgc_Man	4.55*	2.48*	3.70	4.17*	2.32	3.62*	0.00

Hgj_Ata = Atalaia/ Alagoas; Hgj_Jac = Jacarandá/ Bahía; Hgj_BA = Canavieiras/ Bahía; Hgj_CaV = Campina Verde/ Minas Gerais; Hgj_RJ = Duque de Caxias/ Rio de Janeiro; Hgc_RJ = Duque de Caxias/ Rio de Janeiro; Hgc_Man= Mangarí/ Minas Gerais. *Distances were significant at $P < 0.0033$ after Bonferroni correction.

Figure Legends

Figure 1: Digitalized landmarks on wings of female *Haemagogus capricornii* and *Hg. janthinomys* from Brazil.

Figure 2: Variations in centroid size among species (A) and populations (B) of *Haemagogus capricornii* (Hgc) and *Hg. janthinomys* (Hgj). The boxplots show the medians of groups as a horizontal line. The box ends represent the 25 and 75 percentiles; percentiles 10 and 90 are shown as lines out with the ends of each box. The dotted line denotes the grand mean. CS = centroid size; Sp/ Loc = Species/ Locality; populations as in Table1.

Figure 3: Neighbor-joining trees derived from Mahalanobis distances of shape variables of *Haemagogus capricornii* and *Hg. janthinomys* females, from Brazil. populations as in Table1.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

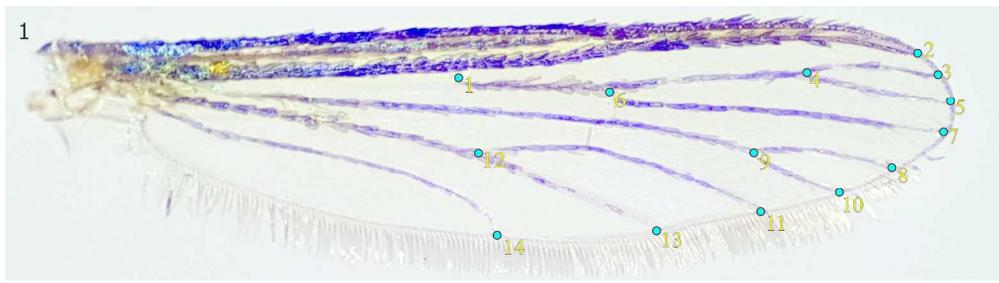


Figure 1: Digitalized landmarks on wings of female *Haemagogus capricornii* and *Hg. janthinomys* from Brazil.

191x52mm (300 x 300 DPI)

For Review Only

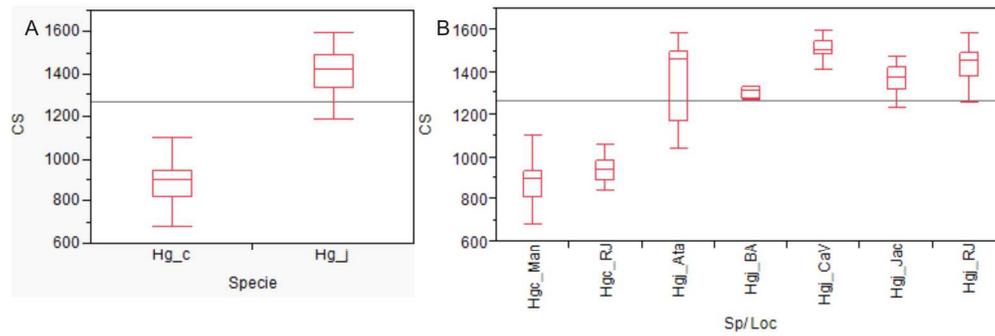


Figure 2: Variations in centroid size among species (A) and populations (B) of *Haemagogus capricornii* (*Hgc*) and *Hg. janthinomys* (*Hgj*). The boxplots show the medians of groups as a horizontal line. The box ends represent the 25 and 75 percentiles; percentiles 10 and 90 are shown as lines out with the ends of each box. The dotted line denotes the grand mean. CS = centroid size; Sp/ Loc = Species/ Locality; populations as in Table1.

202x68mm (300 x 300 DPI)

Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

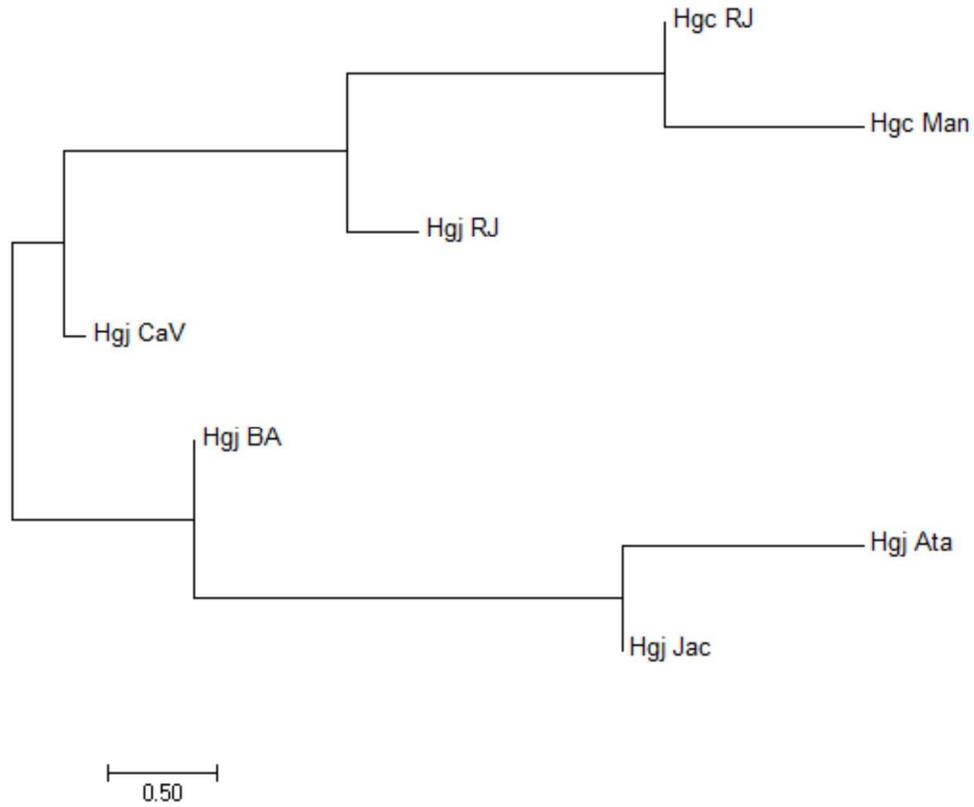


Figure 3: Neighbor-joining trees derived from Mahalanobis distances of shape variables of *Haemagogus capricornii* and *Hg. janthinomys* females, from Brazil. populations as in Table1.

150x131mm (300 x 300 DPI)

