

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

MÔNICA MARIA CRESPO COSTA

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA CAPACIDADE VETORIAL PARA  
ARBOVÍRUS EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus*

Recife

2021

MÔNICA MARIA CRESPO COSTA

AValiação de parâmetros da capacidade vetorial para arbovírus  
em populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Tese apresentada ao Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientadoras: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Dra. Duschinka Ribeiro Duarte Guedes

Recife

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães**

---

C837a Costa, Mônica Maria Crespo.  
Avaliação de parâmetros da capacidade vetorial para arbovírus em populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*/ Mônica Maria Crespo Costa– Recife: [s. n.], 2021.  
158 p.: il.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres; Coorientadoras: Cláudia Maria Fontes de Oliveira, Duschinka Ribeiro Duarte Guedes.

1. Culicidae. 2. Fecundidade. 3. Fertilidade. 4. Longevidade. 5. Repelentes de insetos. 6. Vírus Zika. 7. Vírus Chikungunya. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Oliveira, Cláudia Maria Fontes de. III. Guedes, Duschinka Ribeiro Duarte. IV. Título.

CDU 595.7

---

MÔNICA MARIA CRESPO COSTA

AValiação de parâmetros da capacidade vetorial para arbovírus  
em populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Tese apresentada ao Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências.

Aprovada em: 25/05/2021

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Elaine Christine de Souza Gomes (Membro externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. António Paulo Gouveia de Almeida (Membro externo)  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa

---

Dra. Zulma Maria de Medeiros (Membro interno)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Membro interno)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes (Orientadora)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

A meus pais, Valdomiro Pessoa Costa (*in memoriam*) e Joene Clere Crespo.

A minha querida avó, Maria Dolores Crespo (*in memoriam*).

A meu padrinho, padre Paulo Crespo (*in memoriam*) e a minha família, João Carlos Zirpoli,

José Guilherme e Marcela Maria.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a vida, toda luz e força que me fazem seguir sempre.

Aos meus pais, Valdomiro (*in memoriam*) e Joene Clere, a firmeza com que me ensinaram a caminhar, as lições de responsabilidade, honestidade e humildade, e o amor dedicado.

Aos meus filhos, José Guilherme e Marcela Maria, meus amores, o apoio, a paciência, compreensão nos muitos momentos de ausência; agradeço, também, fazerem parte de minha vida.

Ao meu esposo, João Carlos, o incentivo e a preciosa ajuda na sistematização do banco de dados. Agradeço, especialmente, estar sempre ao meu lado, o amor e incansável cuidado.

Às minhas irmãs amigas, Simone, Andréa, Joene, e toda a querida família Crespo Costa, o crescimento compartilhado, o incentivo e a disponibilidade de sempre.

À amiga Jacilene Severina, a paciência e dedicação à minha família nos momentos que precisei estar ausente.

À minha orientadora, Dra. Constância Ayres, a orientação, confiança e oportunidade. Acrescento a autonomia dada e os ensinamentos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Às coorientadoras, Cláudia Oliveira e Duschinka Guedes, todo o apoio, o incentivo e orientação; também muito contribuíram para a realização deste estudo.

À Dra. Maria Helena Neves, ao Dr. Simão Vasconcelos e Dr. Danilo Carvalho, as contribuições na banca da qualificação desta Tese.

À Dra. Maria Alice e ao Dr. Marcelo Paiva, as relevantes contribuições durante a estruturação do desenho experimental deste trabalho.

À Dra. Mariana Sobral e Dra. Elisama Helvécio, agradeço a orientação nas etapas de biologia molecular, a colaboração no processamento das amostras e em diversas outras etapas do processo de doutoramento, o importante incentivo e a disponibilidade.

Ao doutorando Gabriel Faierstejn, à Dra. Rosângela Barbosa, ao Dr. Walter Leal e demais colaboradores, a colaboração na produção do artigo sobre suscetibilidade a repelentes, parte deste estudo.

À Dra. Eloina Santos, as contribuições no planejamento estatístico deste estudo e o incentivo.

Às doutorandas Ms Larissa Krokovsky e Ms Laís Ceschini, e à técnica Ms Andréa Neves, o apoio nas atividades de laboratório.

À Secretaria de Saúde do Recife, em especial, à Ms Vânia Nunes, do Centro de Vigilância Ambiental, e aos agentes de saúde ambiental, todo apoio na identificação e localização dos pontos de coleta do material de campo.

Ao Dr. André Sá e ao Dr. Tiago Lapa, IAM/FIOCRUZ-PE, a contribuição para a definição das áreas de coleta das amostras de campo.

A Gilvan Mariano, IAM/FIOCRUZ-PE, e Gabriela Muniz, a contribuição para qualidade das figuras da Tese.

Ao colaborador Rafael Alves, a valiosa contribuição nos longos períodos de infectório, as coletas e o estabelecimento das colônias de campo, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Ms Carlos Mendonça, a contribuição nas atividades de infectório, com sua habilidade para triagem de mosquitos, fator que muito ajudou durante os primeiros experimentos.

À Dra. Ana Paula de Araújo, o grande incentivo, a disponibilidade para dividir comigo as atividades da Gerência da qualidade do Serviço de Referência e a valiosa contribuição para o estabelecimento das colônias de campo.

À Maria da Conceição da Silva, o apoio com as populações de campo e a excelente produção das gaiolas individuais utilizadas nos experimentos.

À Ana Lúcia Teixeira, Elisângela Dias, Duschinka Guedes e Roseneide Barros, a compreensão e essencial apoio nas etapas de insetário e triagem dos mosquitos para os experimentos.

À Eliane, a incansável contribuição para organização e limpeza das instalações do insetário e infectório, fundamentais para o andamento deste trabalho.

Aos demais colaboradores, Ana Célia, Helena, Jaziela, Letícia, Rosimery e Mitsué, a disponibilidade e o suporte nas diversas atividades de insetário.

Aos senhores Manoel, Ribeiro e Ironildo, da Funasa, as coletas de campo.

Ao Dr. George Diniz, a fundamental contribuição na análise e interpretação estatística dos resultados deste estudo.

À Clara Sidônia, a grande contribuição em atividades diversas, nos momentos de sufoco, sempre com muita disponibilidade.

À Maria Alves de Albuquerque, Rodrigo Brayner e Gilvan Mariano, pela revisão e impressão deste trabalho.

Aos moradores das áreas de coleta que permitiram a instalação de armadilhas em sua casa.

Aos colegas doutorandos, que dividiram comigo vários momentos de dificuldade.

A Tatiane Romão, Elisama, Eloína, Eliane, Ana Paula, Roseneide, Maria da Conceição, a força, o incentivo e a amizade durante todo o processo.

A todos e todas que fazem o Departamento de Entomologia, o convívio e aprendizado, e ao Instituto Aggeu Magalhães, todo o apoio e a infraestrutura disponibilizada.

Aos servidores e colaboradores da Secretaria Acadêmica, docentes e coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

À Banca Examinadora, as relevantes contribuições.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), o financiamento do projeto ao qual este estudo está vinculado.

COSTA, Mônica Maria Crespo. **Avaliação de parâmetros da capacidade vetorial para arbovírus em populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus***. 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## RESUMO

O Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) representam um problema de saúde pública mundial. Conhecer aspectos da capacidade vetorial de seus transmissores é importante para a definição de estratégias de controle mais eficazes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o custo biológico da exposição aos ZIKV e CHIKV em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Amostras de campo foram coletadas em Recife, Pernambuco. *Ae. aegypti* de campo (AeCamp) e de laboratório (RecLab) e *Cx. quinquefasciatus* de laboratório (CqSLab) foram expostas à alimentação sanguínea artificial com ZIKV e CHIKV. Avaliou-se fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade, atividade de repasto sanguíneo e resposta aos DEET e Picaridina. A sobrevivência de RecLab foi duas vezes menor entre os grupos expostos ao ZIKV, com relação aos não expostos, e a longevidade não foi alterada. Em AeCamp, o ZIKV não alterou a sobrevivência e longevidade das fêmeas. A fecundidade e fertilidade de RecLab não sofreu impacto pelo ZIKV, enquanto AeCamp teve a fertilidade reduzida, nos grupos expostos. Infectadas com CHIKV, fêmeas de RecLab tiveram redução na sobrevivência e longevidade. O CHIKV reduziu a fecundidade em AeCamp e a fertilidade nas duas colônias avaliadas. Em CqSLab, a exposição ao ZIKV reduziu a fecundidade e fertilidade entre os grupos expostos, mas não entre aqueles que foram expostos e desenvolveram a infecção. A atividade de repasto sanguíneo não foi alterada pelos ZIKV e CHIKV nas três colônias avaliadas. Expostas ao ZIKV, fêmeas de RecLab tiveram redução na resposta ao DEET, a 1%, mas não a 5%. Conclui-se que o ZIKV impacta diferentemente no *fitness* de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. O impacto do CHIKV em *Ae. aegypti* é maior com relação ao custo biológico das fêmeas expostas ao ZIKV. Estes resultados podem contribuir para a definição de métodos mais eficazes de controle vetorial, de modo a potencializar o custo da exposição aos vírus, aqui caracterizado pela redução na fecundidade, fertilidade e resposta ao DEET.

**Palavras-chave:** Culicidae; fecundidade; fertilidade; longevidade; repelentes de insetos; vírus Zika; vírus chikungunya.

COSTA, Mônica Maria Crespo. **Evaluation of vector capacity parameters for arboviruses in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations.** 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## ABSTRACT

Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) represent a global public health problem. Knowing aspects of the vectorial capacity of your transmitters is important for defining more effective control strategies. The objective of this work was to evaluate the biological cost of exposure to ZIKV and CHIKV in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Field samples were collected in Recife, Pernambuco. *Ae. aegypti* from field (AeCamp) and from laboratory (RecLab) and *Cx. quinquefasciatus* from laboratory (CqSLab) were exposed to artificial blood feed with ZIKV and CHIKV. Fecundity, fertility, survival, longevity, blood meal activity and response to DEET and Picaridin were evaluated. RecLab survival was twice as low among groups exposed to ZIKV, compared to non-exposed ones, and longevity was not altered. In AeCamp, ZIKV did not change female survival and longevity. The fecundity and fertility of RecLab was not impacted by ZIKV, while AeCamp had reduced fertility in the exposed groups. Infected with CHIKV, females from RecLab had reduced survival and longevity. CHIKV reduced fecundity in AeCamp and fertility in the two colonies evaluated. In CqSLab, exposure to ZIKV reduced fecundity and fertility among exposed groups, but not among those who were exposed and developed the infection. The blood repast activity was not altered by ZIKV and CHIKV in the three colonies evaluated. Exposed to ZIKV, females from RecLab had a reduced response to DEET, at 1%, but not at 5%. It is concluded that the ZIKV impacts differently on the fitness of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. The impact of CHIKV on *Ae. aegypti* is higher in relation to the biological cost of females exposed to ZIKV. These results may contribute to the definition of more effective vector control methods, in order to increase the cost of exposure to the virus, here characterized by a reduction in fertility, fertility and response to DEET.

**Keywords:** Culicidae; fecundity; fertility; longevity; insect repellents; Zika virus; chikungunya virus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição do vírus Zika, 1947-2007 .....	28
<b>Figura 2</b> – Gráfico representativo do número de casos prováveis de vírus Zika por semana epidemiológica, Brasil, 2015-2017 .....	30
<b>Figura 3</b> – Número de casos notificados de Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ), Brasil, 2015-2020.....	33
<b>Figura 4</b> – Distribuição dos genótipos do vírus chikungunya das regiões Central, Leste e Sul da África (ECSA), asiático e linhagem do Oceano Índico (IOL) entre 2004 e 2015 .....	47
<b>Figura 5</b> – Gráfico representativo do número de casos prováveis de febre chikungunya por semana epidemiológica, Brasil, 2015-2017 .....	48
<b>Figura 6</b> – Distribuição mundial de <i>Aedes aegypti</i> .....	59
<b>Figura 7</b> – Díptero, Culicídeo da espécie <i>Aedes aegypti</i> .....	60
<b>Figura 8</b> – Distribuição geográfica mundial das espécies <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Culex pipiens</i> .....	63
<b>Figura 9</b> – Díptero, culicídeo da espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	63
<b>Figura 10</b> – Larvicultura e sala de adultos do Insetário do Departamento de Entomologia, Fiocruz-PE.....	83
<b>Figura 11</b> – Alimentador artificial utilizado nas alimentações sanguíneas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	84
<b>Figura 12</b> – Capturador de Castro para captura de mosquito .....	86
<b>Figura 13</b> – Experimento para acompanhamento dos parâmetros de fecundidade, fertilidade e longevidade, após infecção pelos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .....	88
<b>Figura 14</b> – Recipientes individuais com infusão de gramínea e suportes para postura de ovos de <i>Aedes aegypti</i> após infecção por ZIKV .....	89
<b>Figura 15</b> – Ensaio de avaliação de resposta do mosquito a repelente .....	94
<b>Figura 16</b> – Curva de sobrevivência de fêmeas da espécie <i>Aedes aegypti</i> – colônia de laboratório– RecLab, ao longo de 66 dias de observação; colônia de campo - AeCamp, ao longo de 80 dias de observação, após exposição ao vírus Zika (ZIKV), e curva de sobrevivência de fêmeas de RecLab e AeCamp, em função do número de cópias de RNA do ZIKV (NC) por mL, detectadas por RT-qPCR.....	102

<b>Figura 17</b> – Carga viral (número de cópias de RNA por mL - NC) e tempo de vida das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> das colônias de laboratório e de campo após exposição ao vírus Zika (ZIKV).....	103
<b>Figura 18</b> – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão por ciclo gonadotrófico de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> – colônia de laboratório - RecLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV) .....	106
<b>Figura 19</b> – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão por ciclo gonadotrófico de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> – colônia de campo - AeCamp, após exposição ao vírus Zika (ZIKV) .....	109
<b>Figura 20</b> – Carga viral (número de cópias de RNA do ZIKV – NC, por mL, detectadas por RT-qPCR), nas colônias de <i>Aedes aegypti</i> de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, infectadas com vírus Zika (ZIKV), que completaram o repasto sanguíneo no 7º dia pós-exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais, em função do tempo de vida pós-exposição ao vírus .....	111
<b>Figura 21</b> – Curvas de sobrevivência: indivíduos da colônia de <i>Aedes aegypti</i> de laboratório – RecLab, ao longo de 70 dias, e da colônia de campo - AeCamp, ao longo 69 dias de observação, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV).....	113
<b>Figura 22</b> – Carga viral (número de cópias de RNA por mL - NC) e tempo de vida das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> da colônia de campo - AeCamp, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV) por período: até 7 dias; de 8 a 20 dias e > 21 dias .....	115
<b>Figura 23</b> – Números médio ou mediano de ovos e percentual mediano de eclosão de larvas de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> – colônia de laboratório - RecLab e colônia de campo - AeCamp, no primeiro ciclo gonadotrófico, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV) .....	117
<b>Figura 24</b> – Curva de sobrevivência de fêmeas da espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> – colônia de laboratório – CqSLab, ao longo de 70 dias de observação, após exposição ao vírus Zika (ZIKV).....	119
<b>Figura 25</b> – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão de larvas de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> – colônia de laboratório – CqSLab, no primeiro ciclo gonadotrófico após exposição ao vírus Zika (ZIKV) .....	121
<b>Figura 26</b> – Proteção induzida pelo DEET (-N,N-diethyl-3-methylbenzamide) ou Picaridina (hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato de etilo) a 1%, contra	

mosquitos *Aedes aegypti*, colônia de laboratório – RecLab, infectados e não infectados (Controle) pelo ZIKV ..... 123

**Figura 27** – Atividade de repelência provocada por DEET (-N,N-diethyl-3-methylbenzamide) a 5%, contra *Aedes aegypti*, colônia de laboratório – RecLab, no primeiro e segundo ciclos gonadotróficos e após infecção com vírus Zika (ZIKV) ..... 125

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020 .39
- Quadro 2** – Estudos sobre transmissão do CHIKV realizados no período 2007-2021 ..... 55
- Quadro 3** – Sistematização dos procedimentos metodológicos e avaliações realizadas para os vírus Zika (ZIKV) ou chikungunya (CHIKV), em experimentos com *Aedes aegypti* de laboratório (colônia RecLab) e campo (colônia AeCamp), e para espécie *Culex quinquefasciatus* ..... 79
- Quadro 4** – Primers e sondas utilizados nas reações de RT-qPCR para detecção de partículas virais dos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV)..... 92
- Quadro 5** – Custo biológico das colônias de *Aedes. aegypti* (RecLab e AeCamp) após exposição aos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), e de *Culex quinquefasciatus* após exposição ao ZIKV, incluindo os parâmetros de sobrevivência, longevidade, fecundidade, fertilidade, carga viral e atividade de repasto sanguíneo ..... 122

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Número de casos prováveis e incidência de febre pelo vírus Zika no Brasil, por região e no estado de Pernambuco, de 2015-2018 até a Semana Epidemiológica 52, de 2019 até a Semana Epidemiológica 50 e 2020 até a Semana Epidemiológica 51; Número de casos prováveis e confirmados de febre pelo vírus Zika no estado de Pernambuco, 2015 a 2019 até a semana epidemiológica 52 ..... 32
- Tabela 2** – Número de casos prováveis e incidência de febre chikungunya no Brasil, por região e no estado de Pernambuco, 2015 a 2019, até a Semana Epidemiológica 52, e 2020 até a Semana Epidemiológica 53; Número de casos prováveis e confirmados de febre pelo vírus Zika no estado de Pernambuco, 2016 a 2019, até a semana epidemiológica 52 ..... 50
- Tabela 3** – Taxa de infecção dos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), em colônias de *Aedes aegypti* de laboratório (RecLab); *Aedes aegypti* de campo (AeCamp) e *Culex quinquefasciatus* de laboratório (CqSLab) e número médio de cópias de RNA (NC) detectada por ponto de coleta (7, 14 e 21 dias pós exposição - DPE) ..... 98
- Tabela 4** – Quantidade de cópias de RNA (NC) dos vírus Zika (ZIKV), detectadas por RT-qPCR, em fêmeas das colônias de *Aedes aegypti* de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, e do vírus chikungunya (CHIKV), detectadas em fêmeas da colônia RecLab, que completaram um segundo repasto sanguíneo no 7º dia após exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais ..... 99
- Tabela 5** – Risco de morte de fêmeas da colônia de *Aedes aegypti* de laboratório – RecLab – após exposição ao vírus Zika (ZIKV) ..... 100
- Tabela 6** – Risco de morte de fêmeas da colônia de *Aedes aegypti* de campo – AeCamp – após exposição ao vírus Zika (ZIKV) ..... 100
- Tabela 7** – Risco de morte de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônia de campo – AeCamp, após exposição ao vírus Zika (ZIKV), comparando-se quantidade de cópias de RNA (NC) por mL, detectadas por RT-qPCR. Grupos:  $NC \leq 7E+09$  e  $NC > 7E+09$  ..... 103
- Tabela 8** – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão das larvas nos três primeiros ciclos gonadotróficos de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônia de laboratório - RecLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV) ..... 105

<b>Tabela 9</b> – Números médios e medianas de ovos postos e de larvas que eclodiram nos três primeiros ciclos gonadotróficos (CG) de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , colônia de campo – AeCamp, após exposição ao vírus Zika (ZIKV).....	108
<b>Tabela 10</b> – Número e percentual de fêmeas das colônias de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, que completaram o repasto sanguíneo nos 7º, 14º e 21º dias após exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais, após exposição ao vírus Zika (ZIKV).....	110
<b>Tabela 11</b> – Número e percentual de fêmeas das colônias de <i>Aedes aegypti</i> de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, infectadas com vírus Zika (ZIKV), que completaram o repasto sanguíneo no 7º dia pós-exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais, em função do número de cópias de RNA do vírus Zika (NC) por mL, detectadas por RT-qPCR .....	111
<b>Tabela 12</b> – Risco de morte de fêmeas da colônia de <i>Aedes aegypti</i> de laboratório – RecLab após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV) ao longo dos primeiros 20 dias de observação .....	112
<b>Tabela 13</b> – Risco de morte de fêmeas da colônia de <i>Aedes aegypti</i> de campo – AeCamp após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV).....	114
<b>Tabela 14</b> – Número médio e mediana de ovos postos e número médio e mediana de larvas que eclodiram nos três primeiros ciclos gonadotróficos de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> – colônias de laboratório - RecLab e campo – AeCamp, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV) .....	116
<b>Tabela 15</b> – Número e percentual de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , colônia de laboratório - RecLab que completaram o repasto sanguíneo em sangue livre de partículas virais, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV), no 7º dia pós-exposição (DPE).....	118
<b>Tabela 16</b> – Risco de morte de fêmeas da colônia de <i>Culex quinquefasciatus</i> de laboratório – CqSLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV).....	119
<b>Tabela 17</b> – Número médio e mediana de ovos postos e número médio e mediana de larvas que eclodiram no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> – colônia de laboratório – CqSLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV) .....	120
<b>Tabela 18</b> – Número e percentual de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> , colônia de laboratório - CqSLab que completaram o repasto sanguíneo em sangue livre	

de partículas virais, após exposição ao vírus Zika (ZIKV), no 7º dia pós-  
infecção (DPE) ..... 121

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
AeCamp	<i>Ae. aegypti</i> de campo
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CG-EM	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
PrC	Proteína do capsídeo do vírus Zika
C	Controle
CG	Ciclos gonadotróficos
CO	Dióxido de carbono
CqSLab	<i>Culex quinquefasciatus</i> de laboratório
<i>Ct</i>	<i>Cycle Threshold</i>
CV	Capacidade vetorial
Cx.	<i>Culex</i>
DEET	N,N-dietil-3-metilbenzamida
DENV	<i>Dengue virus</i> - Vírus Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Dia após a alimentação
DPE	Dia pós-exposição
PrE	Proteína do envelope do vírus Zika
E	Expostos não infectados
ECSA	Genótipo do vírus chikungunya das regiões Central, Leste e Sul da África
EI	Expostos infectados
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional
FIOCRUZ-PE	Fundação Oswaldo Cruz em Pernambuco
FL	Filariose linfática
FN	Fernando de Noronha
FNO	Febre do Nilo Ocidental
GENBANK	Banco de Dados (de sequências de DNA)
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IgG	Imunoglobulina G (IgG)
IgM	Imunoglobulina M

IOL	Linhagem do Oceano Índico
Jak-STAT	Transdutor Janus quinase-sinal e ativador de transcrição
MEM	Meio Essencial Mínimo
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MV-CHIK	Chikungunya Vaccine
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	National Institutes of Health
NLM	National Library of Medicine
n. p.	Não paginado
NS	Proteínas não estruturais do vírus Zika
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PEAa	Programa de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
PIE	Período de incubação extrínseco
PFU	<i>Plaque forming unit</i> - Unidade formadora de placa
PIACD	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PRNT	Teste por neutralização de redução de placas
PrM	Proteína pré-membrana do vírus Zika
RecLab	Colônia de Laboratório
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
<i>R<sub>0</sub></i>	Número reprodutivo básico
RPM	Rotações por minuto
RT-LAMP	Lâmpada da Reverso-Transcrição
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase via Transcrição Reversa
SCZ	Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika
SE	Semana Epidemiológica
SFB	Soro fetal bovino
SINV	<i>Sindbis vírus</i>
6MMP <sub>r</sub>	Ribosídeo 6-metilmercaptapurina
TD	Taxa de disseminação

TI	Taxa de infecção
TIM	Taxa de infecção mínima
USDA	United States Department of Agriculture
VON	Vírus do Oeste do Nilo
WEEV	Western equine encephalitis
WNV	West Nile Virus
ZIKV	<i>Zika virus</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	26
2.1	ZIKA .....	26
2.1.1	<b>Caracterização e distribuição do vírus Zika no globo</b> .....	26
2.1.2	<b>Caracterização genotípica e estrutural do vírus Zika</b> .....	33
2.1.3	<b>Diagnóstico, prevenção e tratamento da febre Zika</b> .....	35
2.1.4	<b>Transmissão do vírus Zika</b> .....	37
2.2	CHIKUNGUNYA .....	45
2.2.1	<b>Caracterização e distribuição do vírus chikungunya no globo</b> .....	46
2.2.2	<b>Caracterização genotípica e estrutura do vírus chikungunya</b> .....	51
2.2.3	<b>Diagnóstico, prevenção e tratamento</b> .....	52
2.2.4	<b>Transmissão do vírus chikungunya</b> .....	53
2.3	<i>Aedes aegypti</i> .....	59
2.4	<i>Culex quinquefasciatus</i> .....	62
2.5	CAPACIDADE VETORIAL .....	65
2.5.1	<b>Definição e fatores determinantes da capacidade vetorial</b> .....	66
2.5.2	<b>Desempenho biológico e interação vetor-parasito</b> .....	67
2.5.3	<b>Resposta de mosquitos a repelentes</b> .....	72
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	75
<b>4</b>	<b>PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	76
<b>5</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	77
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	78
6.1	OBJETIVO GERAL.....	78
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	78
<b>7</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	79
7.1	ÁREA DE ESTUDO .....	81
7.2	AMOSTRA DE MOSQUITOS .....	82
7.3	PROPAGAÇÃO DE VÍRUS EM CÉLULAS VERO PARA OS EXPERIMENTOS DE ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL ORAL.....	85
7.4	EXPOSIÇÃO DOS MOSQUITOS AOS ZIKV E CHIKV.....	85
7.5	AVALIAÇÃO DE CUSTO BIOLÓGICO .....	87

7.5.1	<b>Fecundidade, fertilidade, sobrevida, longevidade e atividade de repastos sanguíneos subsequentes à exposição de <i>Aedes aegypti</i> aos ZIKV e CHIKV</b> .....	88
7.5.2	<b>Fecundidade, fertilidade, sobrevida, longevidade e atividade de repastos sanguíneos subsequentes à exposição de <i>Culex quinquefasciatus</i> ao ZIKV</b> .....	89
7.6	EXTRAÇÃO DE RNA E RT-qPCR PARA DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO .....	90
7.7	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE FÊMEAS DE <i>Ae. aegypti</i> AOS REPELENTE DEET – N,N-DIETIL-3-METILBENZAMIDA E PICARIDINA (HIDROXIETIL ISOBUTIL-PIPERIDINA CARBOXILATO DE ETILO), APÓS INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA .....	93
7.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	95
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	97
8.1	TAXAS DE INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DOS VÍRUS ZIKA (ZIKV) E CHIKUNGUNYA (CHIKV).....	97
8.2	AVALIAÇÃO DE CUSTO BIOLÓGICO .....	99
<b>8.2.1</b>	<b>Custo biológico da infecção com o vírus Zika (ZIKV) em <i>Ae. aegypti</i></b> .....	99
8.2.1.1	Sobrevida e Longevidade .....	99
8.2.1.2	Fecundidade e Fertilidade .....	104
8.2.1.3	Atividade de Repasto Sanguíneo.....	109
<b>8.2.2</b>	<b>Custo biológico da infecção com o vírus chikungunya (CHIKV) em <i>Ae. aegypti</i></b> .....	111
8.2.2.1	Sobrevida e Longevidade .....	112
8.2.2.2	Fecundidade e Fertilidade .....	115
8.2.2.3	Atividade de Repasto Sanguíneo.....	117
<b>8.2.3</b>	<b>Custo biológico da infecção com o vírus Zika (ZIKV) em <i>Culex quinquefasciatus</i></b> .....	118
8.2.3.1	Sobrevida e Longevidade .....	118
8.2.3.2	Fecundidade e Fertilidade .....	120
8.2.3.3	Atividade de Repasto Sanguíneo.....	121
<b>8.2.4</b>	<b>Sistematização dos resultados sobre custo biológico da exposição aos ZIKV e CHIKV</b> .....	121
8.3	RESPOSTA DE <i>Ae. aegypti</i> AOS REPELENTE DEET – N,N-DIETIL-3-METILBENZAMIDA E PICARIDINA (HIDROXIETIL ISOBUTIL-PIPERIDINA CARBOXILATO DE ETILO).....	122

<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	126
<b>10</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	136
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	137
	<b>ANEXO A – ARTIGO DE LEAL et al. (2017)</b> .....	157

## 1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças infecciosas causadas por vírus transmitidos por artrópodes, com destaque na saúde pública mundial, pelos altos índices de morbidade, envolvendo mais de 150 espécies de agentes patogênicos que causam doenças no homem. Entre esses, destacam-se os vírus da família *Flaviviridae* e *Togaviridae*, causadores da dengue, febre amarela, febre chikungunya, Zika e algumas encefalites (FIGUEIREDO, 2007; LEDERMANN et al., 2014).

Como para grande parte dessas arboviroses não existe vacina comercialmente disponível ou tratamento específico, o controle dessas enfermidades direciona-se primariamente a ações voltadas para a redução populacional dos mosquitos responsáveis pela sua transmissão. Uma vez que a ineficiência dessas ações é um dos fatores determinantes para o estabelecimento de arbovírus em um território, a fragilidade dos programas de controle dos vetores do vírus dengue (DENV) pode ter contribuído para a disseminação de novos arbovírus no Brasil, como o vírus Zika (ZIKV) em 2013 e o chikungunya (CHIKV) em 2014 (FARIA et al., 2016; FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2015).

Várias espécies do gênero *Aedes* (*Ae.*) são consideradas vetores de ZIKV (BOCCOLINI et al., 2016; DIAGNE et al., 2015; LEDERMANN et al., 2014; MCKENZIE; WILSON; ZOHDY, 2019), que é de circulação selvática, sendo mantido em ciclos de transmissão em primatas não humanos por meio de espécies de mosquitos selvagens. Em ambientes urbanos, onde ocorrem outras espécies de culicídeos antropofílicos, faz-se necessária a comprovação das espécies vetoras, considerando-se que estratégias de controle vetorial devem ser bem definidas e direcionadas a espécies-alvo (AYRES, 2016). *Culex* (*Cx.*) *quinquefasciatus*, por exemplo, é um culicídeo cosmopolita, que ocorre abundantemente em várias partes do mundo; contudo, a maior parte dos estudos sobre o seu papel na transmissão do ZIKV só surgiu em 2016 (AZAR et al., 2019; FERNANDES et al., 2016; GOMARD et al., 2020; GUEDES et al., 2017; GUO et al., 2016; HEITMAN et al., 2017; MAIN et al., 2018) no momento em que Ayres (2016) levantou a possibilidade de seu envolvimento na epidemia de Zika em Pernambuco.

O papel de *Ae. aegypti* como principal vetor do ZIKV vem sendo ressaltado em vários estudos, que relatam não terem encontrado evidências que apontem para espécies do gênero *Culex* como envolvidas no processo de transmissão (AMRAOUI et al., 2016; AZAR et al., 2019; DODSON; PUJHARI; RASGON, 2018; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2019; FERNANDES et al., 2016, 2017; GOMARD et al., 2020; KENNEY et al., 2017; RASGON; BENELLI; DODSON, 2017). Por outro lado, na China, no Brasil, nos Estados Unidos, no México e na

Tailândia, encontraram-se evidências de que *Cx. quinquefasciatus* é competente para transmitir o ZIKV (GUEDES et al., 2017; GUO et al., 2016; PHUMEE et al., 2019; SMARTT et al., 2018), sobretudo pelo fato inédito de espécimes de *Cx. quinquefasciatus* terem sido encontrados naturalmente infectadas pelo vírus no município do Recife, Pernambuco, Brasil (GUEDES et al., 2017).

Com relação à febre chikungunya, as epidemias têm causado impacto econômico em vários países (MORRISON, 2014). Diferentemente de infecções causadas por outros arbovírus, que são assintomáticas entre 75% e 95% dos casos, a chikungunya é sintomática, causando quadro de poliartrite intensa e debilitante. Manifestações neurológicas e cardíacas, destruição osteoarticular, assim como alguns óbitos, foram associados à infecção por CHIKV, e ocorrem com maior frequência em recém-nascidos, idosos e em pacientes em condição de saúde debilitada (MORRISON, 2014).

Espécies do gênero *Aedes*, especialmente, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, são apontadas como capazes e altamente eficientes na transmissão do CHIKV (AGHA et al., 2017; AMRAOUI et al., 2019; GLORIA-SORIA et al., 2020; VEGA-RÚA et al., 2014).

A espécie capaz de transmitir um arbovírus, inicialmente, permite que ocorra a infecção em suas células epiteliais do intestino e a replicação. Ultrapassada essa barreira, haverá a disseminação para a hemocele e a posterior infecção das glândulas salivares (HADDAD et al., 2012; MCTIGHE; VAIDYANATHAN, 2012; SALAZAR et al., 2007). Esta denomina-se competência vetorial, que é função intrínseca da constituição genética do vector, envolvendo vários genes que regulam os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade ao patógeno (ALMEIDA, 2011; HARDY et al., 1983) e é um componente importante da capacidade vetorial (MACDONALD, 1957).

A capacidade vetorial define-se como um conjunto de características fisiológicas e comportamentais de cada espécie de mosquito que, associada às condições ambientais, pode favorecer a transmissão natural de uma doença. Trata-se de um conceito que aborda a interação do vírus com o vetor e o hospedeiro humano, a qual determina a prevalência de uma doença que pode variar no tempo e espaço. A dinâmica de transmissão também é influenciada pelo estado imunológico e pela densidade da população humana (LOUNIBOS; KRAMER, 2016). Um estudo de modelo epidemiológico apresenta aspectos quantitativos do processo de transmissão de um patógeno e ressalta a necessidade de considerar fatores biológicos peculiares da espécie de mosquito e patógeno envolvidos. Mostra, ainda, de modo proporcional, como as mudanças em qualquer um deles impactarão na incidência e prevalência da doença (MACDONALD, 1961).

Estudos apresentam modelos de risco que consideram o papel das espécies envolvidas na transmissão e quantificam o risco potencial de disseminação do ZIKV em novas regiões do globo (GARDNER; CHEN; SARKAR, 2016, 2017). Entretanto, de modo geral, as informações disponíveis sobre os aspectos da capacidade vetorial de espécies do gênero *Aedes* para transmissão do ZIKV, por exemplo, não são suficientes para compreender a dinâmica de transmissão e a distribuição geográfica do vírus, o que dificulta a definição de medidas de prevenção e controle mais eficazes (VOROU, 2016).

Análises prévias foram realizadas por nosso grupo de pesquisa para determinação da competência vetorial das colônias selecionadas para este estudo. Os resultados encontrados sugerem que as linhagens de laboratório das espécies *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* são competentes para transmitir ZIKV (GUEDES et al., 2017). Do mesmo modo, a colônia selecionada de campo, da espécie *Ae. aegypti*, mostrou-se competente para transmissão de ambos os vírus (informação verbal).<sup>1</sup>

Apesar dos avanços, o conhecimento acerca da dinâmica de transmissão de arbovírus como ZIKV e CHIKV carece de investigações, uma vez que os estudos, na maioria, até então, apenas abordam um aspecto da capacidade vetorial: a competência para transmissão (AGHA et al., 2017; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2019; GLORIA-SORIA et al., 2020; GOMARD et al., 2020; HEITMANN et al., 2017; SEVERINI et al., 2018; VEGA-RÚA et al., 2014). Assim, o presente estudo propôs-se a responder a questões referentes a parâmetros da capacidade vetorial de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, relacionados com a capacidade reprodutiva (fecundidade, fertilidade), sobrevivência, longevidade, atividade de repastos sanguíneos, resposta a repelente e sua relação com os arbovírus emergentes (ZIKV e CHIKV), que podem repercutir na epidemiologia das arboviroses que causam ao homem.

---

<sup>1</sup> Informação prestada em 2019 pela Dra. Mariana Sobral, membro do grupo de pesquisa, obtida por meio de seus experimentos, cujos resultados ainda não foram publicados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Modificações no comportamento humano e, sobretudo, alterações ecológicas repercutem em mudanças no ciclo de transmissão de patógenos por artrópodes, considerando-se que, na maioria, eles são vírus zoonóticos. Essas mudanças incluem o homem como hospedeiro acidental. Além disso, fatores associados à diversidade de agentes infecciosos e o pouco conhecimento sobre a interação de hospedeiros, reservatórios e vetores envolvidos tornam as arboviroses um grande desafio para os sistemas de saúde (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Não menos importante nesse contexto estão as dificuldades enfrentadas no controle de mosquitos envolvidos no ciclo de transmissão (ZANLUCA et al., 2015).

O Brasil é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) hiperepidêmico para dengue. O País tem passado por repetidas epidemias que, somadas às mais recentes, sobretudo envolvendo os ZIKV, CHIKV e suas complicações, levaram o Estado brasileiro a desencadear uma série de ações na perspectiva de dar maior aporte ao controle populacional do vetor, bem como direcionar recursos para pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias para enfrentamento de arboviroses (BRASIL, 2017a). Entretanto, apesar dos esforços, as arboviroses ainda são causa de grande preocupação, especialmente porque, para dengue, Zika e chikungunya, ainda não existem vacinas disponíveis comercialmente, o que torna a prevenção limitada ao controle vetorial, que é muito incipiente no Brasil. Assim, conhecer a origem, o modo de transmissão e o potencial de disseminação desses arbovírus é essencial, de forma a estabelecer medidas eficazes de prevenção e controle das arboviroses (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

### 2.1 ZIKA

Esta subsecção aborda o conhecimento acerca da caracterização, histórico de distribuição, genótipos já identificados e transmissão do ZIKV, assim como sobre o diagnóstico, prevenção e tratamento da febre Zika no mundo.

#### 2.1.1 Caracterização e distribuição do vírus Zika no globo

O vírus Zika (ZIKV), um arbovírus zoonótico, emergente, da família *Flaviviridae*, foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda, por meio de amostras de um macaco *rhesus* febril, utilizado como sentinela no programa da Fundação Rockefeller para pesquisa sobre a

febre amarela da selva. Seu soro foi inoculado no cérebro de camundongos, os quais adoeceram após 10 dias, de onde se isolou um agente patogênico, mais tarde denominado vírus Zika. Um ano depois, o mesmo patógeno foi isolado na espécie de mosquito *Aedes africanus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

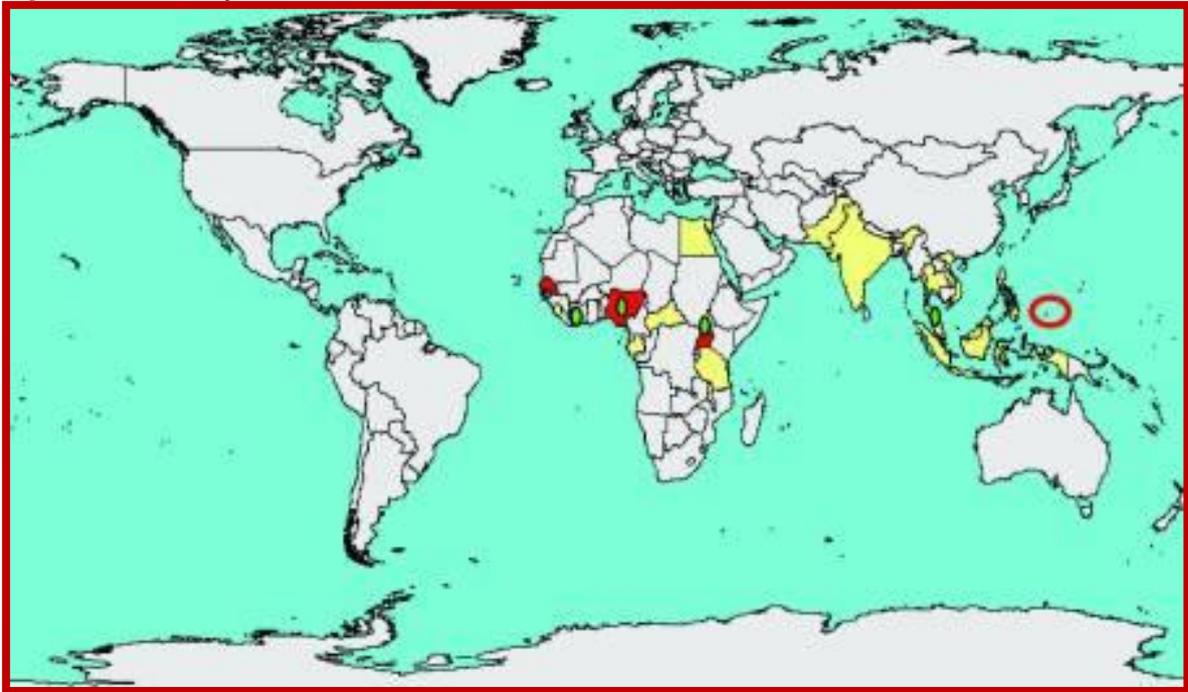
Embora os anticorpos contra o ZIKV tenham sido encontrados em soros humanos de muitas partes da África, até 1964, não havia registro de caso comprovado de infecção por esse vírus. A primeira detecção de infecção em humanos só ocorreu entre 1962 e 1963, também em Uganda, quando o pesquisador D. I. H. Simpson, em estudo com cepas do vírus, isoladas do *Ae. africanus*, na floresta Zika, contraiu a infecção. A pesquisa descreveu o curso clínico do agravo e apontou as razões que incriminaram o ZIKV como patógeno envolvido (SIMPSON, 1964). Em 1968 e entre 1971 e 1975, o vírus foi isolado na Nigéria, em estudos realizados com humanos, onde anticorpos neutralizadores do vírus Zika foram detectados em 40% dos pacientes nigerianos avaliados (FAGBAMI, 1979). Desde então, vários casos foram notificados em outros países africanos: Uganda, República Central Africana, Serra Leoa, Gabão, Egito e Tanzânia (HAYES, 2009) e no Sudeste Asiático (OLSON et al., 1981).

Em 2007, nas ilhas de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, relatou-se um surto de doença caracterizada por erupção cutânea, artralgia e conjuntivite (DUFFY et al., 2009). Inicialmente, diagnosticou-se esse surto como dengue, no entanto, estudos serológicos e moleculares apontaram o ZIKV como o patógeno envolvido (BALM et al., 2012). Esse foi o primeiro relato de detecção do ZIKV fora da África e Ásia – Figura 1 (HAYES, 2009). O vírus circulou no sudeste da Ásia, pelo menos, por cinquenta anos, sendo então introduzido na ilha de Yap, o que culminou na epidemia de febre Zika em humanos. Para confirmação do diagnóstico dos casos em Yap, utilizaram-se *primers* de consenso, os quais detectaram moléculas de ácido ribonucleico (RNA) do ZIKV no soro dos pacientes (HADDOW et al., 2012).

Em 2014, Cao-Lormeau e Musso relataram a identificação de ZIKV como agente causador de um surto que começou em outubro de 2013 na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014). É provável que a chegada do vírus a outras ilhas do Pacífico (Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa) tenha sido por meio de viajantes infectados da Polinésia Francesa (MUSSO, 2015). Durante o surto, relatou-se o primeiro caso de Síndrome de Guillain-Barré, sete dias após suspeita de infecção por ZIKV. Com base em resultados sorológicos de Imunoglobulina M (IgM), Imunoglobulina G (IgG) e teste por neutralização de redução de placas (PRNT), foi possível fazer o diagnóstico diferencial para infecção recente por ZIKV, descartando-se reações cruzadas em razão de infecções anteriores por

DENV. Esse foi o primeiro caso registrado de hospitalização causada por uma infecção grave por Zika (OEHLER et al., 2014).

**Figura 1** – Distribuição do vírus Zika, 1947-2007



Fonte: Hayes (2009).

Legendas:

○ representa a Ilha Yap; ■ amarelo indica evidência sorológica humana; ■ vermelho indica vírus isolado de humanos; ■ verde representa isolados de mosquitos.

A introdução do ZIKV no Brasil ocorreu provavelmente durante a Copa das Confederações em 2013 (FARIA et al., 2016). Contudo, a confirmação de transmissão autóctone no país só adveio em abril de 2015, ano em que foi registrado aumento de casos de microcefalia em bebês recém-nascidos na região Nordeste (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016a). A hipótese de que esses casos estivessem associados à infecção materna por ZIKV durante a gravidez foi confirmada no Brasil, no mesmo ano, o que desencadeou a formação de grupos para enfrentamento da doença no país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016b). A confirmação laboratorial da transmissão autóctone no país verificou-se no município de Camaçari, Bahia. Em maio do mesmo ano, confirmaram-se casos em Natal, Rio Grande do Norte; Sumaré e Campinas, São Paulo; Maceió, Alagoas; e Belém, Pará (BRASIL, 2017a).

Posteriormente, identificou-se o vírus em outros países da América do Sul e Central, e no Caribe. A circulação autóctone em outros países iniciou-se em outubro de 2015 na Colômbia, seguida do Suriname em novembro do mesmo ano. O Centro Nacional de

Referência para arboviroses, localizado no Instituto Pasteur, na Guiana Francesa, confirmou os primeiros cinco casos autóctones detectados no Suriname, pelos quais foi possível sequenciar o genoma do vírus (ENFISSI et al., 2016).

Inicialmente, supunha-se que o vírus havia entrado no Brasil durante a Copa do Mundo de 2014 (ZANLUCA et al., 2015). Segundo Musso (2015), os estudos filogenéticos de Zanluca et al. (2015) corroboram a ideia de que a introdução desse vírus no Brasil foi durante a corrida de canoas do Va'a World Sprint Championship, realizada no Rio de Janeiro em agosto de 2014, da qual participaram equipes de quatro países do Pacífico. Musso (2015) ainda argumenta que, na Copa do Mundo de 2014, nenhum país do Pacífico, endêmico do ZIKV, competiu. Contudo, conforme relatado no parágrafo anterior, estudo filogenético e molecular estima que a introdução do ZIKV nas Américas ocorreu entre maio e dezembro de 2013, mais de 12 meses antes da primeira detecção no Brasil (FARIA et al., 2016). Foi nesse período que surgiram os surtos nas ilhas do Pacífico, o mesmo período em que se detectou um aumento de passageiros dessas áreas para o Brasil (FARIA et al., 2016).

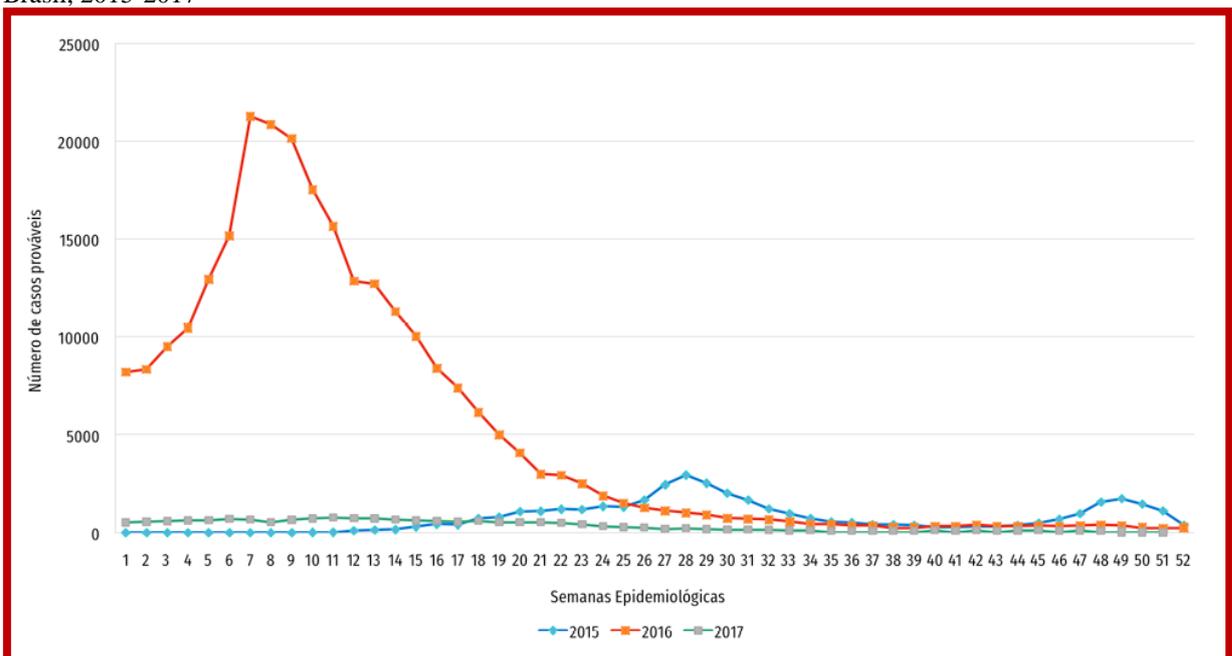
Entre outubro de 2015 e maio de 2016, o Brasil registrou um aumento de casos de microcefalia – 1.326 casos confirmados, sendo 351 em Pernambuco. No mesmo ano, o aumento súbito de casos de microcefalia em recém-nascidos na região Nordeste do Brasil foi associado à infecção das mães pelo ZIKV durante a gestação (BRASIL, 2017b). Essa adversidade foi considerada pelo Ministério da Saúde uma Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (Espin) e, desde então, várias frentes têm mostrado esforços no sentido de monitorar, de forma integrada, alterações no crescimento e no desenvolvimento relacionadas com a infecção pelo ZIKV.

O total de casos prováveis de infecção pelo ZIKV, registrados no país em 2015, foi de 37.011 (Tabela 1), sendo o maior número de casos notificados na região Nordeste do país, mais precisamente no estado da Bahia (32.544 casos, com taxa de incidência de 213,0 casos/100 mil habitantes). Em 2016, esse número subiu para 216.207, desses, 445 casos em Pernambuco, com taxa de incidência de 4,0 casos/100 mil habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018b). Segundo o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Saúde de Pernambuco, no mesmo ano, o número de casos notificados e confirmados no estado foram de 11.392 e 202, respectivamente (PERNAMBUCO, 2016). O maior número de casos prováveis registrados em 2016 no Nordeste foi no estado da Bahia (51.796 casos, com taxa de incidência de 339,0), seguido do estado de Alagoas (6.875 casos, com taxa de incidência de 204,6). No mesmo ano, destaca-se ainda o aumento considerável do número de notificações na região Sudeste, estado do Rio de

Janeiro (68.564, com taxa de incidência de 412,1 casos/100 mil habitantes) e no Centro-Oeste, estado do Mato Grosso (21.945 com taxa de incidência de 663,8 casos/100 mil habitantes) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018b).

Em 2017, o número de casos prováveis no país caiu para 17.593, com taxa de incidência de 8,5/100 mil habitantes (Figura 2), sendo o maior número de casos registrados na região Centro-Oeste, estados de Goiás (3.867 casos e taxa de incidência de 57,8) e Mato Grosso (2.148 casos e taxa de incidência de 65,0). No Nordeste (Figura 2), o maior número de casos foi nos estados da Bahia (2.217 casos e taxa de incidência de 14,0) e Ceará (1.503 casos e taxa de incidência de 16,8) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019a).

**Figura 2** – Gráfico representativo do número de casos prováveis de vírus Zika por semana epidemiológica, Brasil, 2015-2017



Fonte: Boletim Epidemiológico [da] Secretaria de Vigilância em Saúde (2018b).

Em 2018, registraram-se 8.680, com taxa de incidência de 4,2 casos/100 mil habitantes. Desses, confirmaram-se 3.984 (45,9 %) casos. Na região Nordeste, os maiores números de casos prováveis foram nos estados do Rio Grande do Norte (576 casos e taxa de incidência de 16,6 casos/100 mil habitantes) e Paraíba (399 casos, com taxa de incidência 10,0/100 mil habitantes). Destacam-se ainda, na região Centro-Oeste, os estados de Goiás (988 casos, com taxa de 14,3) e Mato Grosso (583 casos e taxa de 16,9/100 mil habitantes)

(BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019a).

Em 2019, até a semana epidemiológica (SE) 50, o número de casos prováveis de Zika registrados no país foi de 10.768, com incidência de 5,1 casos/100 mil habitantes. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020). A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (9,5 casos/100 mil habitantes), destacando-se os estados da Bahia (2.049 casos, com taxa de incidência de 13,8), do Rio Grande do Norte (1.232 casos e taxa de 35,1) e Alagoas (731 casos e taxa de 21,9) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020).

Notificaram-se em 2020, até a SE 51, 7.387 casos prováveis no país, com taxa de incidência de 3,5 casos por 100 mil habitantes. A maior taxa de incidência ocorreu na região Nordeste – 9,2 casos/100 mil habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021a). Em Pernambuco, o número de casos notificados em 2020 foi de 247, representando redução em relação aos registrados em 2019 – Tabela 1 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020). A Bahia e o Rio Grande do Norte foram os estados que contribuíram com as maiores taxas de incidência na região Nordeste (23,7 e 15,6 casos/100 mil habitantes, respectivamente).

Conforme apresentado na tabela 1, os dados epidemiológicos obtidos da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco mostram um número consideravelmente maior de notificações de febre Zika, entre os anos 2015 e 2019.

Entre as semanas epidemiológicas 45/2015 e 52/2017, registraram-se 15.298 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento a partir da gestação até a primeira infância, relacionados com a infecção pelo ZIKV e outras etiologias infecciosas. A maioria dos casos notificados até a SE 52/2017 concentrou-se na região Nordeste do país (60,6%). Naquele período, Pernambuco estava entre os cinco estados com maior número de casos notificados (16,8%), seguido pela Bahia (16,3%), São Paulo (9,0%), Paraíba (7,3%) e Rio de Janeiro com 7,3% (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018d). Até dezembro de 2018 – SE 45/2015 a 52/2018 (período 8 nov. 2015 a 29 dez. 2018) –, o Ministério da Saúde foi notificado sobre 17.041 casos suspeitos, sendo 3.332 (19,6%) confirmados. A maioria ainda se concentrou na região Nordeste do país (58,5%) e Pernambuco entre os cinco com maior número (16,4%) de casos notificados.

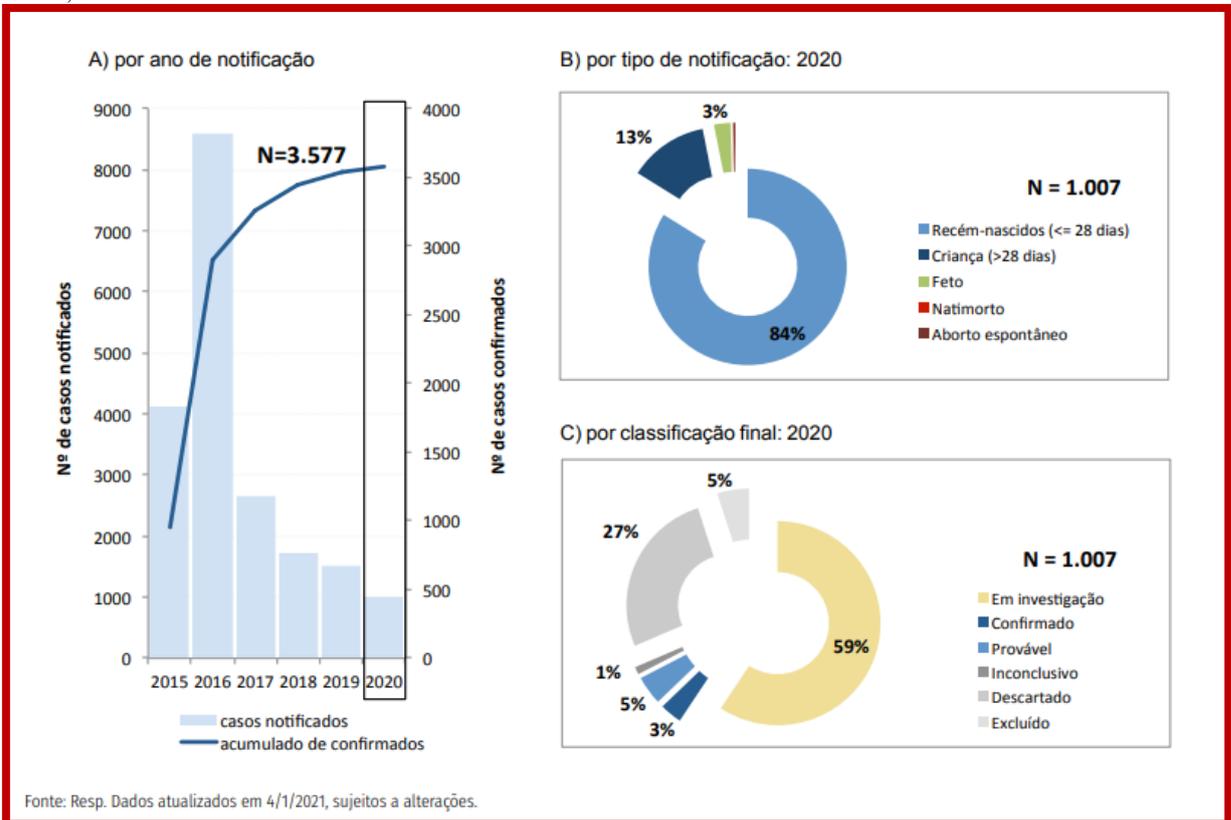
**Tabela 1** – Número de casos prováveis e incidência de febre pelo vírus Zika no Brasil, por região e no estado de Pernambuco, de 2015-2018 até a Semana Epidemiológica 52, de 2019 até a Semana Epidemiológica 50 e 2020 até a Semana Epidemiológica 51; Número de casos prováveis e confirmados de febre pelo vírus Zika no estado de Pernambuco, 2015 a 2019 até a semana epidemiológica 52

<b>Região/ Unidade da Federação</b>	<b>Número de casos prováveis (N)</b>						<b>Coefficiente de incidência/100 mil habitantes</b>					
<b>Ano</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>
Norte*	359	12.981	2.079	1.326	790	524	2,0	73,3	11,4	7,3	4,3	2,8
Nordeste*	33.571	76.029	5.232	2.425	5.406	5.305	59,0	133,5	9,2	4,3	9,5	9,2
Pernambuco*	60	445	36	113	403	247	0,6	4,0	0,4	1,2	4,2	2,6
Sudeste*	2973	91.025	3.937	3.149	3.525	860	3,3	105,4	4,5	3,6	4,0	1,0
Sul*	45	1.014	87	47	106	98	0,2	3,4	0,3	0,2	0,4	0,3
Centro-Oeste*	63	34.278	6.258	1.733	941	600	0,4	218,8	38,9	10,8	5,8	3,6
Brasil*	37.011	215.327	17.593	8.680	10.768	7.387	17,9	104,4	8,4	4,2	5,1	3,5
Pernambuco**	1.386	11.392	782	1.422	3.827	-	-	-	-	-	-	-
<b>Número de casos confirmados (N)</b>												
Pernambuco**	14	202	-	54	58	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: \* Boletim Epidemiológico [da] Secretaria de Vigilância em Saúde (2018b, 2018c, 2019a, 2019b, 2020, 2021a); \*\* Pernambuco (2016, 2017, 2018, 2019, 2020).

Entre os anos 2015 e 2020, registraram-se 19.622 casos suspeitos de síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ), sendo 3.577 (18,2%) confirmados (Figura 3A). A grande maioria desses casos ocorreu entre o fim de 2015 e 2016, com maior concentração na região Nordeste (2015: 88,1%; 2016: 49,8%). Em 2020, notificaram-se 1.007 novos casos. Um percentual de 83,9% (n=845) desses eram recém-nascidos e 13% (n=131) eram crianças com mais de 28 dias de idade (Figura 3B). Confirmaram-se 3,5% desses casos e 59,3% permanecem em investigação – Figura 3C (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021b).

**Figura 3** – Número de casos notificados de Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ), Brasil, 2015-2020



Fonte: Boletim Epidemiológico [da] Secretaria de Vigilância em Saúde (2021b).

Legendas: A) Por ano de notificação. B) Tipo de notificação. C) classificação final em 2020.

Nesse contexto, o ZIKV está presente em todos os continentes, tendo sido relatado por último na Europa (BRADY; HAY, 2019), o que representa 4,6 bilhões de pessoas potencialmente em risco (KRAEMER et al., 2019).

### 2.1.2 Caracterização genotípica e estrutural do vírus Zika

O ZIKV é um vírus de RNA sentido positivo, fita simples, com um genoma de tamanho de 11 kb e neurotrófico, assim como outros flavivírus. Constitui-se de três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (PrC), proteína pré-membrana (PrM) e proteína do envelope (PrE); e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A entrada do vírus na célula é mediada pelas proteínas do envelope enquanto as proteínas não estruturais (NS) desempenham diferentes funções relacionadas com a replicação do vírus (SAXENA et al., 2016).

Embora pertença ao mesmo cluster que outros flavivírus, como o vírus dengue (DENV), o genoma do ZIKV evoluiu rapidamente e divergiu dos membros desse gênero. Entre as cepas do ZIKV, também se encontram divergências genômicas, o que pode explicar as peculiaridades do agravo (WANG et al., 2017). Uma característica singular do ZIKV é a grande quantidade de recombinações homólogas ativas em seu genoma, incomum entre outros flavivírus, o que certamente contribuiu para sua evolução (FAYE et al., 2014).

Existem duas linhagens geograficamente distintas do ZIKV, a linhagem africana e a asiática. O surto ocorrido na Micronésia, em 2007, foi causado por linhagem do Sudeste Asiático (HADDOW et al., 2012). Desse modo, durante a epidemia nas Américas, pesquisadores sequenciaram o genoma do vírus diretamente dos soros de quatro pacientes virêmicos no Suriname. De um desses pacientes, obteve-se a sequência completa do RNA viral. Para outros três pacientes, obtiveram-se sequências da codificação da proteína do envelope. O estudo revelou que as cepas do Suriname compartilham mais de 99,7% da identidade de nucleotídeos e 99,9% de aminoácidos com a cepa que estava circulando na Polinésia Francesa em 2013, e pertencem ao genótipo asiático (ENFISSI et al., 2016).

Nesse contexto, Faria et al. (2016) afirmam que todos os vírus amostrados nas Américas, incluindo os do Brasil, compartilham um ancestral comum com a cepa ZIKV que circulou na Polinésia Francesa em novembro de 2013, sendo todos da linhagem asiática. Há padrões complexos de disseminação do ZIKV na América do Sul (LEDNICKY et al., 2016), sendo o Haiti considerado o provável ponto de entrada do ZIKV nas Américas, considerando-se que a cepa haitiana foi identificada como a mais próxima ao isolado da Polinésia Francesa (CAMPOS et al., 2018).

Para a eficiente transmissão nas Américas, o estudo de Liu et al. (2021) apresenta quatro reversões mutacionais combinadas do ZIKV, associadas à “imunidade de rebanho limitada” e mutações adicionais, como fatores determinantes, que potencializaram o estabelecimento do vírus e a ocorrência da epidemia no continente. Segundo os mesmos autores, mutações adaptativas adicionais não estavam presentes em várias cepas asiáticas.

Por outro lado, recentemente, outras descobertas apontam para a circulação da linhagem africana nas Américas, levantam a possibilidade de surto epidêmico no continente (ALMEIDA et al., 2019; KASPRZYKOWSKI et al., 2020) e a hipótese de que a introdução de diferentes linhagens de ZIKV no continente tenha ocorrido em momentos diferentes (ALMEIDA et al., 2019).

### 2.1.3 Diagnóstico, prevenção e tratamento da febre Zika

De modo geral, o diagnóstico baseia-se na detecção indireta de anticorpos IgM e IgG anti-ZIKV no soro ou na detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR em fluídos como soro, urina, sêmen (FAYE et al., 2008) e saliva (MUSSO et al., 2015a).

É difícil o diagnóstico de indivíduos que vivem ou retornam de áreas endêmicas de flavivírus. Esses vírus desencadeiam a produção de anticorpos que podem apresentar reações cruzadas em seres humanos, como os vírus causadores da dengue, encefalite japonesa, encefalite de Saint Louis, Febre do Nilo Ocidental (FNO), febre amarela e Zika, doenças que provocam sintomas similares. Com relação aos três arbovírus responsáveis por epidemias de dengue, chikungunya e Zika no Pacífico, desde 2012, é um desafio para a saúde pública realizar a vigilância, pelas dificuldades enfrentadas na notificação e diagnóstico clínico, onde as manifestações iniciais dos três agravos são bastante semelhantes: febre aguda, erupção cutânea e sintomas semelhantes à gripe (ROTH et al., 2014).

Por outro lado, a RT-PCR convencional e a quantitativa (RT-qPCR), apesar de serem técnicas rápidas e com alta sensibilidade e especificidade, apresentam desvantagem pelo curto período de detecção, que é limitado à fase virêmica, que inicia junto com os sintomas e segue até aproximadamente o 7º dia da doença (FAYE et al., 2013; LANCIOTTI et al., 2008).

O método de RT-qPCR foi desenvolvido por meio do sequenciamento da região codificadora da proteína NS5 e alinhamento dessa com regiões representativas de flavivírus do GenBank.<sup>2</sup> Trata-se de uma técnica de bastante relevância do ponto de vista de vigilância epidemiológica, especialmente em áreas onde circulam outros vírus que apresentam manifestações clínicas semelhantes (LANCIOTTI et al., 2008). Embora demande maior custo comparada com a convencional, apresenta menor risco de contaminação e de gerar resultados falso-positivos. Tem alta sensibilidade e especificidade, é de fácil padronização e possibilita a quantificação de cópias de RNA viral (FAYE et al., 2013; LANCIOTTI et al., 2008).

---

<sup>2</sup> GenBnk é o Banco de dados de Nucleotídeos da *National Library of Medicine* (NLM) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), localizado no National Institutes of Health (NIH).

Além do sangue, a saliva pode ser uma alternativa para detecção do ZIKV, especialmente quando há dificuldade na coleta de sangue. Amostra de saliva, coletada em pacientes com sintomas da doença, aumentou a taxa de detecção pela técnica de RT-qPCR, ZIKV específico, com relação às amostras sanguíneas, embora não tenham incrementado a janela de detecção do RNA viral (MUSSO et al., 2015a). Por apresentar maior quantidade de partículas virais em relação ao soro, ser de fácil obtenção e ter um longo período de detecção, a urina também é um fluido eficiente para o diagnóstico de ZIKV (BINGHAM et al., 2016; SHARP et al., 2019).

Apesar dos avanços quanto aos métodos moleculares para diagnóstico, ainda há fragilidade com relação à especificidade e sensibilidade dos testes. Estudo de avaliação externa da qualidade dos testes de diagnóstico molecular do ZIKV no Brasil demonstrou que 73% dos laboratórios apresentaram sensibilidade e especificidade dos testes limitadas, em que a estimativa de carga viral variou de forma significativa. O ensaio avaliado foi o protocolo de RT-PCR em tempo real, desenvolvido por Lanciotti et al. (2008), e amplamente utilizado no Brasil. Esses resultados não foram significativamente diferentes daqueles encontrados para laboratórios da Europa (FISCHER et al., 2018).

Com relação à identificação de ZIKV em insetos vetores, a mesma técnica de RT-qPCR pode ser utilizada. Contudo, pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz de Pernambuco (Fiocruz-PE) analisaram e validaram uma técnica de transcrição reversa para detecção de ZIKV em espécimens de mosquitos. A técnica denominada amplificação isotérmica mediada por alça – Lâmpada da Reverso-Transcrição (RT-LAMP) – é altamente específica, de baixo custo, além de ser até 10.000 vezes mais sensível que RT-qPCR. Trata-se de um ensaio que permite o diagnóstico de ZIKV em até 20 minutos. Essa ferramenta pode ser utilizada na forma de kit rápido para monitorar o ZIKV nas populações de mosquitos, o que trará grande contribuição para o estabelecimento de medidas de controle, sobretudo nos países em desenvolvimento (SILVA et al., 2019).

Com relação à prevenção, ainda não existem vacinas disponíveis, embora se tenha verificado um avanço nas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas desde a recente emergência do ZIKV (BARRETT, 2018; CHIN et al., 2021; GAUDINSKI et al., 2018; LAROCCA et al., 2016). A vacina de ácido desoxirribonucleico (DNA) VRC5283 em ensaios clínicos de fase 1, por exemplo, desencadeou respostas eficazes, envolvendo anticorpos neutralizantes e células T (GAUDINSKI et al., 2018). Com a cepa de vacina do DENV, PDK-53, pesquisadores entendem como um candidato à vacina contra o ZIKV um vírus quimérico da dengue/Zika, VacDZ. O estudo relata que o método VacDZ é seguro e eficaz, podendo ser

administrado como uma vacina tradicional ou como uma vacina lançada por DNA (CHIN et al., 2021).

Até o momento, a prevenção de infecção com ZIKV depende essencialmente da redução de criadouros dos vetores e diminuição do contato físico do hospedeiro humano com esses insetos, o que pode ser feito pelo uso de repelentes, mosquiteiros e proteção de janelas (SAXENA et al., 2016).

Com relação ao tratamento, ainda não existem drogas antivirais específicas apesar das graves consequências confirmadas a partir de infecção pelo ZIKV (ODUYEBO et al., 2017). Compostos anti-flavivirais vêm sendo testados no sentido de prover conhecimento e identificar drogas que poderiam ser avaliadas em estudos clínicos de infecção por ZIKV (BARROWS et al., 2016). A atividade antiviral do ribosídeo 6-metilmercaptapurina (6MMP<sub>r</sub>) – um análogo de nucleosídeo tiopurina contra a cepa do ZIKV que circulou no Brasil durante a epidemia de febre Zika – foi avaliada. Os resultados mostraram que essa substância reduziu a replicação do vírus em 99%, sendo indicada, pela primeira vez, como candidato antiviral promissor contra o ZIKV (CARVALHO et al., 2017).

Medicamentos fitoterápicos podem ser uma alternativa eficaz, considerando sua baixa toxicidade e o fato de já terem sido eficientes em tratamento de infecção pelo vírus da encefalite japonesa. Medicamentos homeopáticos como *Eupatorium perfoliatum*, *Atropa belladonna*, *Rhus tox* podem ser utilizados de forma segura como parte do tratamento para febre Zika (SAXENA et al., 2016).

#### **2.1.4 Transmissão do vírus Zika**

Este era um tema pouco estudado, mesmo após o primeiro surto detectado fora da África, em 2007, na Micronésia (LI MI et al., 2012). Entretanto, a dispersão do vírus para as Américas, a partir de 2013, e seus graves efeitos desencadearam uma série de investigações, sobretudo na perspectiva de fornecer conhecimento acerca do processo de transmissão e das espécies de mosquito envolvidas. Essa explosão de estudos desenvolvidos em todo o mundo resultaram em controvérsias e discussões entre os estudiosos da área (AYRES et al., 2017; FERNANDES et al., 2016, 2017; GOMARD et al., 2020; GUEDES et al., 2017; GUO et al., 2016; LIU et al., 2017; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2018), o que levou à reflexão sobre os parâmetros que determinam a competência vetorial de uma espécie.

Competência vetorial é um dos elementos-chave na avaliação de riscos de transmissão e na compreensão do papel individual das espécies transmissoras biológicas de patógenos

(VEGA-RÚA et al., 2014). Classicamente, é conceituada como a habilidade intrínseca de determinada espécie para permitir a infecção pelo patógeno, sua replicação em células epiteliais do intestino, a disseminação para a hemocele e a infecção das glândulas salivares (HADDAD et al., 2012; MCTIGHE; VAIDYANATHAN, 2012; SALAZAR et al., 2007). Hoje, outros parâmetros como a presença de RNA viral ou partículas virais infectivas na saliva e a transmissão para animais expostos a fêmeas infectadas passam a ser inclusos nos estudos (FERNANDES et al., 2016, 2017; GUEDES et al., 2017; GUO et al., 2016; LIU et al., 2017; PHUMEE et al., 2019).

Desde os primeiros relatos de febre Zika no mundo, espécies do gênero *Aedes* são apontadas como vetoras do ZIKV. Já em 1969, apesar de isolados de ZIKV terem sido obtidos de amostras de *Aedes luteocephalus*, espécie encontrada em florestas, foi sugerido o possível papel de *Ae. aegypti* como vetor do ZIKV em áreas urbanas da Nigéria, pelo fato de essa espécie ser predominante na região e de ter sido detectada imunidade da população humana a esse arbovírus em todas as comunidades estudadas (FAGBAMI, 1979). Achados anteriores relatam ter obtido o vírus de espécies selváticas de *Aedes* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

Muitos estudos também avaliam e apontam *Ae. aegypti* como vetor primário do ZIKV, sobretudo por terem isolado o vírus em espécimes encontradas em campo (DIALLO et al., 2014; DÍAZ-QUIÑONEZ et al., 2016; GUERBOIS et al., 2016). Porém, a dispersão do vírus levou alguns pesquisadores a investigarem sobre o envolvimento de outras espécies, sobretudo considerando a densidade e o comportamento dessas nas diferentes regiões do globo (AYRES, 2016; BOCCOLINI et al., 2016; GOMARD et al., 2020; GUEDES et al., 2017; GUO et al., 2016).

O alerta para a necessidade de investigar o papel de *Cx. quinquefasciatus* no ciclo de transmissão desse arbovírus foi dado por Ayres (2016). Motivado não apenas pelo recente surto que se espalhou para as Américas, onde *Cx. quinquefasciatus* é a espécie mais abundante; mas em razão de seu hábito altamente antropofílico e também por ser uma espécie que transmite outros arbovírus, por exemplo, o Vírus do Oeste do Nilo (VON) – West Nile Virus (WNV). Segundo Ayres et al. (2017), muitos estudos não consideram a abundância das espécies em suas investigações de modo que o número de espécimes coletados represente a população na região em estudo. *Cx. quinquefasciatus* é a espécie de culicídeos mais abundante nas Américas, porém, na maioria das investigações, não se considera esse parâmetro, que é um importante aspecto da capacidade vetorial (KRAMER; CIOTA, 2015). Nesse sentido, o ZIKV foi isolado e sequenciado por meio das amostras de *Cx. quinquefasciatus* coletadas em Recife entre 2015 e 2016. O

sequenciamento mostrou semelhança com a linhagem de vírus isolada de pacientes durante a epidemia no mesmo período (GUEDES et al., 2017).

Embora a principal forma de transmissão do ZIKV seja por espécies de mosquitos vetoras, a transmissão sexual (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015b) e vertical (BESNARD et al., 2014) entre hospedeiros humanos têm sido relatadas.

Outro ponto importante na ecobiologia de patógenos e hospedeiros é a transmissão vertical na espécie vetora. Um patógeno tem mecanismos para se manter e garantir sua sobrevivência, especialmente quando não há hospedeiros suscetíveis ou em condições ambientais adversas. São poucos os estudos que investigam a estratégia do ZIKV para garantir sua permanência em mosquitos vetores (PHUMEE et al., 2019; THANGAMANI et al., 2016), embora esses sejam fundamentais para compreender a ecologia do ZIKV e implementar medidas de controle (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016).

Nesse sentido, a transmissão vertical é um desses mecanismos (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016). Nas espécies do gênero *Aedes*, por exemplo, os ovos são capazes de resistir à dessecação e a condições variáveis de temperatura, de modo que, em condições favoráveis, podem eclodir e as larvas se desenvolverem até a forma adulta. Durante os diferentes estágios do ciclo de vida do mosquito, o patógeno que foi transmitido verticalmente também replica, e a fêmea adulta emerge infectada, garantindo a permanência do vírus e impactando diretamente na dinâmica de transmissão (THANGAMANI et al., 2016).

O Quadro 1 sistematiza os principais estudos que abordaram a transmissão do ZIKV, desenvolvidos no período de 2009 a 2020, contemplando as espécies e linhagens estudadas, sua origem, tipo de experimento realizado, resultados encontrados e principais conclusões.

**Quadro 1** – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020

(continua)

<b>Espécie de mosquito e origem</b>	<b>Linhagem do ZIKV origem</b>	<b>Tipo de experimento/ Infecção</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Aedes hensilli</i> Ilhas de Yap, Estado Federado da Micronésia	-	Coleta de larvas e mosquitos em campo, para detecção do ZIKV	<i>Ae. hensilli</i> como espécie predominante; Nenhum <i>pool</i> de mosquitos avaliados foi positivo para presença de RNA viral.	Duffy et al. (2009)
<i>Ae. aegypti</i> Singapura, Sudeste Asiático	MR766 Uganda	Infecção oral em laboratório	62% de disseminação (vírus encontrado nas glândulas salivares por volta do 5º dia pós-exposição (DPE).	Li Mi et al. (2012)

**Quadro 1** – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020

(continuação)

<b>Espécie de mosquito e origem</b>	<b>Linhagem do ZIKV origem</b>	<b>Tipo de experimento/ Infecção</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Ae. albopictus</i> Singapura	MR766 Uganda	Infecção oral em laboratório	Taxas de infecção de 91,7%; disseminação de 100% e transmissão de 72,7% (detectada pelo processamento da saliva por RT-qPCR); <i>Ae. albopictus</i> de Singapura é altamente suscetível ao ZIKV.	Wong et al. (2013)
<i>Ae. hensilli</i> Ilhas de Yap, Estado Federado da Micronésia	MR766 Uganda	Infecção artificial laboratório	86% de infecção; 23% de disseminação; Espécie incriminada como possível vetora do ZIKV.	Ledermann et al. (2014)
<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. unilineatus</i> , <i>Ae. vittatus</i> e <i>Ae. Luteocephalus</i> Senegal	ArD 128000 ArD 132912 ArD 157995 ArD 165522 HD 78788 Senegal MR 766 Uganda	Infecção artificial laboratório	odas as espécies foram suscetíveis a infecção; Apenas <i>Ae. vittatus</i> e <i>Ae. Luteocephalus</i> apresentaram potencial para transmissão do ZIKV, pois continham genoma do vírus em sua saliva, depois do 15° DPE, em 20 e 50% dos mosquitos respectivamente.	Diagne et al. (2015)
<i>Cx. quinquefasciatus</i> - San Joaquin Valley, Califórnia e <i>Cx. pipiens</i> - Tabarka, Tunisia	NC-2014-5132) Genótipo asiático Nova Caledônia	Infecção artificial oral e intratorácica em laboratório	<i>Cx. quinquefasciatus</i> - infecção no 3°, 7° e 21° DPE, respectivamente: 0/42, 1/47 e 5/40; <i>Cx. pipiens</i> - infecção no 3°, 7° e 21° DPE respectivamente: 1/48, 3/47 e 6/46; <i>Cx. quinquefasciatus</i> - disseminação: no 14° DPE (1/41) e 21° DPE (3/40). <i>Cx. pipiens</i> : disseminação não detectada; Não encontrado vírus na saliva, nas duas espécies, as quais foram consideradas não competentes para transmissão.	Amraoui et al. (2016)
<i>Ae. aegypti</i> Guiana Francesa, Martinica (Caribe), Guadalupe (Caribe), Flórida (EUA), Rio de Janeiro (Brasil) <i>Aedes albopictus</i> Rio de Janeiro (Brasil) e Flórida, (EUA)	NC-2014-5132 Genótipo asiático Nova Caledônia	Infecção artificial laboratório	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> foram capazes de infectar e disseminar o ZIKV no 4° e 7° DPE. A transmissão, avaliada pela titulação do vírus na saliva, foi baixa e só foi detectada no 14° DPE.	Chouin-Carneiro et al. (2016)

Quadro 1 – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020

(continuação)

Espécie de mosquito e origem	Linhagem do ZIKV origem	Tipo de experimento/ Infecção	Principais resultados	Referência
<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. polynesiensis</i> - Taití – Polinésia Francesa	PF13 / 251013 Instituto Louis Malardé	Infecção artificial laboratório oral em	<i>Ae. aegypti</i> - alta taxa de infecção (90%); disseminação e transmissão só foram expressivas a partir do 9º DPE (75%) e 14º DPE (36%) respectivamente; <i>Ae. polynesiensis</i> – maiores taxas de infecção (36%) e disseminação (18%) no 14º DPE. Transmissão não detectada; <i>Ae. aegypti</i> apresentou capacidade tardia para transmitir ZIKV; <i>Ae. polynesiensis</i> não foi competente para transmitir; Outra espécie pode ter contribuído para a propagação do ZIKV durante o surto.	Richard; Paoaafaite; Cao-Lormeau (2016)
<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> – Província de Hainan, China	SZ01 GenBank. n.º KU866423	Infecção artificial laboratório e Experimentação de avaliação da transmissão em camundongos oral em	Taxa de disseminação: 90% em glândulas salivares no 8º DPE. 8 dos 9 camundongos avaliados apresentaram cérebro positivo após exposição em mosquitos infectados. <i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i> considerada como potencial vetor na China.	Guo et al. (2016)
<i>Ae. aegypti</i> - México <i>Cx. quinquefasciatus</i> – Flórida <i>Cx. pipiens</i> - Pensilvânia <i>Cx. tarsalis</i> - Califórnia	PRVABC5 Porto Rico MR766 Uganda 41525 Senegal	Infecção artificial laboratório oral em	A transmissão das linhagens de ZIKV do oeste e leste da África foi mais eficiente em <i>Ae. aegypti</i> do que a linhagem asiática. Espécies de <i>Culex</i> , não foram vetores eficientes do ZIKV. Outras linhagens do ZIKV podem infectar e replicar em <i>Aedes</i> da América.	Weger-Lucarelli et al. (2016)
<i>Ae. aegypti</i> - México	-	Avaliação amostras mosquitos coletados campo de de em	20% e 70% das amostras analisadas de duas áreas de coleta foram positivas para ZIKV. <i>Ae. aegypti</i> coletados de janeiro a março de 2015 tinham a presença do ZIKV. O ZIKV estava presente na região desde o início de 2015.	Díaz-Quiñonez et al. (2016)
<i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> - México	-	Avaliação amostras mosquitos coletados campo de de em	27,3% das amostras de <i>Ae. aegypti</i> coletadas foram positivas para ZIKV; Não foi detectado ZIKV em <i>C. quinquefasciatus</i> . <i>A. aegypti</i> incriminado como vetor principal, pela primeira vez, na América do Norte.	Guerbois et al. (2016)
<i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> Rio de Janeiro, Brasil	Rio-U1 and Rio-S1 Genótipo asiático Rio de Janeiro, Brasil	Infecção artificial laboratório oral em	<i>Cx. quinquefasciatus</i> : taxa de infecção mínima para ZIKV. Não foi detectada disseminação ou transmissão. <i>Ae. aegypti</i> : taxa de infecção acima de 80%. Taxas de disseminação e de transmissão acima de 40%. <i>Cx. quinquefasciatus</i> não foi competente para transmitir ZIKV.	Fernandes et al. (2016)

**Quadro 1** – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020

(continuação)

Espécie de mosquito e origem	Linhagem do ZIKV origem	Tipo de experimento/ Infecção	Principais resultados	Referência
<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i>	-	Avaliação de amostras de mosquitos coletados em campo	1683 mosquitos coletados e três pools de <i>Ae. aegypti</i> positivos para ZIKV; Nenhum pool positivo para <i>Ae. albopictus</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> .	Ferreira-de-Brito et al. (2016)
<i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. pipiens</i> (colônias de laboratório) - Alemanha <i>Cx. P. pipiens</i> e <i>Cx. torrente</i> - Alemanha <i>Ae. albopictus</i> - Alemanha e Itália	FB-GWUH-2016 GenBank KU870645	Infecção artificial laboratório	As espécies <i>Culex</i> não foram competentes para o ZIKV. <i>Ae. albopictus</i> foi suscetível ao ZIKV, mas apenas a 27° C, com taxas de transmissão semelhantes a uma colônia de laboratório do <i>Ae. aegypti</i>	Heitmann et al. (2017)
<i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> - Recife, Brasil	ZIKV BRPE243/2015 Pernambuco, Brasil	Avaliação de amostras de mosquitos coletados em campo; Infecção artificial laboratório.	ZIKV isolado de espécimes de <i>Ae. aegypti</i> (dois pools em 117 analisados) e <i>Cx. quinquefasciatus</i> (três em 270). <i>Ae. aegypti</i> : taxa de infecção de 90% e proporção de glândulas salivares infectadas de 60% no 7° DPE. <i>Cx. quinquefasciatus</i> : taxa de infecção de 83% e proporção de glândulas salivares infectadas de 100% no 7° DPE. <i>Cx. quinquefasciatus</i> : potencial vetor para transmissão do ZIKV.	Guedes et al. (2017)
<i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> – Polinésia francesa	PF13 / 251013-18 Genótipo asiático	Infecção artificial laboratório avaliação competência vetorial	<i>Cx. quinquefasciatus</i> : nenhuma amostra positiva para ZIKV no 6° DPE (n = 39) e 9° DPE (n = 47). Não foi detectada disseminação ou transmissão. <i>Ae. aegypti</i> : amostras positivas para ZIKV (75% a 6° DPE, 77% a 9° DPE. Partículas detectadas em todas as amostras positivas para PCR.	Richard; Paoaafaite; Cao-Lormeau (2016)
<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. vexans</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Cx. coronator</i> e <i>Cx. tarsalis</i> Guadalajara – Jalisco, México	-	Avaliação de amostras de mosquitos coletados em campo para detecção do vírus	Taxa mínima de infecção (MIR) por 1000 mosquitos: 250 para <i>Ae. vexans</i> , 180,82 para <i>Cx. tarsalis</i> , 34,08 para <i>Cx. quinquefasciatus</i> , 29,10 para <i>Cx. coronator</i> e 10,28 para <i>Ae. aegypti</i> . O vírus isolado de glândulas salivares de 5 espécies causou efeito citopático em células C6/36. As cinco espécies foram consideradas potenciais vetores do ZIKV.	Elizondo-Quiroga et al. (2018)

Quadro 1 – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020

(continuação)

Espécie de mosquito e origem	Linhagem do ZIKV origem	Tipo de experimento/ Infecção	Principais resultados	Referência
<i>Ae. aegypti</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i> , e <i>Cx. tarsalis</i> Califórnia	PR15 Porto Rico BR15 Brasil e MA66 Malásia	Avaliação das Taxas de infecção, disseminação e transmissão através da exposição de mosquitos a camundongos infectados	Com PR15: <i>Cx. quinquefasciatus</i> refratário à infecção (0%, N = 42) e <i>Cx. tarsalis</i> infectado a 4% (N = 46); RNA de ZIKV não detectado na saliva das espécies <i>Culex</i> : 14 ou 21 dias após a alimentação (dpa); <i>Ae. aegypti</i> : taxas de infecção de 85% (PR15; N = 46), 90% (BR15; N = 20) e 81% (MA66; N = 85) 14 ou 15 dpa; As unidades de formação de placa (PFU) variaram de acordo com a cepa viral: 13-4 PFU com MA66 (média ± SE, N = 13) em comparação com 29 ± 6 PFU para infectada por PR15 (N = 13) e 35 ± 8 PFU para BR15 infectado (N = 6; ANOVA, df = 2, F = 3,8, P = 0,035); <i>Cx. tarsalis</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> : considerados não vetores de ZIKV.	Main et al. (2018)
<i>Ae. aegypti</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i> e <i>Mansonia titillans</i> Chiapas, México	Mex1-44 Chiapas, México	Quantificação viral em amostras de mosquitos coletados em campo (valores de Ct extrapolados para equivalentes unidades formadoras de foco por mL)	<i>Ae. aegypti</i> : 2,2 a 6,0 log <sub>10</sub> FFUe/pool (valor consistente com a competência para transmissão); <i>Cx. quinquefasciatus</i> e <i>Mansonia titillans</i> : ≈1 FFUe/pool (valor não consistente com competência vetorial). <i>Ae. aegypti</i> : única espécie diretamente incriminada na transmissão de ZIKV em Chiapas.	Azar et al. (2019)
<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> Tailândia	Zika/H. <i>sapiens-tc</i> / THA / 2014 / SV0127-14 (número de acesso KU681081) Genótipo asiático	Infecção oral artificial em laboratório para avaliação de transmissão vertical	<i>Cx. quinquefasciatus</i> : ZIKV detectado em fêmeas e machos até as gerações F6 e F2, respectivamente (vírus isolado mostrou efeito citopático nas células C6/36). <i>Ae. aegypti</i> : ZIKV detectados em F1; <i>Ae. albopictus</i> : não detectada transmissão vertical. <i>Cx. quinquefasciatus</i> : considerado seu papel como vetor potencial do ZIKV na Tailândia.	Phumee et al. (2019)

Quadro 1 – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020

(continuação)

Espécie de mosquito e origem	Linhagem do ZIKV origem	Tipo de experimento/ Infecção	Principais resultados	Referência
<i>Cx. quinquefasciatus</i> e <i>Ae. aegypti</i> (Antilhas Francesas)	Senegal - Africa 1984 GenBank: KU955592; Martinica - America 2015 GenBank: KU647676; Malásia, Asia 1966 GenBank: KX694533	Infecção artificial em laboratório para avaliação de competência vetorial	<i>Cx. quinquefasciatus</i> : infecção, disseminação ou transmissão não detectadas em 7°, 14° ou 21° DPE; <i>Ae. aegypti</i> : cepa de ZIKV do Senegal apresentou maiores taxas de infecção e disseminação 88% e 94%; Período de incubação extrínseco também diferiu entre as cepas virais: vírus detectado na saliva no 7 DPE para a cepa do Senegal, 14 DPE para a da Malásia e 21 DPE para Martinica; <i>Ae. aegypti</i> : pode transmitir cepas asiáticas, africanas e americanas; <i>Cx. quinquefasciatus</i> são refratários à infecção por ZIKV.	Hery et al. (2019)
<i>Cx. quinquefasciatus</i> e <i>Ae. aegypti</i> Guadalajara, Jalisco, México	Cepas <i>Ae. G6</i> e <i>Cx.</i> de ZIKV isoladas de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> coletados em Guadalajara, Jalisco, em 2016; Cepa isolada de amostra de soro humano confirmada como positivo	Infecção artificial em laboratório para avaliação de competência vetorial	<i>Cx. quinquefasciatus</i> : refratária à infecção, disseminação e transmissão; <i>Ae. aegypti</i> : competente para transmissão em Guadalajara.	Elizondo-Quiroga et al. (2019)
<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. taeniorhynchus</i> Vitória, Espírito Santo, Brasil	-	Avaliação de amostras de mosquitos coletados em campo, para detecção do vírus, isolamento e sequenciamento	Seis <i>pools</i> positivos para ZIKV: em <i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. taeniorhynchus</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> . ZIKV Isolado de duas amostras de <i>Cx. quinquefasciatus</i> e uma de <i>Ae. aegypti</i> . Genomas sequenciados: ZIKV/ <i>C. quinquefasciatus</i> /Brasil/ES01 / 2016 (Cxq_ES1), ZIKV/ <i>C. quinquefasciatus</i> / Brasil / ES24 / 2016 (Cxq_ES24) e ZIKV/ <i>Ae. aegypti</i> / Brasil/ES32/2016(Aea_ES32). Cxq_ES24 e e Aea_ES32 mostraram semelhança com os detectados no Haiti em 2014 e em Pernambuco, em 2015; Cepas de ZIKV de dois clados cocirculando na região.	Ayres et al., 2019

**Quadro 1** – Estudos que abordam transmissão do ZIKV realizados no período 2009-2020

(conclusão)

<b>Espécie de mosquito e origem</b>	<b>Linhagem do ZIKV origem</b>	<b>Tipo de experimento/ Infecção</b>	<b>Principais resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Ae. aegypti</i> Poza Rica – México e Miami - Flórida <i>Ae. albopictus</i> Nova York	ZIKV HND (2016-19563, acesso ao GenBank no. KX906952)	Infecção oral artificial para avaliação do efeito da faixa de temperatura diurna na capacidade vetorial de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> : longevidade, alimentação sanguínea e competência vetorial avaliados em diferentes temperaturas	Temperaturas mais altas: diminuição da longevidade de <i>Ae. aegypti</i> e nas taxas de alimentação sanguínea de <i>Ae. albopictus</i> . <i>Ae. albopictus</i> mantido em temperatura mais baixa: mostrou maior taxa de capacidade vetorial (0,53) e a maior eficiência de transmissão (57%). Aumento da temperatura diminuiu a capacidade vetorial: efeitos ainda mais significativos foram obtidos em <i>Ae. aegypti</i> ; Aumentos de temperatura nas Américas podem afetar significativamente a competência do vetor, alimentação sanguínea e longevidade: diminuir a capacidade vetorial das espécies de <i>Aedes</i> nas Américas.	Onyango et al. (2020)
<i>Ae. albopictus</i> ; <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> Ilha da União, França	ZIKV: Cepa africana (Dak84, GenBank: KU955592) e duas cepas asiáticas (PaRi_2015: GenBank: KU647676 e MAS66: GenBank: KX694533)	Infecção oral artificial para avaliação da competência vetorial	As duas linhagens de <i>Cx. quinquefasciatus</i> não foram infectadas pelas três cepas de ZIKV avaliadas. As linhagens de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i> foram menos competentes para o as cepas asiáticas do que para a a cepa africana ZIKV. A cepa africana foi melhor transmitida por <i>Ae. aegypti</i> em comparação com <i>Ae. albopictus</i> .	Gomard et al. (2020)
<i>Ae. albopictus</i> Nordeste dos Estados Unidos: Nova York e Connecticut	ZIKV: cepa HND C3 (2016–19563, GenBank: KX906952) e cepa PRVABC59, GenBank KU501215	Infecção oral artificial para avaliação da competência vetorial	As duas linhagens de <i>Ae. albopictus</i> foram infectadas pelas duas cepas de ZIKV (taxa de infecção de variou de 63 a 98%); A taxa de disseminação variou de 15% a 98%, no 14° DPE; Poucas amostras apresentaram vírus detectáveis na saliva.	Gloria-Soria et al. (2020)

Fonte: A autora, 2021.

## 2.2 CHIKUNGUNYA

Esta subsecção aborda o conhecimento acerca da caracterização, histórico de distribuição, genótipos já identificados e transmissão do CHIKV, assim como sobre o diagnóstico, prevenção e tratamento da chikungunya no mundo.

### 2.2.1 Caracterização e distribuição do vírus chikungunya no globo

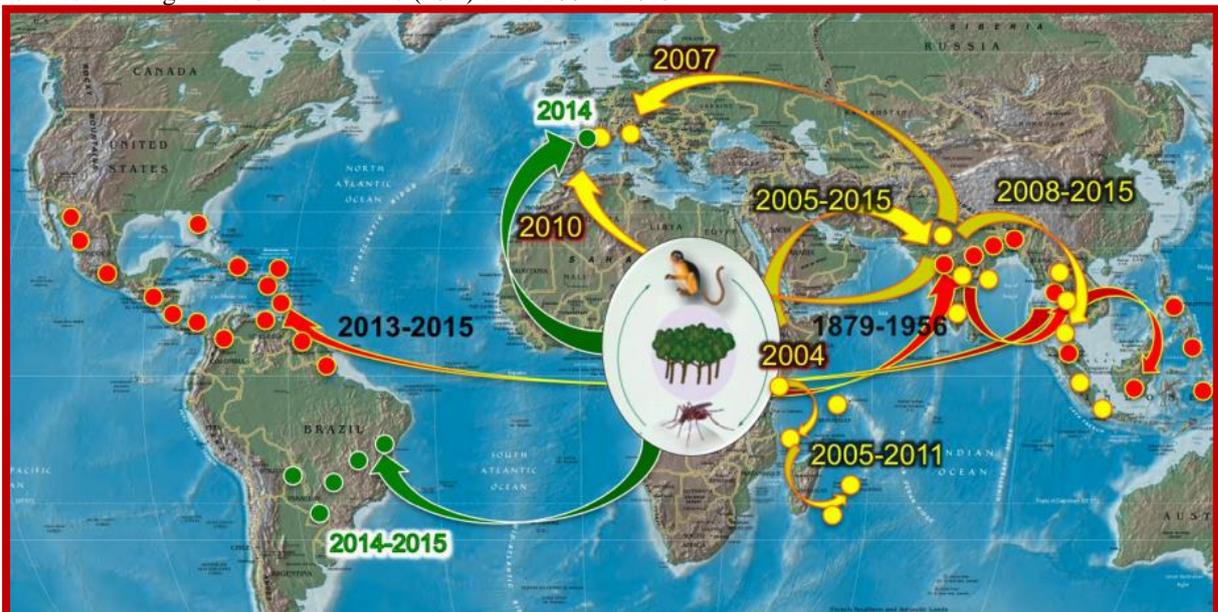
O vírus chikungunya (CHIKV) é um Alphavirus da família *Togaviridae*. Foi isolado pela primeira vez em 1953 de um humano febril, no Distrito da Tanganyika, Tanzânia (África Oriental), durante uma epidemia de dengue (ROSS, 1956). A primeira evidência da presença do vírus fora da África foi em 1958 na Tailândia (Sudeste Asiático), onde foi isolado durante um surto associado à transmissão pela espécie *Ae. aegypti*. O CHIKV foi também identificado em Camboja e na Índia, entre 1961 e 1963, associado a surtos de dengue (WEAVER; FORRESTER, 2015). Considerando a ausência de surtos de CHIKV desde 1972, foi postulado que o vírus teria desaparecido da Índia e do Sudeste asiático (ARANKALLE et al., 2007). Entretanto, ainda na década de 1970, o vírus continuou a se dispersar pelo Sul e Sudeste asiático, originando pequenos surtos e casos esporádicos. Estudos sustentam a hipótese de que o vírus tenha sido disseminado para essas regiões, mas sua origem é a África Tropical (POWERS et al., 2000).

Entre 2004 e 2006, uma grande epidemia causada por CHIKV iniciou-se no Quênia e se espalhou por várias ilhas do Oceano Índico, Índia e Sudeste Asiático, incluindo a Ilha de Reunião, em seguida, ilhas Maurícias, Madagascar, Mayotte e Seychelles (TSETSARKIN et al., 2007). Em 2007, esse alfavírus causou um surto de febre de chikungunya no Norte da Itália, sendo esse o primeiro relato de transmissão autóctone fora das áreas tropicais (SAMBRI et al., 2008). Desde então, o vírus reemergiu em países das regiões oeste e central da África e causou pequenos surtos na Europa (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Na França, identificou-se a primeira transmissão local de dois casos em 2010 (GOULD et al., 2010) e, a partir de 2011, na região do Pacífico (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016).

A preocupação com a dispersão e o estabelecimento do vírus nas Américas cresceu, sobretudo quando houve um surto com mais de 11.000 casos registrados na República Democrática do Congo em 2011 (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015). Somente em dezembro de 2013, dois casos de CHIKV autóctones foram confirmados em laboratório e detectados nas Américas, mais precisamente no território francês de Saint Martin, no mar do Caribe, de onde se dispersou para diversos países, nas Américas do Sul, Norte e Central (Figura 4). Desde então 1,7 milhão de casos suspeitos foram relatados com transmissão local em 46 países das Américas (WIMALASIRI-YAPA et al., 2019). Trata-se de uma reemergência após, aproximadamente, duzentos anos (HALSTEAD, 2015). Segundo Halstead:

O retorno do vírus chikungunya para as Américas oferece uma oportunidade para revisitar a epidemiologia desse togavírus zoonótico da África e para contrastá-lo com o dos vírus dengue, os flavivírus que são mantidos como zoonoses no Sudeste Asiático. Todos esses vírus podem ser transmitidos pelos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em um ciclo urbano. (HALSTEAD, 2015, p. 557, grifo do autor, tradução nossa).

**Figura 4** – Distribuição dos genótipos do vírus chikungunya das regiões Central, Leste e Sul da África (ECSA), asiático e linhagem do Oceano Índico (IOL) entre 2004 e 2015



Fonte: Weaver e Forrester (2015).

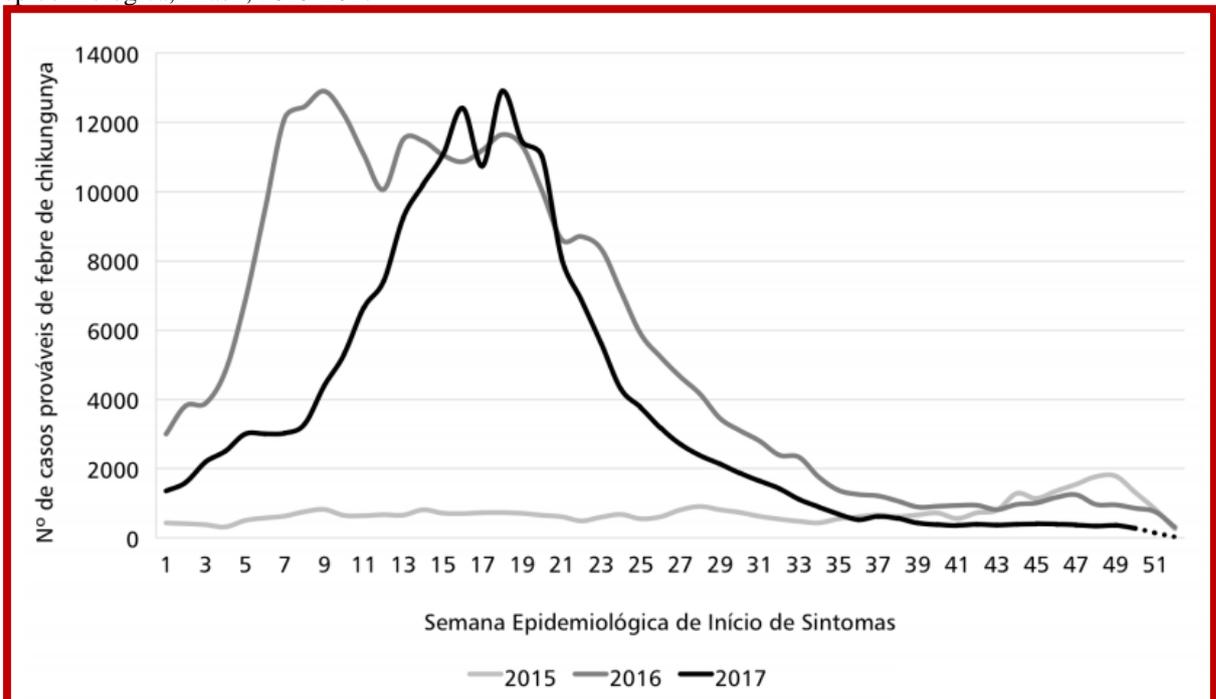
Legendas: ● linhagem leste/central / sul-africana (ECSA); ● linhagem asiática; ● linhagem do Oceano Índico (IOL).

No Brasil, a transmissão autóctone foi detectada em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque (Amapá). No mesmo ano (SE 37 a 53), foram notificados 3.657 casos autóctones suspeitos de febre chikungunya. Desses, foram confirmados 2.772 nos seguintes estados: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015). Em 2015, foram registrados 38.499 casos com taxa de incidência de 18,8 casos/100 mil hab., sendo 5.076 em Pernambuco (Tabela 2). Esses casos foram distribuídos em 704 municípios, dos quais, foram confirmados 17.971 (46,7%). Houve confirmação de 14 óbitos em 2015 por febre de chikungunya: na Bahia (5), Sergipe (2) e Pernambuco (7) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017).

Em 2016, notificaram-se 277.882 casos suspeitos de febre de chikungunya, sendo 50.139 em Pernambuco (incidência de 532,8 casos/100 mil hab. no estado) – Tabela 2. Do total de casos notificados no país, em 2016, foram confirmados 151.318 (55,7 %). No mesmo ano, foram

confirmados 196 óbitos, distribuídos em Pernambuco (58), Rio Grande do Norte (37), Paraíba (34), Ceará (26), Rio de Janeiro (13), Alagoas (6), Bahia (10), Maranhão (8), Piauí (1), Sergipe (2), Amapá (1), Piauí (1) e Distrito Federal (1) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017). Registraram-se 185.593 casos prováveis de CHIKV em 2017, sendo 1.787 em Pernambuco (incidência de 18,8 casos/100 mil hab.) - Tabela 2. Do total no país, 151.966 (81,8%) foram confirmados (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018a). A Figura 5 apresenta um gráfico comparativo de casos prováveis de chikungunya entre os anos de 2015 e 2017 por semana epidemiológica de início dos sintomas.

**Figura 5** – Gráfico representativo do número de casos prováveis de febre chikungunya por semana epidemiológica, Brasil, 2015-2017



Fonte: Boletim Epidemiológico [da] Secretaria de Vigilância em Saúde (2018b).

Como é possível observar na tabela 2, em 2018, foram 87.687 casos prováveis, com uma incidência de 42,1 casos/100 mil hab., sendo 1.200 em Pernambuco (taxa de incidência de 12,6 casos/100 mil hab.). Do total de casos registrados no país em 2018, foram confirmados 68.962 – 78,6 % (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019a).

Até a SE 52 de 2019, foram notificados 132.205 casos de infecção pelo CHIKV (taxa de incidência de 62,9 casos por 100 mil habitantes). O maior número concentrou-se nas regiões Sudeste e Nordeste, com 104,6 casos/100 mil habitantes e 59,4 casos/100 mil

habitantes respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020).

Até a SE 53 de 2020, foram notificados 82.419 casos prováveis (taxa de incidência de 39,2 casos por 100 mil hab.) de chikungunya no país, com maior concentração nas regiões Nordeste e Sudeste, com 103,4 casos/100 mil hab. e 24,1 casos/100 mil hab., respectivamente (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021a). Em Pernambuco, o número de casos notificados em 2020 foi de 5.335, representando um aumento de 77% e 43% em relação aos registrados em 2018 e 2019 respectivamente conforme (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020).

Conforme apresentado na tabela 2, os dados epidemiológicos obtidos da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco mostram um número maior de notificações de febre chikungunya, entre os anos 2016 e 2019.

**Tabela 2** – Número de casos prováveis e incidência de febre chikungunya no Brasil, por região e no estado de Pernambuco, 2015 a 2019, até a Semana Epidemiológica 52, e 2020 até a Semana Epidemiológica 53; Número de casos prováveis e confirmados de febre pelo vírus chikungunya no estado de Pernambuco, 2016 a 2019, até a semana epidemiológica 52

<b>Região/ Unidade da Federação</b>	<b>Número de casos prováveis (N)</b>						<b>Coefficiente de incidência/100 mil habitantes</b>					
	Ano	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2015	2016	2017	2018	2019
Norte*	1.280	9.019	16.489	9.315	4.347	828	7,3	50,9	90,7	51,2	23,6	4,5
Nordeste*	36.433	239.714	142.194	11.287	33.901	59.019	64,4	421,2	250,5	19,9	59,4	103,4
Pernambuco*	5.076	50.139	1.787	1.200	3.035	5.335	54,3	532,8	18,8	12,6	31,8	55,8
Sudeste*	495	25.245	22.730	52.966	92.414	21.265	0,6	29,2	25,9	60,4	104,6	24,1
Sul*	64	1.978	273	257	479	598	0,2	6,7	0,9	0,9	1,6	2,0
Centro-Oeste*	227	1.926	3.907	13.862	1.064	709	1,5	12,3	24,3	86,2	6,5	4
Brasil*	38.499	277.882	185.593	87.687	132.205	82.419	18,8	134,8	89,0	42,1	62,9	39,2
Pernambuco**	-	58.969	4.829	3.246	8.458	-	-	-	-	-	-	-
<b>Unidade da Federação</b>	<b>Número de casos confirmados (N)</b>											
Pernambuco**	-	26.133	988	557	989	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: \* Boletim Epidemiológico [da] Secretaria de Vigilância em Saúde (2018b, 2019a, 2019b, 2020, 2021a); \*\* Pernambuco (2017, 2018, 2019, 2020).

Estudiosos alertaram sobre o risco de estabelecimento desse arbovírus no continente americano já em 2007, após avaliar soro de viajantes que retornavam da Índia, durante a grande epidemia de CHIKV, que acometia aquele país em 2006. Os autores detectaram altos níveis de vírus infecciosos em viajantes norte-americanos e ressaltaram que os vetores primários para o CHIKV (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) estão estabelecidos em vários estados costeiros do Sudeste dos Estados Unidos (LANCIOTTI et al., 2007).

### 2.2.2 Caracterização genotípica e estrutura do vírus chikungunya

O CHIKV é um vírus de RNA de fita simples e sentido positivo, com aproximadamente 12 kb (KHAN et al., 2002). Apresenta-se em simetria icosaédrica, medindo cerca de 70 nm de diâmetro. Seu material genético codifica duas poliproteínas, sendo uma estrutural e uma não estrutural. Essas, após clivadas, dão origem a nove proteínas, das quais quatro estão envolvidas no processo de replicação do vírus (não estruturais), três formam o envelope viral (E1, E2 e E3) e uma o capsídeo (proteína C). O capsídeo é composto por 240 cópias da proteína C e é multifuncional nos alfavírus, tendo papel essencial no ciclo de vida do vírus. O invólucro externo do vírus é formado pela bicamada lipídica, com a proteína precursora de membrana (prM) e as glicoproteínas de envelope (THOMAS et al., 2010).

Esse alfavírus apresenta três principais genótipos já identificados, o asiático, o do oeste da África e o das regiões central, leste e sul da África (ECSA). O genótipo asiático foi o responsável pela epidemia em 43 países na América (LEPARC-GOFFART et al., 2014). Entretanto, desde 2005, o ECSA foi o responsável por mais de um milhão de casos nas ilhas do Oceano Índico, Ásia, África e alguns casos autóctones na Europa (THIBERVILLE et al., 2013). No Brasil, foram identificados os genótipos asiático, no estado do Amapá, e ECSA na Bahia (HONÓRIO et al., 2015).

A partir de uma substituição de aminoácidos na proteína do envelope do genótipo CHIKV ECSA (E1-A226V), uma linhagem denominada linhagem do Oceano Índico (IOL) foi selecionada por *Ae. albopictus* entre 2005 e 2006, quando o vírus se dispersou para a Ásia e ilhas do Oceano Índico (TSETSARKIN et al., 2007). Essa mutação reduziu de 40 a 100 vezes a dose de sangue infeccioso necessária para infectar o mosquito pelo CHIKV. A taxa de infecção aumentou de 50 a 100 vezes nessa espécie, que é abundante na região, o que desencadeou uma grande epidemia (WEAVER; FORRESTER, 2015).

### 2.2.3 Diagnóstico, prevenção e tratamento

A infecção pelo CHIKV causa uma doença que apresenta febre, dor de cabeça, náusea, vômito, mialgia, erupção cutânea e artralgia como principais sintomas na fase aguda. Aproximadamente metade dos casos evolui para a fase crônica, que atinge especialmente as articulações dos membros, com poliartralgia dolorosa e incapacitante (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016). Esses são sintomas semelhantes às manifestações clínicas da dengue na fase aguda, embora, na febre chikungunya, se observe o início súbito e maior intensidade das dores. Em 1955, Robinson (1955) relata mudança do nome da doença, até então denominada como dengue na Tanzânia, pela intensidade distinta das dores nas articulações e pelo início súbito dos sintomas. A doença ficou conhecida como chikungunya, que na língua *shi-makonde*, falada por um grupo étnico no sudeste da Tanzânia e norte de Moçambique, significa “aquele que se dobra” (POWERS et al., 2000).

A cocirculação do CHIKV e do DENV, em regiões endêmicas, pode resultar em diagnósticos equivocados, culminando em subnotificação. Desse modo, o diagnóstico diferencial é fundamental para nortear a vigilância e implementar medidas de controle. Esse diagnóstico é feito com base em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O laboratorial depende da qualidade, do volume e momento da obtenção da amostra durante a infecção, e pode ser feito pela identificação de anticorpos específicos do soro, pelo reconhecimento do RNA viral ou detecção direta do vírus. Uma amostra de soro obtida dentro de 7 dias do início dos sintomas apresenta grande quantidade de vírus, o que é indicado para diagnóstico por isolamento viral ou detecção do RNA por PCR. Essas técnicas têm a vantagem de ser altamente específicas e rápidas, mas dependem fundamentalmente do curso da infecção (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016).

Com relação ao tratamento, a opção terapêutica é o alívio dos sintomas com drogas anti-inflamatórias não esteroides e hidratação. Na fase aguda, em que as dores articulares permanecem, o uso de corticosteroides tem sido indicado (REISINGER et al., 2018).

Estudo recente demonstrou inibição da disseminação viral do CHIKV, em *Ae. aegypti* pré-tratados experimentalmente com genomas virais defeituosos do CHIKV. Esses genomas são rearranjos produzidos durante a replicação viral e podem ser antivirais de amplo espectro, com grande potencial imunoestimulatório, interferindo na replicação viral, em experimentos *in vitro*, tanto em células de mamíferos como em mosquitos (LEVI et al., 2021).

Ainda não há vacinas disponíveis embora algumas estejam em diferentes fases de experimentação. Considerando que, de modo geral, uma vacina deva atender à demanda de

países em desenvolvimento, é viável que seja de baixo custo e capaz de estimular proteção eficaz, com uma única aplicação (MADARIAGA; TICONA; RESURRECCION, 2016).

Uma vacina contra apenas uma cepa do CHIKV poderia trazer grande contribuição para o controle da doença, beneficiando populações que vivem em áreas endêmicas e os viajantes. Nesse sentido, pesquisadores realizaram experimento de fase 1 e 2 com a Chikungunya Vaccine (MV-CHIK). Trata-se de uma vacina viva, atenuada e recombinante, vetorizada com o sarampo. Esse vetor contém informações genéticas de genes estruturais do CHIKV, obtido em 2006, de um paciente da Ilha de Reunião, no Oceano Índico, na ilha de Madagascar. Os resultados da fase 1 mostraram que a vacina em teste tem alta imunogenicidade, segurança e tolerabilidade, mesmo com a imunidade preexistente ao sarampo. Na fase 2, a MV-CHIK foi bem tolerada e altamente imunogênica em voluntários entre 18 e 55 anos. Os experimentos de fase 3 estão em andamento (REISINGER et al., 2018).

Como já relatado para ZIKV na seção 2.1.2.2, até o momento, a única forma de proteção contra o CHIKV é através do controle de vetores e uso de medidas físicas de proteção.

#### **2.2.4 Transmissão do vírus chikungunya**

A transmissão do CHIKV ocorre em ciclos selváticos e urbanos. O primeiro, restrito a habitats florestais da África, envolve espécies do gênero *Aedes* (*Ae. furcifer-taylori*, *Ae. africanus* e *Ae. aegypti*) como vetores e pequenos mamíferos e primatas não humanos como reservatórios. O ciclo selvático pode produzir casos da doença em populações humanas que residem em áreas próximas da mata. O ciclo urbano é endêmico ou epidêmico, envolvendo os vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e humanos suscetíveis. A distribuição do vírus ocorre de acordo com a presença do vetor em áreas urbanas de clima tropical, subtropical e temperados. (RESTREPO-JARAMILLO, 2014). De modo geral, *Ae. aegypti* está distribuído em regiões tropicais e subtropicais, enquanto *Ae. albopictus* pode ser encontrado tanto em climas quentes como temperados (POWELL; TABACHNICK, 2013).

Apesar da espécie *Ae. aegypti* ser a principal incriminada na transmissão do CHIKV, durante a epidemia de 2005-2006, na ilha da Reunião, a espécie *Ae. albopictus* foi o vetor responsável pela transmissão entre humanos (ENSERINK, 2006) em consequência da mutação que surgiu nesse período no gene da proteína do envelope (E1-A226V) do genótipo ECSA. Essa substituição de aminoácidos favoreceu o *fitness* do vírus para *Ae. albopictus*,

potencializando a transmissão do CHIKV por essa espécie e contribuindo para a manutenção e grande dimensão da epidemia (TSETSARKIN et al., 2007).

Recentemente, populações de *Ae. albopictus* da Itália foram avaliadas em relação à competência vetorial quanto ao genótipo mutante E1-226V, responsável pelo surto ocorrido em 2007 naquele país. Os achados mostraram que elas foram suscetíveis ao CHIKV (SEVERINI et al., 2018) embora se tenha verificado, em outro estudo, que essa troca de aminoácidos provavelmente não é fator determinante para o bom desempenho do vírus em *Ae. albopictus*, pois não encontraram diferenças significativas entre as duas linhagens (com e sem a mutação E1: A226V), avaliando a mesma espécie de mosquitos da Itália (FORTUNA et al., 2018).

Esses dados corroboram outros que descrevem diferentes padrões de transmissão, de modo que a epidemiologia do CHIKV, em uma determinada região, é fortemente influenciada por cepas de vírus e espécies de mosquitos presentes no local (SAM et al., 2012).

Após a identificação do CHIKV nas Américas, verificou-se, em 2013, maior incidência de febre chikungunya em relação à dengue entre os anos 2013 e 2014, sugerindo que a ineficiência no controle populacional do *Ae. aegypti* na América Latina e a consequente infestação dessa espécie na região proporcionaram um ambiente favorável para o rápido estabelecimento do CHIKV (FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2015). Segundo Agha et al. (2017), deve ser priorizada a vigilância e o controle do *Ae. aegypti* em regiões onde o risco de emergência do CHIKV for alto.

Desse modo, estudos vêm sendo desenvolvidos na perspectiva de fechar lacunas no conhecimento sobre a dinâmica de transmissão do CHIKV e contribuir para definição de estratégias de controle mais eficazes (AMRAOUI et al., 2019; FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2015; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015; RIEMERSMA; COFFEY, 2019; VEGA-RÚA et al., 2014). Entretanto, a possibilidade de envolvimento de mosquitos de outros gêneros não está sendo investigada. Alguns poucos estudos prévios incluíram espécies do gênero *Culex* na avaliação de taxas de infecção e de transmissão (JUPP et al., 1981) ou avaliaram a infecção natural dessas espécies pelo CHIKV (DIALLO et al., 1999; ROZILAWATI et al., 2011). DIALLO et al. (1999) chegaram a isolar o vírus de espécies do gênero *Culex* e encontraram a maior taxa de infecção mínima (TIM) – número de cepas de vírus isoladas/número de mosquitos capturados – para a espécie *Culex ethiopicus*, comparando-se com as espécies de *Aedes* (DIALLO et al., 1999).

Com relação à transmissão vertical do CHIKV nas espécies vetoras, há muitas divergências entre os estudos (HONÓRIO et al., 2019; SEVERINI et al., 2018), embora ela já

tenha sido demonstrada experimentalmente (AGARWAL et al., 2014; BELLINI et al., 2012; HONÓRIO et al., 2019) e através da identificação do vírus em amostras naturais de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (THAVARA et al., 2009). Segundo Mavale et al. (2010), por meio da transmissão vertical entre duas gerações de uma espécie vetora, os machos podem estar naturalmente infectados, sendo esse um mecanismo de manutenção do vírus em períodos interepidêmicos, uma vez que relatos apontam transmissão sexual do patógeno para fêmeas no ato do acasalamento. Acredita-se que machos infectados mantêm o vírus sem causar surtos na população humana, porém a fêmea infectada venereamente pode iniciar um ciclo de transmissão em um determinado contexto epidemiológico (MAVALE et al., 2010).

Diante do exposto, fica evidente a preocupação com relação à distribuição explosiva do CHIKV globalmente, sobretudo pela sobreposição com o DENV e pela plasticidade entre os arbovírus para adaptação a novos vetores (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015).

O Quadro 2 sistematiza os principais estudos que abordaram a transmissão do CHIKV, desenvolvidos no período de 2007 a 2021, contemplando as espécies e linhagens estudadas, sua origem, tipo de experimento realizado, resultados encontrados e principais conclusões.

**Quadro 2** – Estudos sobre transmissão do CHIKV realizados no período 2007-2021

(continua)

Espécie de mosquito e origem	Linhagem do CHIKV origem	Tipo de experimento/ infecção	Principais resultados	Referência
<i>Ae. aegypti</i> - Rexville D <i>Ae. albopictus</i> - Galveston	Genótipo ECSA: mutante - E1-226V e pré-endêmico - E1-226 <sup>a</sup> ; Genótipo oeste da África	Infecção oral de mosquitos e competição viral em modelos de transmissão animal	A mutação E1-A226V, do genótipo ECSA, favoreceu o fitness do vírus em <i>Ae. albopictus</i> ; o melhor desempenho da infecção está associado à dependência do CHIKV com relação ao colesterol na membrana celular do mosquito; a mutação potencializou a transmissão por <i>Ae. albopictus</i> e contribuiu para a dimensão da epidemia.	Tsetsarkin et al. (2007)
<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> - Songkhla, Tailândia	-	Avaliação de amostras de mosquitos coletados em campo	-Dezenove de 118 pools (16%) positivos para CHIKV:10 <i>Ae. aegypti</i> (6 machos e 4 fêmeas) e 9 <i>Ae. albopictus</i> (2 machos e 7 fêmeas); - taxa de infecção relativa de machos e fêmeas <i>Ae. albopictus</i> : 100% e 47%; em <i>Ae. aegypti</i> : 21% e 5% respectivamente.	Thavara et al. (2009)
<i>Ae. albopictus</i> - Ilha de Reunião	Genótipo ECSA - CHIKV (CHIKV 06.21)	Infecção artificial oral para avaliação da transmissão vertical	1.675 espécimes do primeiro ciclo gonadotrófico e 1.709 do segundo sem detecção de partículas virais ou RNA viral.	Vazeille, Mousson e Failloux (2009)

Quadro 2 – Estudos sobre transmissão do CHIKV realizados no período 2007-2021

(continuação)

Espécie de mosquito e origem	Linhagem do CHIKV origem	Tipo de experimento/ infecção	Principais resultados	Referência
<i>Ae. albopictus</i> ; <i>Culex</i> sp.; <i>Armigeres</i> sp. e <i>Anopheles</i> sp. Kelantan, Malásia	-	Avaliação de amostras de mosquitos coletados em campo	640 pools testados e nenhum positivo para CHIKV; <i>Ae. albopictus</i> foi a mais abundante, seguida de <i>Armigeres</i> sp. e <i>Anopheles</i> sp.	Rozilawati et al. (2011)
<i>Ae. albopictus</i> - Itália	Genótipo ECSA - A (ITA07-RA1): isolada de mosquito B (ITA7-BIO 07): isolada de paciente virêmico Ravenna, Itália	Infecção artificial oral para avaliação da transmissão vertical	- CHIKV foi detectado em uma fêmea e dois machos da progênie, de um total de 318 e 371 analisadas; - todos obtidos durante o segundo ciclo gonadotrófico; - a transmissão vertical é um evento raro nas condições analisadas; - um período é necessário para que os ovaríolos sejam infectados, pois só foram detectados positivos na progênie do segundo ciclo gonadotrófico.	Bellini et al., (2012)
<i>Ae. aegypti</i> - Universidade de Malaya, Kuala Lumpur <i>Ae. albopictus</i> - Bangsar Malásia	Genótipo asiático ((MY/06/37348 e MY/06/37350) e genótipo ECSA (MY/08/065 e MY/08/068) Malásia	Infecção artificial oral; isolamento e replicação viral <i>in vitro</i> ; sequenciamento	<i>Ae. albopictus</i> , em relação ao <i>Ae. aegypti</i> , foi o vetor mais competente experimentalmente para os dois genótipos; a genótipo ECSA replicou melhor em <i>Ae. albopictus</i> do que o asiático; a inverso ocorreu com <i>Ae. aegypti</i> , em que o genótipo asiático mostrou maior adaptação ao vetor.	Sam et al. (2012)
22 populações de <i>Ae. aegypti</i> e 13 de <i>Ae. albopictus</i> de 10 países das Américas do Norte, Sul e Central	CHIKV_0621 - ECSA (E1-226V e E1-98A) e CHIKV_115 - ECSA (E1-226A e E1-98A) – Ilha da Reunião CHIKV_NC – Genótipo Asiático (E1-226A e E1-98T) Nova Caledônia  Utilizadas linhagens com e sem mutação	Infecção artificial oral para avaliação de competência	100% de disseminação para todas as populações testadas, independente da linhagem do vírus; transmissão diferente entre as populações de ambas as espécies, mas todas com competência para transmitir; com taxas de 83.3% para <i>Ae. aegypti</i> e 96.7% para <i>Ae. albopictus</i> ; <i>Ae. albopictus</i> : melhor competência para transmitir a linhagem mutante CHIKV_0621 (ECSA), que <i>Ae. aegypti</i> ; <i>Ae. aegypti</i> : foi mais competente para transmitir ECSA CHIKV_115 e CHIKV_NC do genótipo asiático; a barreira das glândulas salivares tem papel importante na determinação da competência vetorial.	Vega-Rúa et al. (2014)

Quadro 2 – Estudos sobre transmissão do CHIKV realizados no período 2007-2021

(continuação)

Espécie de mosquito e origem	Linhagem do CHIKV origem	Tipo de experimento/ infecção	Principais resultados	Referência
Três populações de <i>Ae. aegypti</i> Mombaça, Nairóbi e Kisumu Quênia	Lamu 001 (ECSA) Ilha Lamu, Quênia	Infecção artificial oral para avaliação de competência	Taxa de infecção aumentou com a carga viral ingerida, sendo muito baixa quando essa carga foi $\leq 10^{5.9}$ PFU/ml; período de incubação extrínseco (PIE) de 5 a 7 DPE, quando a carga viral foi $\geq 10^{5.9}$ PFU/ml; disseminação e transmissão detectadas apenas quando a carga viral foi $\geq 10^{5.9}$ PFU/ml; nível de viremia: importante na avaliação de competência vetorial.	Agha et al. (2017)
Oito populações de <i>Ae. albopictus</i> Itália	CHIKV/ISS-2007/paciente G.P./M2V2 (E1-226V) – linhagem mutante Emilia Romagna, Itália	Infecção artificial oral para determinação da competência e transmissão vertical	Alta taxa de infecção a partir do 3 DPE (67% a 100%); taxa de disseminação de 60% no 7 DPE e de 67%-100% no 12 DPE, com valor cumulativo de 73-91%, nas oito populações; taxas de transmissão de 23, 40 e 31% em três populações avaliadas; alto título do vírus encontrado na saliva de fêmeas de uma das populações estudadas ( $2.3 \log_{10}$ PFUeq/mL), no 3 DPE, confirmando o curto PIE do CHIKV em <i>Ae. albopictus</i> ; transmissão vertical não detectada nos 1º e 2º ciclos gonadotróficos	Severini et al. (2018)
<i>Ae. albopictus</i> Scalea, região de Calabria, Itália	CHIKVE1:A226V (ECSA IOL) – linhagem mutante Emilia Romagna, Itália CHIKVE1 (ECSA IOL) – linhagem sem mutação Lazio e regiões de Calabria, Itália	Infecção artificial oral para avaliação de competência	PIE curto, com vírus detectado na saliva a partir do 3 DPE ( $0.94 \pm 0.57 \log_{10}$ PFU/mL para CHIKVE1:A226V e $1.08 \pm 0.31 \log_{10}$ PFU/mL, para CHIKVE1; disseminação de 100% para CHIKVE1:A226V e de 75% a 100% para CHIKVE1; presença do vírus na saliva de ambas as linhagens até o 20 DPE; competência vetorial similar com ou sem a mutação.	Fortuna et al. (2018)
<i>Ae. albopictus</i> Marrocos, norte da África	CHIKV (06.21) Ilha da Reunião	Infecção artificial oral para avaliação de competência	Taxa de infecção de 93% no 3 DPE, 86.7% no 14 DPE e 90 % no 21 DPE; disseminação de 28.6% no 3 DPE, 53.3% no 7 DPE, 65.4% no 14 DPE e em torno de 80% no 21 DPE; taxa de transmissão de 37.5%, 68.7%, 35.3% e 17.4%, nos 3, 7, 14 e 21 DPE respectivamente; é provável que o CHIKV, assim como outros arbovírus se estabeleçam em ciclos de transmissão em Marrocos, pela recente introdução do <i>Ae. albopictus</i> .	Amraoui et al. (2019)

**Quadro 2** – Estudos sobre transmissão do CHIKV realizados no período 2007-2021

(conclusão)

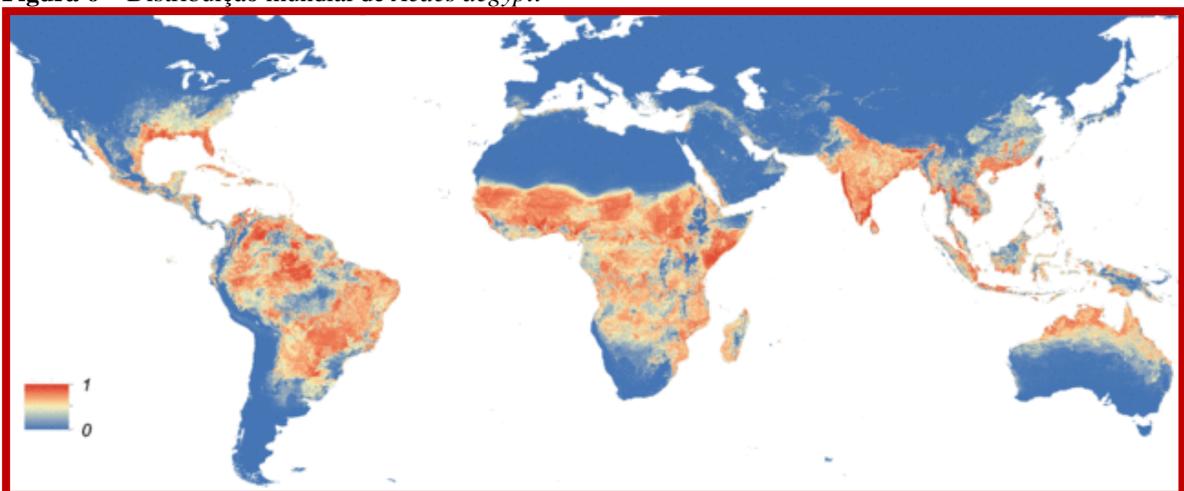
Espécie de mosquito e origem	Linhagem do CHIKV origem	Tipo de experimento/ infecção	Principais resultados	Referência
<i>Ae. albopictus</i> - Rio de Janeiro Brasil,	Linhagem asiática – Ilhas Virgens Britânicas, Caribe	Infecção artificial oral para avaliação da transmissão vertical	- Brasil: um pool de fêmeas e quatro pools de machos da progênie positivos (taxa mínima de infecção, MIR, de 0,76% e 2,86% respectivamente); - Flórida, apenas um pool de machos foi positivo (MIR ode 1.06%).	Honório et al. (2019)
<i>Ae. aegypti</i> Los Angeles, Califórnia - EUA	linhagem CHIKV do Oceano Índico (IOL CHIKV 06-049 acesso GenBank AM258994.1	Infecção artificial oral para avaliação de competência	<i>Ae. aegypti</i> : altamente competente para o CHIKV; populações intravetores de CHIKV passam por seleção purificadora e regiões não codificadoras são preservadas.	Riemersma; Coffey (2019)
<i>Ae. albopictus</i> Nordeste dos Estados Unidos: Nova York e Connecticut	Linhagens CHIKV IDR140025461 - República Dominicana e LR2006OPY1 (GenBank: KT449801.1) – Ilha da Reunião	Infecção artificial oral para avaliação de competência	Alta taxa de infecção de <i>Ae. albopictus</i> com ambas as linhagens de CHIKV (4° DPE: >70%); a taxa de disseminação foi entre 30 e 100%, após o 14° DPE, e variou entre os DPE, linhagens de vírus e de mosquitos; amostras de saliva foram positivas no 4° DPE. A maior taxa de disseminação foi detectada no 7° DPE.	Gloria-Soria et al. (2020)
<i>Cx. quinquefasciatus</i> Bangkok Tailândia	linhagem CHIKV do Oceano Índico (IOL CHIKV-PCHIK2019	Avaliação de amostras de mosquitos coletados em campo e Infecção artificial oral para avaliação de competência	<i>Cx. quinquefasciatus</i> : oito de 27 fêmeas capturadas em campo foram positivas para IOL CHIKV e 99-100% de identidade e 100% de cobertura total de seqüências semelhantes ao CHIKV isolado de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> em Bangkok; RNA viral não foi detectado em amostras masculinas usando nested-RT-PCR. Cepa de laboratório de <i>Cx. quinquefasciatus</i> , após infecção artificial: RNA do CHIKV detectado até o dia 4 após a infecção; não houve disseminação ou transmissão do CHIKV em <i>Cx. quinquefasciatus</i> e efeito citopático (CPE) não foi observado em células C6 / 36; CHIKV detectado em <i>Cx. quinquefasciatus</i> , mas essa espécie não tem competência para transmissão da linhagem estudada na Tailândia.	Phumee et al. (2021)

Fonte: A autora, 2021.

### 2.3 *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) é uma espécie de mosquito classificada na classe Insecta; ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Culicinae e subgênero *Stegomyia* (FORATTINI, 1962). Faz parte de um gênero muito grande, que apresenta características variáveis, sendo considerado polimórfico e de difícil classificação (TANAKA; MIZUSAWA; SAUGSTAD, 1979). Foi originalmente identificado no Egito, continente africano, de onde se dispersou mundialmente (CLEMETS, 1992; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Ocorre, sobretudo, nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 6) e está plenamente adaptada ao ambiente urbano (CLEMETS, 1992). Há evidências de que o ancestral da forma doméstica vivia na África Subsaariana. Animais silvestres eram sua fonte sanguínea e o habitat larval provavelmente eram o tronco de árvores onde havia acúmulo de água. A forma ancestral ainda existe nas florestas da África Subsaariana (LOUNIBOS, 1981) e é denominada *Ae. aegypti formosus*, uma subespécie. Apresenta uma morfologia mais escura que a forma urbana, embora a variação de cores e padrões de escala de *Ae. aegypti* esteja relacionada com a grande quantidade de sinônimos entre diferentes espécies (MCCLELLAND, 1974). Embora indicadores de diversidade genética suportem *Ae. aegypti* na África como a forma ancestral da espécie, estudo sugere que a domesticação na África ocorreu independentemente daquelas observadas em populações dos demais continentes (BROWN et al., 2011).

**Figura 6** – Distribuição mundial de *Aedes aegypti*



Fonte: Augusto (2017).

O mosquito *Ae. aegypti* é uma espécie *r*-estrategista, de hábito diurno, com alto grau de antropofilia, que realiza seu repasto sanguíneo preferencialmente ao amanhecer e

entardecer (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). São holometábolos, pois seu ciclo de vida ocorre por metamorfose completa, passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adultos (alados), com duração de aproximadamente 10 dias. No estágio de larva, passam ainda pelos estágios de L1, L2, L3 e L4. Os ovos são resistentes a dessecação, permanecendo viáveis por longos períodos de quiescência, o que dificulta as ações de controle e favorece a sobrevivência do inseto (SILVA; SILVA, 1999).

As fêmeas depositam os ovos nas paredes internas de criadouros naturais (bromélias, troncos de árvores, bambus, casca de frutas e axilas das folhas) ou artificiais (pneus abandonados, vasos de planta, reservatórios de água potável). Essa espécie não tem concordância gonadotrófica, de modo que buscam o repasto sanguíneo com uma frequência que independe do ciclo gonadotrófico (BARATA et al., 2001). Criadouros caracterizam-se por serem locais onde há acúmulo de água, de modo que propiciem ambiente para deposição dos ovos e o desenvolvimento do inseto nos estágios aquáticos (FORATTINI, 1962).

Morfologicamente, o *Ae. aegypti* apresenta-se com uma coloração escura e caracteriza-se pela presença de escamas prateadas, distribuídas no corpo, formando listras e manchas. No tórax, essas escamas formam o desenho de uma lira (Figura 7).

**Figura 7** – Díptero, Culicídeo da espécie *Aedes aegypti*



Fonte: Pinheiro (2021).

A disseminação e o estabelecimento dessa espécie, em várias partes do mundo, associam-se estreitamente à ocupação desordenada do espaço urbano, ao processo de globalização, bem como à facilidade de deslocamento de pessoas e produtos (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). Introduzido nas Américas por meio do tráfico negreiro

durante o período colonial (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994), o *Ae. aegypti* estabeleceu-se e, hoje, está distribuído pelos 27 estados da Federação Brasileira.

Por ser vetor de diversos arbovírus de grande importância para a saúde pública global, pela recente emergência de algumas doenças transmitidas por mosquitos vetores e, sobretudo, pela sua plasticidade para adaptação a novos ambientes, o *Ae. aegypti* tem sido alvo de muitos estudos e intervenções das esferas governamentais, na perspectiva de controlar a incidência da população vetora em áreas endêmicas ou de risco. Arboviroses como chikungunya, febre do Oeste do Nilo e Zika têm-se expandido aceleradamente nos últimos 10 anos, especialmente em países das Américas (LIMA-CAMARA, 2016).

No Brasil, adotaram-se várias estratégias de controle desde 1902, quando Oswaldo Cruz instituiu as brigadas sanitárias na perspectiva de identificar e eliminar os criadouros do *Ae. aegypti* (BRAGA; VALLE, 2007). Posteriormente, o Brasil participou do programa de erradicação continental em 1947 (SOPER, 1965) e teve êxito na primeira etapa de eliminação dessa espécie em 1955 (FRANCO, 1969). A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a OMS coordenaram esse processo por meio do Programa de Erradicação de *Ae. aegypti* no Hemisfério Oeste. Em 1958, na XV Conferência Sanitária Pan-Americana, em Porto Rico, oficializou-se a erradicação do mosquito no Brasil (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Entretanto, já em 1976, a fragilidade dos sistemas de vigilância à saúde, associada ao processo de urbanização acelerado, culminaram na reintrodução do vetor no país (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2003).

Em 1996, o Ministério da Saúde criou o Programa de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). Entre 1981 e 1982, houve uma explosão do número de casos de dengue no estado de Roraima, considerada a primeira epidemia laboratorialmente registrada no país, com circulação dos sorotipos 1 e 4 (OSANAI et al, 1983). Após essa, seguiram-se mais três epidemias no território brasileiro: a primeira, no período de 1986 a 1987, que apresentou incidências de 35,2 (1986) a 65,1 (1987) casos por 100 mil habitantes, com circulação do sorotipo 1. A segunda, entre 1990-1991, com maior incidência no Ceará (249,1 casos/100.000 hab.) e Rio de Janeiro (613,8 casos/100.000 hab.), causada pelo sorotipo 2. E, a partir de 1994, uma rápida dispersão do vetor propiciou a circulação do DENV em maior número de Estados, o que desencadeou a terceira epidemia entre 1997 e 1998. Em 2001, o sorotipo 3 foi introduzido no Rio de Janeiro, e em 2002, foram registrados no país em torno de 800 mil casos da doença, com 150 óbitos por dengue hemorrágica (BRAGA; VALLE, 2007). O sorotipo 4 foi reintroduzido em 2010, após 28 anos

sem a detecção na cidade de Boa Vista, Roraima, e se dispersou rapidamente para outros estados do país (TEMPORÃO, 2011).

Após o PEAA, seguiu-se a estruturação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) em meados de 2001 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001), e o atual Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Esse último também não tem conseguido controlar os altos índices de infestação do vetor, o que efetivamente evidencia a necessidade do desenvolvimento de um processo de mobilização sustentável, com a participação descentralizada da sociedade e consequente contribuição das várias pessoas envolvidas nos diversos níveis de atuação necessários em um programa de controle de endemias (CRESPO et al., 2012).

#### 2.4 *Culex quinquefasciatus*

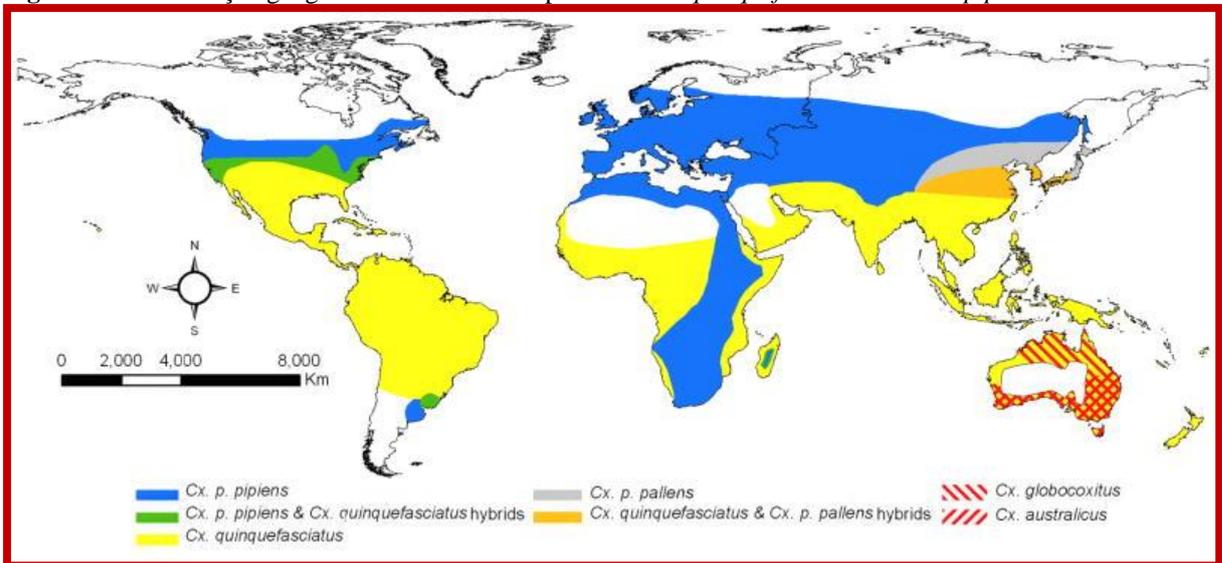
*Culex quinquefasciatus* Say, 1823, também conhecido como *Culex fatigans* (HARBACH, 2012) e, vulgarmente, como pernilongo, muriçoca ou carapanã (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994), é um mosquito de distribuição cosmopolita, taxonomicamente classificado na classe Insecta; ordem Díptera; família Culicidae; gênero *Culex*; subgênero *Culex* (FORATTINI, 1962). Há muita controvérsia com relação à classificação das espécies do gênero *Culex* uma vez que apresentam características morfológicas muito semelhantes. Seus indivíduos estão distribuídos mundialmente e, muitas vezes, geram híbridos, por estarem coabitando a mesma região (HARBACH, 2012).

A espécie *Cx. quinquefasciatus* está bem estabelecida nas regiões tropicais e subtropicais do globo, compreendendo as planícies africanas, Américas, Ásia e Austrália (Figura 8), com a espécie *Culex pipiens*, que também está presente em muitas áreas habitadas do mundo (FARAJOLLAHI et al., 2011). A baixa diversidade nas Américas aponta para uma recente introdução do *Cx. quinquefasciatus*, entretanto, sua origem ainda não está bem esclarecida (FONSECA et al., 2006). Estudo sugere que tenha sido do Oeste da África (ROSS, 1964), entretanto, isso é pouco provável, uma vez que a espécie não tenha sido identificada antes de 1942 naquela região (MATTINGLY, 1963).

São insetos holometábolos, pois realizam metamorfose completa em seu ciclo de vida, que compreendem os estágios de ovo, larva, pupa e adultos (alados), com duração de aproximadamente dez dias. Seus ovos são postos agrupados, em forma de jangada, e cada um deles tem uma gotícula apical de feromônio, que funciona como atraente para postura de

outras fêmeas no mesmo criadouro (SUBRA, 1981). Diferentemente de espécies do gênero *Aedes*, os ovos de *Culex* não resistem à dessecação.

**Figura 8** – Distribuição geográfica mundial das espécies *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens*



Fonte: Farajollahi et al. (2011).

Por outro lado, apresentam uma vantagem, pois são postos agrupados, formando estrutura semelhante a uma jangada, o que confere proteção contra o ataque com inseticidas, uma vez que apenas duas dimensões estariam vulneráveis (MATTINGLY, 1963). No estágio de larva, passam ainda pelos estádios de L1, L2, L3 e L4. Na fase adulta, apresentam corpo de tamanho médio, de cor parda (FORATTINI, 1962). Observemos a Figura 9.

**Figura 9** – Díptero, culicídeo da espécie *Culex quinquefasciatus*



Fonte: Gathany (20--).

As fases de ovo, larva e pupa (estágios imaturos) desenvolvem-se em águas com elevada carga de matéria orgânica, entretanto, na ausência destas, podem desenvolver-se em águas com baixo teor de resíduos orgânicos (SUBRA, 1981). O pico de densidade populacional ocorre entre os meses quentes e chuvosos, como consequência do acúmulo de água no solo (BARBOSA; REGIS, 2011; STRICKMAN, 1988).

De hábito noturno, sua atividade hematofágica ocorre no crepúsculo vespertino, com pico em torno da meia-noite. Diferentemente de *Aedes* sp, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* apresentam concordância gonadotrófica, com deposição de todos os ovos de cada ciclo, após cada repasto sanguíneo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Apresenta concordância gonadotrófica, assim, necessita de repasto sanguíneo para que ocorra a postura subsequente (CLEMENTS, 1992).

*Cx. quinquefasciatus* é vetor de vários patógenos de importância na saúde pública em diversas partes do mundo, incluindo o verme filarial, *Wuchereria bancrofti*, do qual é o principal vetor nas Américas (WHITE, 1989). A espécie é também vetora de arbovírus como o da encefalite Saint Louis (FORATTINI, 2002); do Nilo Ocidental (SARDELIS et al., 2001); Rift Valley; Sindbis (TURELL, 2012) e Oropouche (ROSA et al., 1996).

Mattingly (1963) ressalta a importância e necessidade de estudos sobre essa espécie, considerando sua plasticidade genética para resistir a inseticidas, sua elevada densidade em áreas urbanas e sua implicação na transmissão de diversos patógenos. Além de ser a espécie mais bem-sucedida entre aquelas consideradas invasoras domiciliadas, sendo capaz de se reproduzir utilizando criadouros artificiais poluídos organicamente, como fossas, canaletas e esgotos abertos.

É considerado altamente antropofílico, de hábito endofílico, sendo o mais frequente no Brasil, onde essa espécie está distribuída por todo o território (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A falta de saneamento resulta no acúmulo de águas servidas e, conseqüentemente, favorece a sua reprodução. Estudo realizado no estado de São Paulo aponta a predominância dos machos em abrigos, às margens dos criadouros, enquanto as fêmeas abandonam esses locais em busca de fonte sanguínea, predominando no interior das habitações, o que aumenta o risco de transmissão de patógenos (LAPORTA; URBINATTI; NATAL, 2006). Só recentemente, estratégias direcionadas ao controle populacional de *Cx. quinquefasciatus* vêm sendo adotadas no Brasil (BRASIL, 2011), apesar de o programa global de eliminação da Filariose Linfática (FL) haver sido instituído pela OMS desde 1997. Ressalta-se o fato de que o controle vetorial não foi uma prioridade naquele contexto. Considera-se, entretanto, que a proposta de eliminação da FL tenha sido beneficiada em suas metas, em decorrência de medidas adotadas

para controle de vetores de outros patógenos, como o vírus dengue por exemplo (BRASIL, 2009).

Por considerar a possibilidade de introdução do vírus do WNV no Brasil, em virtude da chegada aos Estados Unidos em 1999, e expansão para o Canadá, México, Colômbia, Venezuela e Argentina, elaborou-se pelo Ministério da Saúde um *Guia de Vigilância do Cx. quinquefasciatus* (BRASIL, 2011). A capacidade vetorial e ampla dispersão do vetor, presente em abundância no país, reforçou a necessidade de definição de estratégias eficazes de enfrentamento de uma possível chegada do vírus do WNV. Desse modo, pela alta capacidade reprodutiva de *Cx. quinquefasciatus* e por seu curto ciclo de vida, é fundamental a manutenção de forte pressão de controle por meio de diferentes estratégias. Esse *Guia de Vigilância* apresentou um plano de ação em três fases fundamentais, que teve seus pilares sustentados pelos princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP): diagnóstico situacional; definição da estratégia de controle e implementação e avaliação das ações (BRASIL, 2011).

Embora se tenham realizado algumas ações para o controle populacional do mosquito mais abundante no Brasil, não há um programa voltado para o controle de *Culex*, de modo que ainda há muito por fazer, sobretudo com relação à infraestrutura sanitária nas cidades brasileiras. A precariedade de saneamento básico é fator determinante para manutenção da alta infestação de *Cx. quinquefasciatus* em ambientes urbanos (LAPORTA; URBINATTI; NATAL, 2006).

## 2.5 CAPACIDADE VETORIAL

O conhecimento sobre a implicação de espécies de culicídeos na transmissão de patógenos teve avanços desde os últimos 120 anos, quando Walter Reed, Carroll, Lazear e Aristides Agramonte, em 1900, demonstraram que o vírus da febre amarela era transmitido por mosquitos. À época, James Carrol dispôs-se a servir como isca humana para mosquitos *Ae. aegypti* infectados com o vírus, de modo que chegou a contrair a doença, com subsequente recuperação (TABACHNICK, 2013). Esses e muitos outros estudos trouxeram grande contribuição para o conhecimento sobre diferentes espécies de mosquitos e seu papel na transmissão de patógenos, sobretudo, em relação aos fatores determinantes e à variação intraespecífica na competência vetorial (DIALLO et al., 1999; DUFFY et al., 2009; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015; HUANG et al., 2016; ROSS, 1956; ROUNDY et al., 2017; STYER et al., 2011; TABACHNICK, 2013; TSETSARKIN et al., 2007; TURELL, 2012).

Contudo, a maioria das investigações desenvolvidas até o momento deixam lacunas no conhecimento acerca da dinâmica de transmissão de patógenos por mosquitos vetores, por contemplarem apenas a competência vetorial em suas análises. Esta por sua vez, ocorre em função de fatores intrínsecos à espécie vetora, determinados por sua genética e pode ser definida como: “a razão entre o número de fêmeas de mosquitos ensaiados num hospedeiro potencialmente infectante e o número desses indivíduos que de facto infectam hospedeiros susceptíveis, uma vez transcorrido o correspondente período de incubação extrínseco” (ALMEIDA, 2011).

### 2.5.1 Definição e fatores determinantes da capacidade vetorial

A competência vetorial é um dos componentes de um conjunto de parâmetros específicos que definem a capacidade vetorial (CV). Esse conjunto de parâmetros, organizados em uma expressão matemática (DYE, 1990), quantificam a habilidade de uma espécie para transmitir um patógeno em um determinado tempo e espaço (GARRET-JONES, 1964):

$$CV = \frac{mbca^2 P^n}{Ln(P)}$$

Onde: *CV* é a capacidade vetorial; *m* é o número de fêmeas de mosquito por pessoa; *b* é a probabilidade de um mosquito infectado transmitir o patógeno ao picar um hospedeiro humano suscetível; *c* é a probabilidade de um mosquito se infectar com o patógeno enquanto pica um hospedeiro humano infectado; *a* é o número de picadas por ser humano por dia; *P* é a taxa de sobrevivência diária do mosquito e *n* é o período de incubação extrínseco (PIE) do parasito. Assim, a capacidade vetorial é conceituada como: “o número de novas infecções (contatos potencialmente infecciosos) produzidos pelo vetor por caso, por dia (por pessoa infecciosa, por dia)” (GARRET-JONES, 1964).

O conceito de capacidade vetorial foi proposto para estimar a capacidade de espécies de *Anopheles* para transmitir o *Plasmodium*, patógeno causador da malária. Entretanto, foi extrapolado para os vetores do DENV (GARRET-JONES, 1964). Desse modo, não contempla peculiaridades da interação patógeno e vetor, como a transmissão vertical de arbovírus nas espécies de *Aedes* sp. por exemplo. Nesse caso deve-se considerar que as fêmeas de *Aedes* sp.

não precisam de dois eventos de alimentação sanguínea para contrair e transmitir o vírus, pois podem adquirir o patógeno da sua geração parental (ARUNACHALAN et al., 2008).

Parâmetros ecológicos, ambientais (temperatura e umidade), de comportamento (preferência alimentar) e biológicos (duração do ciclo gonadotrófico, concordância gonadotrófica, capacidade reprodutiva, idade da fêmea no momento da infecção e custo biológico da infecção na espécie vetora) não são descritos classicamente na equação que estima a capacidade vetorial, embora tenham papel importante na determinação da dinâmica de transmissão (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; MACIEL-DE-FREITAS, 2010; ONYANGO et al., 2020). Assim, há de se considerar esses fatores e a heterogeneidade do desempenho biológico das espécies envolvidas em diferentes sistemas de transmissão de doenças por vetores, pois esses podem alterar a predição de ocorrência de surtos (MAYTON et al., 2019). Uma espécie altamente competente, por exemplo, pode não ter capacidade vetorial se sua taxa de picadas for baixa ou se sua vida for menor que o período de incubação extrínseco (PIE) do vírus. Por outro lado, uma espécie pouco competente pode ser responsável pela propagação de um arbovírus, como relatado para o da febre amarela, que causou epidemia na Nigéria em 1987, transmitido por uma população de *Ae. aegypti* pouco competente (MILLER et al., 1989).

### 2.5.2 Desempenho biológico e interação vetor-parasito

Entre os aspectos que compõem o desempenho biológico ou *fitness* de uma espécie, estão aqueles relacionados com a capacidade reprodutiva e de sobrevivência, compreendendo viabilidade, sucesso de acasalamento, fecundidade, que contribuem para que determinados indivíduos deixem determinado número de descendentes. Na área de genética de populações, o termo *fitness* vem sendo utilizado de diferentes formas. O conceito compartilhado entre os estudiosos da área resume o termo como a capacidade de sobrevivência e reprodução em um determinado ambiente, entendido de modo geral como desempenho biológico. O resultado desse desempenho é a contribuição dos indivíduos para o *fitness* das gerações subsequentes por meio da transferência de genes (BARKER, 2009).

Em modelos matemáticos de transmissão do DENV, a duração do período de incubação extrínseco e a taxa de sobrevivência diária do vetor são os mais importantes para determinação da capacidade vetorial, pois impactam no número reprodutivo básico ( $R_0$ ), ou seja, no número de casos secundários produzidos por um indivíduo infectado (LUZ et al., 2003). Adicionalmente, a concordância e duração do ciclo gonadotrófico de uma espécie

vetora, em um determinado ambiente, são parâmetros importantes que também influenciam a intensidade e distribuição da transmissão de patógenos. Entretanto, a frequência de procura pelo hospedeiro pode ser subestimada quando se utiliza apenas a duração do ciclo gonadotrófico como indicador, uma vez que algumas espécies de mosquitos não têm concordância gonadotrófica e necessitam de mais de um repasto sanguíneo para concluir a oviposição (KLOWDEN; BRIEGEL, 1994).

Outro fator importante a ser considerado em avaliações de dinâmica de transmissão são as complexas interações entre mosquitos e arbovírus, as quais ocorrem em função do tempo e de características específicas do vetor e genótipo ou linhagem do vírus em cada região. Um mosquito infectado, por exemplo, tem um padrão específico de resposta imune e de transcrição, e essa pode impactar na sua capacidade de transmitir um patógeno (KRAMER; CIOTA, 2015).

A resposta imune pode apresentar-se de forma diferente entre populações de uma mesma espécie. Ela também é específica em diferentes tecidos e pode ser um determinante para o sucesso da infecção viral (CARVALHO-LEANDRO et al., 2012). O papel do RNA de interferência (RNAi) nas interações de arbovírus com vetores, por exemplo, tem sido estudado como um dos fatores determinantes da competência vetorial (ASGARI, 2014; LIU et al., 2015; SALDAÑA et al., 2017), entretanto, ainda há lacunas no conhecimento acerca dos mecanismos e requisitos moleculares envolvidos no processo de infecção (BLAIR; OLSON, 2015). Essas interações não atuam sozinhas, pois estão associadas a um contexto externo, constituído por fatores bióticos e abióticos, particularmente, a temperatura do ambiente (KRAMER; CIOTA, 2015).

Diante do conhecimento acumulado e do cenário de distribuição de patógenos e vetores pelo mundo, ainda são escassos os estudos voltados a investigar fatores determinantes do ciclo de transmissão de doenças transmitidas por vetores (PETERSEN et al., 2018).

Estudos indicam que a interação de bactérias que vivem naturalmente nos organismos de mosquitos têm influência nos padrões de transmissão de arbovírus (ALIOTA et al., 2016; ZINK et al., 2015). Pesquisadores utilizaram sequenciamento de última geração dos genes do RNA ribossomal 16S bacteriano, derivado de *Cx. pipiens*, após exposição e/ou infecção ao vírus do Oeste do Nilo (WNV) e verificaram que, nos grupos expostos e/ou infectados, muitos gêneros de bactérias estavam em maior quantidade. Concluíram que a infecção por WNV se associa à regulação positiva de vias imunes, tais como RNA de interferência (RNAi), Toll e Jak-STAT (Transdutor Janus quinase-sinal e ativador de transcrição), além de incrementar a diversidade de organismos microbianos no mosquito vetor. É possível que a interação de

bactérias com vírus tenha influência sobre aspectos importantes do desempenho biológico, como a longevidade, por exemplo, o que pode impactar diretamente em sua capacidade de transmissão (ZINK et al., 2015).

Com relação à capacidade reprodutiva, a fecundidade das fêmeas após infecção por patógenos é um parâmetro pouco estudado (LIMA et al., 2003; PADILHA et al., 2018; PETERSEN et al., 2018; RESCK et al., 2020; SIRISENA; KUMAR; SUNIL, 2018). Em mosquitos, o número de ovos produzidos no primeiro ciclo gonadotrófico já revela o perfil total de postura durante toda a vida de uma fêmea. É importante ressaltar, nesse aspecto da capacidade vetorial, a variação individual dentro de uma mesma espécie, como encontrado para *Anopheles stephensis* (SULEMAN, 1990).

Avaliando o custo biológico da infecção por *Wuchereria bancrofti*, pesquisadores encontraram que fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* infectadas com baixos níveis de parasitemia sanguínea apresentaram incremento na fecundidade, enquanto nos níveis mais altos, houve redução significativa nesse parâmetro da capacidade reprodutiva (LIMA et al., 2003).

A infecção pela bactéria endossimbiótica *Wolbachia* bloqueia a replicação viral no mosquito hospedeiro, estratégia que tem sido usada no controle de arboviroses, por meio do lançamento em campo de indivíduos infectados. Entretanto, o fitness da população infectada deve superar o da população natural para o sucesso do método de controle. Em estudo com *Ae. aegypti* infectado com *Wolbachia*, detectou-se perda de fertilidade e fecundidade de fêmeas que vieram de ovos infectados, que passaram por quiescência, por um período superior a 11 semanas, à temperatura entre 22°C e 30°C, em relação àquelas que vieram de ovos não infectados na mesma condição de armazenamento. Os autores destacaram a importância do conhecimento sobre o custo biológico da infecção, assim como sobre o tempo e condições de armazenamento dos ovos, fatores que determinam o desempenho dos indivíduos em campo (LAU; ROSS; HOFFMANN, 2021). O custo biológico de uma infecção depende também do *background* genômico. Nesse sentido, linhagens de *Ae. aegypti* de duas localidades, obtidas mediante cruzamento com uma terceira linhagem infectada com *Wolbachia*, responderam de modo diferente à presença da bactéria, com relação aos efeitos sobre a fertilidade, longevidade e tamanho das pupas (CARVALHO et al., 2020).

Após infecção com o WNV, a fecundidade de *Culex tarsalis* diminuiu, entretanto, a presença do vírus não alterou significativamente a sobrevivência das fêmeas infectadas (STYER; MEOLA; KRAMER, 2007). No mesmo estudo, verificou-se que a dinâmica de alimentação sanguínea pós-infecção foi alterada, pois um número maior de fêmeas do grupo infectado realizou repasto sanguíneo por toda a vida com relação àquelas expostas, mas não

infectadas. Segundo os autores, embora tenha havido um custo da infecção com relação à capacidade reprodutiva, parâmetros da capacidade vetorial diretamente relacionados com a transmissão não foram afetados, como a sobrevivência, ou incrementaram essa capacidade, como a maior necessidade de repasto sanguíneo (STYER; MEOLA; KRAMER, 2007).

Uma redução significativa foi encontrada na longevidade de fêmeas de *Ae. albopictus* expostos ao CHIKV, entretanto, esse efeito não foi observado em *Ae. aegypti*. Em ambas as espécies, não houve diferenças significativas no número de ovos postos entre o grupo de fêmeas infectadas e não infectadas. Em *Ae. albopictus*, observou-se, ainda, uma correlação negativa entre o tempo de vida e a título viral detectado no corpo das fêmeas após a morte. Os autores sugerem que o custo da infecção pelo CHIKV, em *Ae. albopictus*, pode estar associado a uma limitação fisiológica adquirida na evolução da infecciosidade do patógeno nessa espécie (REISKIND; WESTBROOK; LOUNIBOS, 2010).

Diferentemente, com DENV-2, observou-se impacto significativo da infecção sobre o desempenho biológico de *Ae. aegypti*. O grupo exposto ao vírus, além de apresentar menor fecundidade, apresentou menor tempo de vida; maior tempo para completar a ingestão sanguínea e menor frequência de oviposição em relação aos não expostos. Entretanto, os autores observam que o custo de adaptação à infecção provavelmente não impacta na sobrevivência e no desempenho biológico de mosquitos naturais em campo, uma vez que as desvantagens identificadas neste estudo apareceram sempre com o envelhecimento das fêmeas, de modo que essas sobreviveram por, pelo menos, 20 dias sem modificações significativas no *fitness* (SYLVESTRE; GANDINI; MACIEL-DE-FREITAS, 2013). Adicionalmente, a sobrevivência diária de *Ae. aegypti* é considerada baixa e a probabilidade estimada, em estudo de captura, marcação e recaptura, foi entre 0,80-0,85 (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2007).

Em experimentos realizados com a linhagem ZIKV/H. *sapiens*/Brazil/PE243/201 do ZIKV (genótipo asiático), pesquisadores encontraram efeitos negativos do vírus sobre a sobrevivência de fêmeas de *Ae. aegypti* de uma população coletada no Rio de Janeiro. Entretanto, esses efeitos foram mais evidentes nos grupos de fêmeas mais velhas, que receberam a primeira alimentação sanguínea com 14 e 21 dias de emergência. O grupo de fêmeas mais novas recebeu a infecção por meio do primeiro repasto sanguíneo com 7 dias de emergência. No mesmo estudo, verificou-se que as fêmeas infectadas depositaram menos ovos do que as não infectadas independentemente da idade (PETERSEN et al., 2018). Resultados diferentes foram obtidos por Padilha et al. (2018) com relação à fecundidade, após infecção de fêmeas de *Ae. aegypti* por ZIKV. Utilizando a mesma linhagem

do vírus (ZIKV/H. *sapiens*/Brazil/PE243/201) e uma linhagem de *Ae. aegypti* da Polinésia Francesa, esses pesquisadores relataram que a infecção não teve efeito sobre a fecundidade e viabilidade dos ovos produzidos por fêmeas infectadas pelo ZIKV (PADILHA et al., 2018).

Silveira et al. (2018) encontraram resultados semelhantes com relação à produção de ovos de uma população de *Ae. aegypti* coletadas em três diferentes regiões do Rio de Janeiro. A infecção pelo ZIKV, linhagem (Rio-U1), também do genótipo asiático, não alterou a fecundidade das fêmeas, embora tenha reduzido significativamente a sua longevidade (SILVEIRA et al., 2018).

Recentemente, Mayton et al. (2019) propuseram adaptação do modelo clássico estabelecido para estimar a capacidade vetorial de mosquitos, incluindo na equação o fator idade da fêmea no momento da infecção. Os autores se basearam em resultados obtidos por meio de experimentos de laboratório, com ZIKV e *Ae. aegypti*, em que a inclusão da idade na fórmula padrão que estima a capacidade vetorial fez grande diferença na quantificação do potencial de ocorrência de surto; nesse caso, a diferença entre declarar ou não o risco de um surto. Verificou-se, em laboratório, uma tendência de diminuição da taxa de picada e aumento da mortalidade diária em função da idade. O cálculo da CV baseado em fêmeas infectadas até 10 dias de emergência resultou em valores que indicam alto risco para ocorrência de surto ( $1 < CV < 6$ ). O valor de CV indicou ausência de risco de surto ( $CV < 1$ ) quando o cálculo foi baseado em fêmeas com mais de 10 dias de idade no momento da infecção. A CV é multifatorial e dependente da idade da espécie vetora (MAYTON et al., 2019).

Em síntese, esforços têm sido direcionados a investigações sobre interação vetor-parasito, sobretudo com relação à resposta imune de vetores a arbovírus em condições de laboratório (ANGLERÓ-RODRÍGUEZ et al., 2017; CARVALHO-LEANDRO et al., 2012; MCCRACKEN et al., 2014). Entretanto, é fundamental que esses estudos extrapolem para situações de campo e, principalmente, incorporem informações sobre a biologia do vetor, incluindo a longevidade, capacidade reprodutiva e hematofágica, tamanho e densidade de larvas de modo a melhor estimar, em nível populacional, a capacidade de transmissão (SEVERSON; BEHURA, 2016). Surto de arboviroses ocorrem quando combinações específicas de condições favorecem o aumento das taxas de contato entre vírus, vetor e humano (MANORE et al., 2017). Assim, compreender outros aspectos da capacidade vetorial é fundamental para elucidar os processos envolvidos no surgimento de arboviroses, bem como para encontrar alternativas de controle eficazes, considerando-se o ambiente, a espécie, a população, o vírus e a linhagem em um determinado contexto epidemiológico (KRAMER; CIOTA, 2015).

### 2.5.3 Resposta de mosquitos a repelentes

Historicamente, as estratégias para reduzir a transmissão de arboviroses seguem dois principais caminhos: o controle da população de vetores e a utilização de proteção individual (FRADIN, 1998). Com a recente distribuição mundial de arboviroses, a OMS dá ênfase a essas medidas, tendo como uma das principais recomendações, o uso de proteção física ou química para pessoas que moram ou viajam para áreas de surto ou epidêmicas. Essa proteção inclui o uso de roupas com mangas longas; de mosquiteiros; a colocação de telas nas janelas e a utilização de repelentes tópicos, tais como DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida), IR3535 (Butilacetilaminopropionato de etilo) e Icaridina – Carboxilato de hidroxietil isobutil piperidina ou Picaridina (FRADIN; DAY, 2002; STEFANI et al., 2009). Por outro lado, estudos apontam alterações no comportamento de mosquitos infectados com arbovírus, em relação à sensibilidade a repelentes, sendo esse um aspecto que pode impactar diretamente em um dos principais parâmetros da capacidade vetorial, o desempenho hematofágico (FRANCES; SITHIPRASASNA; LINTHICUM, 2011; QUALLS et al., 2012).

Há restrições ao uso de repelentes tópicos por serem produtos químicos, e precisam atender a muitos requisitos para serem registrados para uso humano pelos órgãos competentes. Muitos são comercializados como repelentes, mas, em experimentos científicos, não reduziram a atração de mosquitos para humanos (RODRIGUEZ et al., 2017). Entre esses requisitos, destacam-se: ter amplo espectro, atingindo várias espécies de insetos; estar ativo por, pelo menos, 8 horas após a aplicação; não causar irritação na pele ou mucosas, ser resistente; atóxico e sem cheiro (FRADIN, 1998). A adição de substâncias ativadoras pode aumentar a ação de um produto repelente, assim como a formulação poderá determinar sua eficácia (LUPI; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2013; MBUBA et al., 2021).

Adicionalmente, estudos sugerem que fatores ambientais, além de interações complexas de mosquito e o hospedeiro, genética e condições de desenvolvimento da espécie, influenciam na dinâmica de picada do mosquito. Entretanto, a eficácia do produto parece ser constante. Os mesmos autores verificaram em seus experimentos que DEET e SS220 (2-metilpiperidinil-3-ciclo-hexeno-1-carboxamida) oferecem o mesmo nível de proteção em *Ae. aegypti* (KLUN et al., 2003).

Além dos repelentes tipo odorantes, aqueles que provocam repelência, fazendo com que o inseto se afaste da fonte sanguínea, existem repelentes que atuam quando o inseto entra em contato com a pele. São os chamados repelentes de contato, em que o inseto chega a sentir o sabor do produto, e não o odor (MILLER et al., 2009). Esses são menos indicados para uso,

pois o patógeno pode ser transmitido enquanto um mosquito está explorando a pele do hospedeiro, mesmo que não faça o repasto sanguíneo, pela presença do repelente de contato (MCCRACKEN et al., 2014). Em adição, a presença de patógeno na glândula salivar pode alterar a sensibilidade do inseto à repelência de contato (QUALLS et al., 2012).

Entre os odorantes, DEET e Icaridina apresentam segurança e eficácia, sendo bastante utilizados em crianças e adultos (BADOLO et al., 2004; STEFANI et al., 2009); embora produtos naturais sejam uma alternativa eficaz quando os consumidores preferem não usar um repelente sintético (REICHERT et al., 2019).

Estudo indica que repelentes de spray contendo DEET ou PMD (p-menthane-3,8-diol) tiveram maior eficácia em relação àqueles com outros ingredientes (RODRIGUEZ et al., 2017). A aplicação do DEET na população de uma aldeia africana reduziu a incidência da malária, restabelecendo a incidência da doença aos níveis pré-epidêmicos (DURRHEIM; GOVERE, 2002). Assim, como resultado de sua eficácia e baixa toxicidade, o DEET tem sido utilizado por muitas décadas como repelente de referência.

A Icaridina foi tão eficaz quanto o DEET contra o *An. gambiae* e uma linhagem urbana da África Ocidental de *Ae. aegypti* (BADOLO et al., 2004). Em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório, o DEET causou repelência significativamente maior do que Icaridina (LEAL et al., 2017). No mesmo estudo, verificou-se que o DEET e a Icaridina foram menos eficazes contra *Ae. aegypti* de Recife com relação a *Cx. quinquefasciatus* da mesma localidade. O DEET a 1% apresentou maior proteção contra o *Ae. aegypti* do que Icaridina (LEAL et al., 2017).

A resposta dos mosquitos a repelentes pode ser variável entre espécies e entre indivíduos de uma mesma espécie, de diferentes origens geográficas (RUTLEDGE et al., 1978). Contudo, em experimentos realizados com Icaridina e DEET, em colônias de *Cx. quinquefasciatus* de diferentes origens (Recife no Brasil e Davis nos Estados Unidos), não se verificou diferença significativa no perfil de repelência (LEAL et al., 2017).

Fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas pelo Sindbis virus (SINV) utilizaram menos tempo para se alimentar do que mosquitos não infectados quando oferecida refeição sanguínea em invólucro contendo DEET. A disseminação do SINV resultou também em um aumento de 12% e 10% na quantidade de sangue ingerida em relação aos mosquitos não expostos ao vírus, e àqueles sem uma disseminação positiva do patógeno, respectivamente (QUALLS et al., 2012). Por outro lado, não se observaram diferenças significativas nas respostas de *Ae. aegypti* e *Ae.*

*albopictus*, infectados pelos quatro sorotipos DENV ao DEET, na dose de 5% (FRANCES; SITHIPRASASNA; LINTHICUM, 2011).

Apesar da recomendação da OMS para utilização de fêmeas nulíparas em testes de eficácia de produtos repelentes, deve-se considerar que o risco de transmissão de patógenos ocorre com fêmeas mais velhas a partir do segundo ciclo gonadotrófico. Assim, Leal et al. (2017) sugerem a necessidade da realização de testes de eficácia de repelentes em fêmeas que já tenham feito pelo menos uma refeição sanguínea, por meio da qual pode adquirir o patógeno e transmitir ao hospedeiro nas alimentações seguintes (LEAL et al., 2017). Os mesmos autores observaram redução, embora não significativa, do efeito de repelência do DEET em fêmeas mais velhas quando a dose utilizada foi de 1%. Por outro lado, o efeito induzido pelo DEET na alimentação sanguínea de *Anopheles gambiae* e *Ae. albopictus* foi avaliado em três faixas de idade. Nas duas espécies, a inibição do repasto sanguíneo induzida por esse repelente foi significativamente menor em fêmeas mais jovens (<13 d) do que nas mais velhas (> 18 d). Os autores sugerem que o controle de doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores, em que o período de incubação extrínseco é longo, poderia ter como alvo os mosquitos mais velhos, o que pode potencializar a eficácia de repelentes no controle dessas doenças (MULATIER et al., 2018). De todo modo, é importante também considerar a dose utilizada nos produtos comerciais e em testes de laboratório, pois, em altas doses, a diminuição do efeito de repelência em fêmeas mais velhas pode ser compensada (LEAL et al., 2017).

Em uma pesquisa de revisão sistemática e metanálise, foram selecionados 2.316 estudos, entre eles artigos publicados, teses e resumos de conferências na perspectiva de entrar em consenso sobre a existência ou não de efeito da infecção de mosquitos sobre a eficácia de repelentes. Dentre esses, 18 estudos avaliaram se a infecção modulava a resposta a repelentes. De modo geral, o DEET foi o mais estudado, com 62% dos resultados, assim como a espécie *Ae. aegypti* com 71% dos resultados. Entre os vírus testados, incluíram-se o Sindbis, DENV e Zika. Os autores concluíram que os repelentes foram menos eficazes contra os mosquitos infectados e as fêmeas mais velhas infectadas foram mais afetadas pela perda de sensibilidade e conseqüente menor resposta a repelentes, o que reforça a necessidade de incluir fêmeas infectadas nos testes de eficácia de repelentes (LAJEUNESSE et al., 2020).

### 3 JUSTIFICATIVA

O cenário epidemiológico de arboviroses tem sido fortemente influenciado pelo aumento da mobilidade das pessoas; pelo deslocamento dos mosquitos e seu transporte passivo mundialmente. O controle de seus vetores é a principal forma disponível de reduzir a incidência dessas doenças e minimizar o impacto socioeconômico decorrente dos surtos epidêmicos que causam. Esse controle depende, principalmente, da redução da densidade populacional das espécies vetoras e do contato mosquito-homem, que pode ser feito pelo uso de repelentes e de outras medidas físicas de proteção individual ou coletiva.

Em consequência das recentes epidemias causadas pelos vírus Zika e chikungunya no país, compreender o processo de transmissão desses patógenos é uma prioridade de saúde pública. O desenvolvimento de estudos que abordem aspectos da capacidade vetorial das espécies envolvidas pode elucidar questões fundamentais para essa compreensão, apontando o real papel do vetor em um determinado território e contexto epidemiológico. Desse modo, o presente trabalho apresenta informações importantes, que poderão nortear futuros estudos epidemiológicos, e de predição de epidemias, contribuindo, sobretudo, para a definição de estratégias de controle direcionadas a espécies alvo, incriminadas na transmissão desses arbovírus.

#### 4 PERGUNTA CONDUTORA

Quais as taxas de infecção, de disseminação viral e o impacto da exposição aos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) sobre os parâmetros de fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos, e do ZIKV sobre a resposta aos repelentes DEET e Picaridina, na espécie *Ae. aegypti*?

Quais as taxas de infecção, de disseminação viral e o impacto da exposição ao vírus Zika (ZIKV) sobre a espécie *Cx. quinquefasciatus*, considerando-se a fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos?

## 5 HIPÓTESE

A exposição aos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) altera os parâmetros de fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos, na espécie *Ae. aegypti*, assim como a exposição ao vírus Zika altera os mesmos parâmetros, na espécie *Cx. quinquefasciatus*, em diferentes proporções. A exposição ao ZIKV pode impactar ainda sobre a resposta aos repelentes DEET e Picaridina, na espécie *Ae. aegypti*.

## 6 OBJETIVOS

Abaixo estão descritos os objetivos, geral e específicos, que nortearam o desenvolvimento deste estudo.

### 6.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis alterações em parâmetros da capacidade reprodutiva, na espécie *Ae. aegypti*, após exposição aos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), bem como em *Cx. quinquefasciatus*, após exposição ao ZIKV.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estimar as taxas de infecção e de disseminação viral, e avaliar o custo biológico da exposição artificial oral aos ZIKV, em colônias de *Ae. aegypti* natural de Recife e de laboratório, considerando-se os parâmetros de fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos;
- b) Estimar as taxas de infecção e disseminação viral, e avaliar o custo biológico da exposição artificial oral ao CHIKV, em colônias de *Ae. aegypti* natural de Recife e de laboratório, considerando-se os parâmetros de fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos;
- c) Estimar as taxas de infecção e de disseminação viral, e avaliar o custo biológico da exposição artificial oral ao ZIKV, em colônia de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório, considerando-se os parâmetros de fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos;
- d) Avaliar o comportamento de repelência de fêmeas de *Ae. aegypti* de laboratório, utilizando-se os repelentes de insetos DEET – N,N-dietil-3-metilbenzamida e Picaridina (hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato de etilo), após exposição ao ZIKV.

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção estão descritos os procedimentos metodológicos adotados neste estudo, os quais também estão sistematizados no quadro 3, que apresenta uma síntese das avaliações realizadas com cada espécie, colônia de mosquito e vírus estudados.

**Quadro 3** – Sistematização dos procedimentos metodológicos e avaliações realizadas para os vírus Zika (ZIKV) ou chikungunya (CHIKV), em experimentos com *Aedes aegypti* de laboratório (colônia RecLab) e campo (colônia AeCamp), e para espécie *Culex quinquefasciatus*

(continua)

Etapas, procedimentos e parâmetros avaliados	Espécies de mosquitos/colônias x vírus				
	<i>Ae. aegypti</i> x ZIKV		<i>Ae. aegypti</i> x CHIKV		<i>Cx. quinquefasciatus</i> x ZIKV
	Laboratório (RecLab)	Campo (AeCamp)	Laboratório (RecLab)	Campo (AeCamp)	Laboratório (CqSLab)
Obtenção das Amostras de mosquitos	Obtida do insetário do IAM, onde foi fundada em 1996	Obtida de treze bairros do município de Recife, Pernambuco, através da coleta de ovos em armadilhas BR – OVT <i>Aedes</i>	Obtida do insetário do IAM, onde foi fundada em 1996	Obtida de treze bairros do município de Recife, Pernambuco, através da coleta de ovos em armadilhas BR – OVT <i>Aedes</i>	Obtida do insetário do IAM, onde foi fundada em 2011
Propagação dos vírus	Em células Vero				
Exposição artificial oral aos vírus	Alimentador artificial, com sangue de coelho desfibrinado; Fêmeas com 7 a 10 dias de emergência	Alimentador artificial, com sangue de coelho desfibrinado; Fêmeas com 7 a 10 dias de emergência	Alimentador artificial, com sangue de coelho desfibrinado; Fêmeas com 7 a 10 dias de emergência	Alimentador artificial, com sangue de coelho desfibrinado; Fêmeas com 7 a 10 dias de emergência	Alimentador artificial, com sangue de coelho desfibrinado; Fêmeas com 7 a 10 dias de emergência
Obtenção das taxas de Infecção	Obtidas pela detecção de RNA através de qRT-PCR. Calculadas pelo número de fêmeas positivas dividido pelo número total de fêmeas analisadas.	Obtidas pela detecção de RNA através de qRT-PCR. Calculadas pelo número de fêmeas positivas dividido pelo número total de fêmeas analisadas.	Obtidas pela detecção de RNA através de qRT-PCR. Calculadas pelo número de fêmeas positivas dividido pelo número total de fêmeas analisadas.	Obtidas pela detecção de RNA através de qRT-PCR. Calculadas pelo número de fêmeas positivas dividido pelo número total de fêmeas analisadas.	Obtidas pela detecção de RNA através de qRT-PCR. Calculadas pelo número de fêmeas positivas dividido pelo número total de fêmeas analisadas.

**Quadro 3** – Sistematização dos procedimentos metodológicos e avaliações realizadas para os vírus Zika (ZIKV) ou chikungunya (CHIKV), em experimentos com *Aedes aegypti* de laboratório (colônia RecLab) e campo (colônia AeCamp), e para espécie *Culex quinquefasciatus*

(continuação)

Etapas, procedimentos e parâmetros avaliados	Espécies de mosquitos/colônias x vírus				
	<i>Ae. aegypti</i> x ZIKV		<i>Ae. aegypti</i> x CHIKV		<i>Cx. quinquefasciatus</i> x ZIKV
	Laboratório (RecLab)	Campo (AeCamp)	Laboratório (RecLab)	Campo (AeCamp)	Laboratório (CqSLab)
Obtenção das taxas de disseminação	Calculada pelo número de cabeças ou cards positivos, dividido pelo total de fêmeas positivas.	Calculada pelo número de cabeças ou cards positivos, dividido pelo total de fêmeas positivas.	Calculada pelo número de cabeças ou cards positivos, dividido pelo total de fêmeas positivas.	Calculada pelo número de cabeças ou cards positivos, dividido pelo total de fêmeas positivas.	Calculada pelo número de cards positivos, dividido pelo total de fêmeas positivas.
Definição dos grupos a serem avaliados, em função das taxas de infecção obtidas pela detecção de RNA através de qRT-PCR	Avaliação em três grupos: Controle ou não exposto (C); Exposto não infectado (E) e Exposto infectado (EI)	Avaliação em três grupos: Controle ou não exposto (C); Exposto não infectado (E) e Exposto infectado (EI)	Avaliação em dois grupos: Controle ou não exposto (C) e exposto infectado (EI)	Avaliação em dois grupos: Controle ou não exposto (C) e exposto infectado (EI)	Avaliação em três grupos: Controle ou não exposto (C); Exposto não infectado (E) e Exposto infectado (EI)
Avaliações de fecundidade e fertilidade	Avaliados três CG: 1º, 2º e 3º, através da contagem de ovos e larvas eclodidas	Avaliados três CG: 1º, 2º e 3º, através da contagem de ovos e larvas eclodidas	Avaliado o 1º CG, através da contagem de ovos e larvas eclodidas	Avaliado o 1º CG, através da contagem de ovos e larvas eclodidas	Avaliado o 1º CG, através da contagem de ovos e larvas eclodidas
Avaliações de sobrevivência e longevidade	Mortalidade verificada diariamente: 30 fêmeas censuradas, sendo 10 em cada DPE (7º, 14º e 21º) e 20 fêmeas acompanhadas até a morte	Mortalidade verificada diariamente: 30 fêmeas censuradas, sendo 10 em cada DPE (7º, 14º e 21º) e 20 fêmeas acompanhadas até a morte	Mortalidade verificada diariamente: 30 fêmeas censuradas, sendo 10 em cada DPE (7º, 14º e 21º) e 20 fêmeas acompanhadas até a morte	Mortalidade verificada diariamente: 30 fêmeas censuradas, sendo 10 em cada DPE (7º, 14º e 21º) e 20 fêmeas acompanhadas até a morte	Mortalidade verificada diariamente e todas as fêmeas acompanhadas até a morte (não houve coleta nos 7º, 14º e 21º DPE)

**Quadro 3** – Sistematização dos procedimentos metodológicos e avaliações realizadas para os vírus Zika (ZIKV) ou chikungunya (CHIKV), em experimentos com *Aedes aegypti* de laboratório (colônia RecLab) e campo (colônia AeCamp), e para espécie *Culex quinquefasciatus*

(conclusão)

Etapas, procedimentos e parâmetros avaliados	Espécies de mosquitos/colônias x vírus				
	<i>Ae. aegypti</i> x ZIKV		<i>Ae. aegypti</i> x CHIKV		<i>Cx. quinquefasciatus</i> x ZIKV
	Laboratório (RecLab)	Campo (AeCamp)	Laboratório (RecLab)	Campo (AeCamp)	Laboratório (CqSLab)
Avaliação da atividade de repasto sanguíneo pós-exposição aos vírus	Avaliada nos 7º, 14º e 21º DPE, através da observação e cálculo do percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento	Avaliada nos 7º e 14º DPE, através da observação e cálculo do percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento	Avaliada no 7º DPE, através da observação e cálculo do percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento	Não avaliado	Avaliada no 7º DPE, através da observação e cálculo do percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento
Avaliação da resposta ao repelente DEET	Avaliação da resposta ao DEET nas doses de 1% e 5%, no 2º CG, após exposição ao ZIKV; Avaliação de fêmeas expostas ao DEET a 1% e 5%, nos 1º e 2º ciclos gonadotrófico, sem exposição ao ZIKV	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
Avaliação da resposta à Picaridina	Avaliação da resposta de fêmeas à Picaridina a 1%, no 2º CG, após expor ao ZIKV.	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado

Fonte: A autora, 2021.

Legendas: IAM – Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE; CG: ciclo gonadotrófico; DPE: dia pós exposição.

## 7.1 ÁREA DE ESTUDO

Com uma população de cerca de 1,5 milhão de habitantes, a cidade de Recife ocupa posição central no litoral da região nordeste do Brasil (latitude 8º 04' 03'' S; longitude 34º 55' 00'' W e altitude de 4 metros acima do mar), estado de Pernambuco, a 800 km das metrópoles regionais de Salvador e Fortaleza. Limita-se ao norte com os municípios de Olinda e Paulista; ao sul, Jaboatão dos Guararapes; a leste com o oceano Atlântico e a oeste com São Lourenço da Mata e Camaragibe. A região é de clima tropical-úmido, onde as chuvas são escassas na

estação seca, podendo ser intensas e prolongadas no inverno (entre os meses de abril a julho). Ao longo do ano, a temperatura e a umidade relativa do ar oscilam de 22°C a 32°C e de 70% a 90% (BARBOSA; REGIS, 2011).

## 7.2 AMOSTRA DE MOSQUITOS

Neste estudo, foram utilizadas colônias de laboratório de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* e amostras de população natural de Recife da espécie *Ae. aegypti*. Amostras de população natural de *Cx. quinquefasciatus* chegaram a ser coletadas como parte deste estudo, contudo, não foi possível concluir as análises estatísticas necessárias, pelo número limitados de dados obtidos, considerando-se a baixa taxa de infecção da espécie pelo ZIKV, como também a dificuldade de adaptação da linhagem local dessa espécie à alimentação artificial

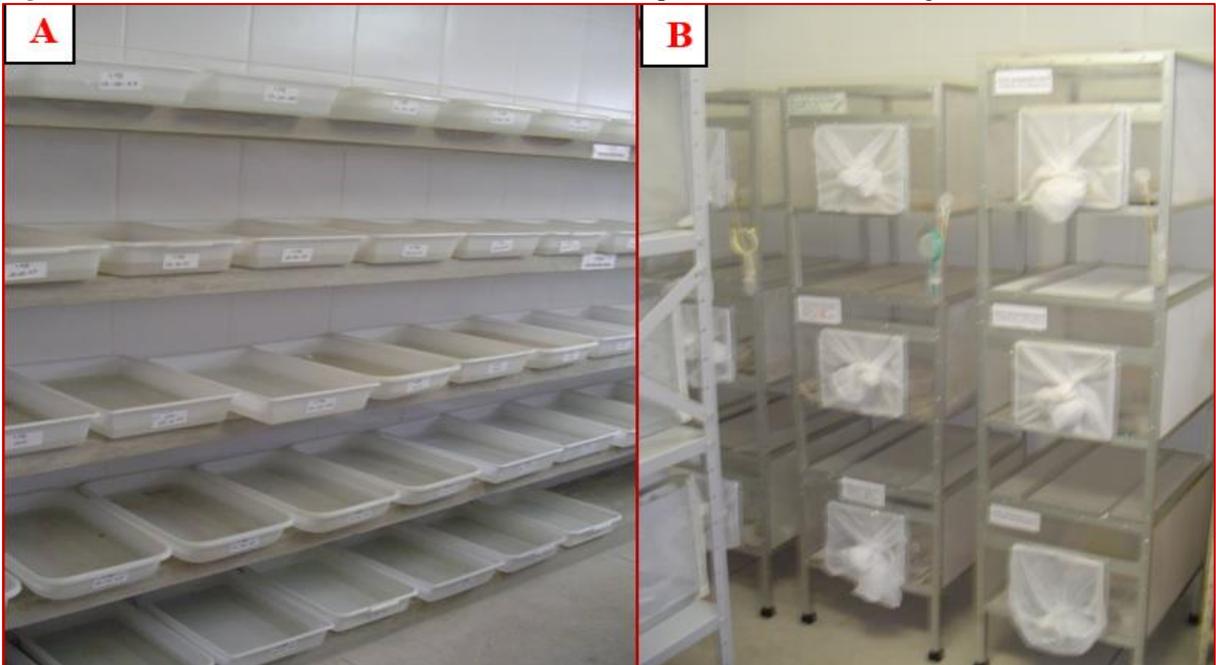
A colônia *Ae. aegypti* (RecLab) é oriunda da cidade de Recife, e *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab) originou-se dos municípios de Ipojuca, Olinda e Jaboatão (Região Metropolitana do Recife). Essas linhagens foram fundadas em laboratório em 1996 e 2011 respectivamente. Ambas são mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM, Fiocruz-PE), em Recife, sob condições controladas de temperatura ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $70 \pm 20\%$ ) e fotoperíodo 14:10 h (C/E).

As formas jovens (larvas e pupas) das duas espécies são mantidas em recipientes plásticos retangulares (cubas), contendo água potável. Como alimento, utiliza-se ração para gatos (Friskies®), administrada a cada dois dias. Para as formas jovens de *Ae. aegypti*, são utilizadas cubas de 30 x 22 x 7,5 cm, com aproximadamente 1 litro e meio de água potável e ração na concentração de 0,15 mg por larva. Para *Cx. quinquefasciatus*, os recipientes medem 45,5 x 28 x 7,7 cm, com aproximadamente 2 litros de água e ração a 0,10 mg por larva. Os adultos são mantidos em gaiolas com as dimensões de 40 x 30 x 30 cm, feitas em tela e alumínio, alimentados diariamente em solução de sacarose a 10% (Figura 10).

Alimentação sanguínea é oferecida semanalmente, durante 45 a 60 minutos, com sangue de coelho desfibrinado, fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal), Fiocruz-RJ). O sangue é mantido sob refrigeração, a 4°C, em tubos de ensaio, por até 30 dias. O alimentador utilizado é constituído por placa de Petri plástica, revestida com duas membranas tipo parafilme M (Bemis). Bolsas térmicas são pré-aquecidas em banho-maria e colocadas sobre o aparato para manter a temperatura do sangue em torno de 37°C (Figura 11).

Esse procedimento é feito nas salas de criação, com a iluminação desligada, temperatura de  $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  e umidade de  $70 \pm 20\%$ .

**Figura 10** – Larvicultura e sala de adultos do Insetário do Departamento de Entomologia, Fiocruz-PE



Fonte: Acervo da autora, 2021; cedida pelo Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE.  
Legendas: A) formas jovens; B) adultos. Mosquitos mantidos em condições de laboratório.

**Figura 11** – Alimentador artificial utilizado nas alimentações sanguíneas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*



Fonte: Acervo da autora, 2021; cedida pelo Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE.

Legendas: A) placa de Petri revestida com parafilme e bolsa térmica; B) mosquitos fazendo repasto sanguíneo em alimentador artificial.

A obtenção das amostras de *Ae. aegypti* de campo foi realizada por meio de coleta de ovos, utilizando-se armadilha de oviposição BR-OVT *Aedes* (BARBOSA; REGIS, 2011; XAVIER et al., 2018) e da coleta de formas jovens diretamente nos criadouros.

Para seleção das áreas de coleta, foram utilizados como referência pontos já selecionados pela Secretaria de Saúde do Recife, onde estavam instaladas ovitrampas destinadas ao monitoramento de infestação por *Ae. aegypti*.

Um primeiro ciclo de coleta realizou-se, entre novembro e dezembro de 2017, em 24 pontos da cidade do Recife, totalizando 13 bairros (Recife, Santo Amaro, Várzea, Afogados, Dois Irmãos, Apipucos, Monteiro, Ipsep, Boa Viagem, Nova Descoberta, Vasco da Gama, Cidade Universitária e Mustardinha), onde as armadilhas BR-OVT *Aedes* permaneceram por 15 dias. A manutenção das armadilhas (troca da água e tecidos, recolhimento de ovos, pupas e larvas) ocorreu no sétimo dia após a instalação a fim de evitar emergência de adultos, uma vez que nelas não se adicionou larvicida.

Os ovos, larvas e pupas coletados nas armadilhas foram levados ao insetário e mantidos sob condições controladas (conforme descrito para colônias de laboratório), para estabelecimento da colônia de *Ae. aegypti* (AeCamp) e obtenção das gerações filiais usadas nos ensaios. Um segundo ciclo de coleta foi realizado nos mesmos pontos entre junho e julho de 2018.

### 7.3 PROPAGAÇÃO DE VÍRUS EM CÉLULAS VERO PARA OS EXPERIMENTOS DE ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL ORAL

As amostras de ZIKV e CHIKV que foram usadas no presente projeto de pesquisa são das linhagens ZIKV BRPE243/2015 (DONALD et al., 2016) e CHIKV PE480/2016 respectivamente. Ambas foram disponibilizadas pelo Departamento de Virologia e Terapia Experimental do Instituto Aggeu Magalhães e pertencem à coleção de vírus daquele Departamento.

Para os experimentos de alimentação artificial oral, a propagação do vírus foi realizada com a adição de 7-8 mL de uma suspensão de células Vero em meio essencial mínimo (MEM) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB), na concentração de  $6 \times 10^5$  células/mL em uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>3</sup>. Esse procedimento foi realizado 24-48 horas antes da inoculação do vírus, em incubadora com CO<sub>2</sub>, a 37°C ou até que as células atinjam uma confluência de 90%.

Para a inoculação do vírus, o meio foi desprezado e adicionou-se 0,25 – 0,30 mL do estoque de vírus às garrafas, as quais, em seguida, foram mantidas em estufa a 37°C, por 60 minutos para adsorção do vírus, com homogeneização a cada 15 minutos. Após o tempo de adsorção, adicionou-se em cada garrafa 10 ml do meio de manutenção MEM, suplementado com 2% de SFB e incubou-se por 5-7 dias (para ZIKV), por 2-3 dias (para CHIKV) ou até o aparecimento do efeito citopático. Para a titulação dos vírus, realizou-se o ensaio de titulação por redução de placa descrito em Castanha et al. (2013).

### 7.4 EXPOSIÇÃO DOS MOSQUITOS AOS ZIKV E CHIKV

Foram realizados de dois a três eventos de alimentação artificial via oral para cada vírus/colônias estudados. Esses procedimentos seguem o mesmo protocolo descrito por Guedes et al. (2017). Para tanto, 300 fêmeas de cada colônia, com idade entre 7 e 10 dias, foram acondicionadas em gaiolas plásticas com volume de 1.570 cm<sup>3</sup>, com auxílio de

capturador de Castro (Figura 12). Essas fêmeas foram submetidas a jejum de água e sacarose por aproximadamente 24 horas.

**Figura 12** – Capturador de Castro para captura de mosquito



Fonte: Sanit'All (2018)

Para a alimentação artificial via oral, foram usados cultivos de células Vero inoculadas com vírus, preparadas conforme descrição na seção 7.3, além dos controles negativos, que são cultivos não infectados. Após 5-6 dias para ZIKV e 48-72 horas para CHIKV, os cultivos de célula que apresentaram efeito citopático foram colocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e depois descongelados em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , com o objetivo de promover a lise das células e liberação dos vírus no meio de cultura. Em seguida, foi feita a mistura de sangue e suspensão viral na proporção de 1:1 (10 mL da suspensão e 10 mL de sangue). O título de vírus dos estoques de ZIKV e CHIKV usado para os ensaios de propagação viral foi de  $10^6$  e  $10^9$  unidades formadoras de placas por mL (PFU/mL) respectivamente. Para o controle negativo, utilizou-se uma mistura de igual volume de sangue e cultivo sem vírus; por fim, separaram-se alíquotas de 0.5 ml das misturas com e sem o vírus para titulação. O sangue utilizado nos experimentos é mantido sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . Assim, permaneceu a temperatura ambiente por cerca de 1 hora antes da mistura com os cultivos de células e vírus.

Como alimentador artificial, utilizou-se o descrito na seção 7.2, utilizado na rotina de manutenção das colônias no insetário. Placas de Petri revestidas com membranas tipo parafilme M (alimentador artificial) foram preparadas no dia da infecção oral e colocadas sobre as gaiolas no momento do experimento.

Para iniciar o experimento, 10 mL das misturas de sangue com vírus e controle negativo (sangue com células sem vírus) foram cuidadosamente transferidos para placas de Petri, com o auxílio de uma pipeta sorológica. Em seguida, bolsas térmicas aquecidas a  $60^{\circ}\text{C}$  por 4 minutos foram dispostas sobre as placas para aquecer e manter o sangue a temperatura

de aproximadamente 37°C. As bolsas foram trocadas depois de meia hora de exposição. Os mosquitos foram expostos à alimentação sanguínea por 45 a 60 minutos.

## 7.5 AVALIAÇÃO DE CUSTO BIOLÓGICO

Nas análises de custo biológico, foram avaliados os parâmetros de fecundidade (número de ovos postos por fêmea); fertilidade (percentual de larvas que eclodiram por fêmea), sobrevivência (expressa pela probabilidade de uma fêmea estar viva durante um determinado período, em cada experimento), longevidade (tempo médio de vida das fêmeas, medido pela soma do tempo de vida de cada fêmea, dividido pelo total de fêmeas analisadas em cada grupo) e atividade de repastos sanguíneos (número de fêmeas que completaram o ingurgitamento em sangue limpo, em até 30 minutos de exposição a alimentação artificial nas semanas subsequentes à exposição aos vírus).

Após a infecção oral, as gaiolas utilizadas na exposição aos vírus foram transferidas para uma caixa de isopor contendo gelo com a finalidade de anestésiar os mosquitos. Após anestesiadas, 50 fêmeas ingurgitadas de cada grupo (1- colônia laboratório controle, 2 - colônia campo controle, 3 - colônia laboratório exposta ao vírus e 4 - colônia campo exposta ao vírus) foram transferidas para gaiolas individuais, devidamente identificadas, com volume aproximado de 500 cm<sup>3</sup> (Figura 13). Sobre as gaiolas, foi colocado algodão embebido em água e sacarose a 10%. As gaiolas individuais com as fêmeas ingurgitadas permaneceram até o fim do experimento protegidas em grandes gaiolas de contenção, sob condições controladas de temperatura (26 °C ± 1 °C), umidade relativa do ar (70 ±20%) e fotoperíodo 14:10 h (C/E).

**Figura 13** – Experimento para acompanhamento dos parâmetros de fecundidade, fertilidade e longevidade, após infecção pelos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) em fêmeas de *Aedes aegypti*



Fonte: A autora, 2021.

Nota: Acervo da autora / Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE.

Nas três semanas subsequentes à infecção, foram oferecidos individualmente mais três repastos sanguíneos em sangue limpo às fêmeas sobreviventes das 200 acompanhadas em cada experimento.

### **7.5.1 Fecundidade, fertilidade, sobrevida, longevidade e atividade de repastos sanguíneos subsequentes à exposição de *Aedes aegypti* aos ZIKV e CHIKV**

Para as avaliações de fecundidade e fertilidade das fêmeas de *Ae. aegypti* (colônias RecLab e AeCamp), após exposição ao ZIKV, foram analisados três ciclos gonadotróficos (CG). Por questões de operacionalização e de logística no momento dos experimentos após exposição ao CHIKV, apenas o primeiro ciclo gonadotrófico foi analisado.

No terceiro dia pós-exposição (3 DPE), foram colocados recipientes para postura (medindo 3,14 cm<sup>3</sup>) em cada uma das gaiolas contendo as fêmeas individualizadas. Esses recipientes continham 2 mL de solução de gramínea a 30% e suportes para postura feitos em papelão, medindo aproximadamente 4 x 2 cm (Figura 14).

**Figura 14** – Recipientes individuais com infusão de gramínea e suportes para postura de ovos de *Aedes aegypti* após infecção por ZIKV



Fonte: Acervo da autora, 2021; cedida pelo Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE.

Os suportes e a solução de gramínea eram trocados duas vezes por semana. Os ovos coletados foram contados e estimulados para eclosão em infusão de gramínea a 30%, após 15 a 20 dias de quiescência, a fim de determinar a fecundidade (número de ovos) e taxa de fertilidade individual (percentual de ovos que eclodiram até 24 após o estímulo para eclosão). O mesmo procedimento foi realizado para os grupos controle.

Para análises de sobrevivência e longevidade, a verificação da mortalidade das fêmeas foi feita diariamente, e as fêmeas mortas foram congeladas individualmente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Foi realizada, ainda, a análise de sobrevivência, longevidade, fecundidade, fertilidade e atividade de repasto sanguíneo entre as fêmeas que apresentaram maior ou menor carga viral, representada pela quantidade de cópias de RNA (NC), detectada por RT-qPCR. O ponto de corte para definição dos grupos (com maior e menor carga) foram os valores medianos dos NC obtidos pelas fêmeas infectadas.

Para as avaliações de atividade de repastos sanguíneos, em *Ae. aegypti*, foram contadas as fêmeas que visualmente conseguiram completar o ingurgitamento em alimentações sanguíneas nos 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias pós-exposição ao ZIKV, em até 30 minutos de exposição a sangue de coelho desfibrinado, livre de partículas virais. Por dificuldades operacionais, nos experimentos com o CHIKV, essas análises foram feitas apenas no 7<sup>o</sup> dia pós-exposição.

### **7.5.2 Fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos subsequentes à exposição de *Culex quinquefasciatus* ao ZIKV**

Para a avaliação de fecundidade e fertilidade de *Cx. quinquefasciatus*, colônia CqSLab, os recipientes para postura foram colocados em cada uma das gaiolas contendo as fêmeas individualizadas expostas ao ZIKV no terceiro dia pós-exposição (3 DPE).

Como estímulo para postura, o recipiente continha 2 mL de solução de gramínea a 30%. Diferentemente do procedimento com fêmeas das colônias de *Ae. aegypti*, a solução de gramínea era colocada apenas uma vez por semana e retirada quando verificada a presença de ovos (jangadas). Os ovos coletados foram contados com auxílio de uma lupa, até 24 horas após a postura, para determinação da fecundidade, e permaneceram nos recipientes para eclosão por 72 horas, para contagem das larvas (em estágio L1) e verificação da fertilidade.

Como feito para *Ae. aegypti*, para análises de sobrevivência e longevidade, a verificação da mortalidade foi feita diariamente, e as fêmeas mortas foram congeladas individualmente a -80°C para avaliação da taxa de infecção.

As avaliações de atividade de repastos sanguíneos pós-exposição ao ZIKV foram feitas conforme descrito para *Ae. aegypti*, na seção 7.5.1, onde foi avaliado o primeiro repasto sanguíneo pós-exposição ao ZIKV (7 DPE).

## 7.6 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-qPCR PARA DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO

Nos experimentos com *Ae. aegypti*, das 50 fêmeas acompanhadas em cada grupo, 30 foram censuradas (coletadas individualmente antes da morte, durante os experimentos) para avaliação da taxa de infecção e disseminação, sendo 10 em cada ponto de avaliação: 7º, 14º e 21º dias pós-exposição (DPE), embora todas tenham contribuído para avaliações de fecundidade, fertilidade e sobrevivência até o ponto em que saíram do estudo, seja por morte ou censura. As 20 fêmeas restantes de cada grupo permaneceram até o fim da vida e foram coletadas individualmente após a morte, conforme descrito na seção 7.5.1. Nessas últimas, cartões FTA – classic card Whatman® (cards), que são cartões preparados com papel filtro, foram colocados nas telas das gaiolas individuais, onde permaneceram do 7º ao 14º DPE na tentativa de coletar saliva, com RNA viral, e confirmar a infecção do grupo de fêmeas que não foi censurado. O termo censurado aqui foi utilizado para designar os indivíduos que não morreram durante os experimentos, mas foram coletados antes da morte e congelados individualmente para avaliação das taxas de infecção e disseminação nos 7º, 14º e 21º DPE.

A taxa de infecção (TI) foi calculada pelo número de fêmeas positivas (RNA detectado por RT-qPCR), dividido pelo número total de fêmeas analisadas. Para estimativa da

taxa de disseminação (TD), calculou-se o número de cabeças ou cards positivos, dividido pelo total de fêmeas positivas.

Nos experimentos com *Cx. quinquefasciatus*, todas as fêmeas permaneceram no experimento até o fim da vida, quando foram coletadas individualmente e congeladas, conforme descrito na seção 7.5.2 para confirmação da infecção. Nesse caso, os cartões FTA – classic card Whatman® (cards) foram colocados nas gaiolas individuais de todas as fêmeas, onde permaneceram do 7º ao 14º DPE. A TI foi calculada conforme descrito no parágrafo anterior para *Ae. aegypti*. Contudo, para cálculo da TD, foram usados os cards positivos colocados sobre as gaiolas do primeiro experimento, ao invés das cabeças, pois estas não foram separadas do tórax e abdômen. Assim, o cálculo da TD para *Cx. quinquefasciatus* foi feito pelo número de cards positivos, dividido pelo número total de fêmeas positivas.

Todos os mosquitos coletados foram colocados separadamente em microtubos de 1,5 ml, contendo 300 µl de um diluente para mosquitos, constituído por PBS 1X (0,1M; pH 7,4), soro fetal bovino 10 %, antibiótico 1% – penicilina/streptomicina e antifúngico 1% – fungizon (LAMBRECHTS et al., 2009). As amostras foram armazenadas a -80°C até a sua utilização. Os procedimentos referentes à extração de RNA e RT-PCR quantitativa estão descritos em Guedes et al. (2017).

As amostras de mosquito do 7 DPE foram separadas em cabeça e corpo a fim de determinar a taxa de disseminação.

Os cards coletados foram armazenados em tubos de 1,5 mL a -80°C até a preparação dos inóculos. Para preparação dos inóculos, os cards foram cortados e colocados em tubos de 1,5 mL. A eles, foram adicionados 400 µL de água ultrapura. Em seguida, os tubos com os cards cortados foram agitados em homogeneizador tipo vortex por 5 vezes durante 10 segundos, com intervalo de 5 minutos. Por fim, os cards foram transferidos para uma seringa de 10 mL e filtrados, de modo que apenas o eluado foi recuperado. Os inóculos preparados foram armazenados a -80°C até o processamento para extração do RNA e RT-qPCR, seguindo o mesmo protocolo usado para as amostras de mosquitos.

A extração do RNA realizou-se seguindo-se o protocolo de extração de RNA por Trizol, com algumas modificações. Cabeças, tórax e abdomens, bem como os mosquitos inteiros, foram homogeneizados com micropistilo e, em seguida, 100 µL do inóculo foi transferido para outro microtubo contendo 200 µL de Trizol (Invitrogen). O material foi homogeneizado no agitador de tubos por cerca de 10 segundos e deixado em temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, adicionou-se a esses tubos 100 µL de clorofórmio e procedeu-se com agitação manual, vigorosamente, por aproximadamente 15 segundos. A

mistura foi incubada em temperatura ambiente por três minutos. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados a 12000 rpm (rotações por minuto), por 15 minutos, a 4°C, e a parte aquosa foi transferida para um novo microtubo (procede-se com duas pipetagem de 100 µL). Neste, foram adicionados 200 µL de isopropanol para precipitação do RNA. Esses tubos foram invertidos manualmente, por cerca de 10 vezes, e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Passado esse tempo, foram novamente centrifugados a 12000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido por inversão dos tubos. A estes, adicionam-se 300 µL de etanol a 75%, para lavar o RNA. Os tubos foram homogeneizados rapidamente em agitador de tubos tipo vortex, por aproximadamente dois segundos, e novamente centrifugados a 12000 rpm, por cinco minutos, a 4°C. Em seguida, o etanol foi retirado por inversão e secagem em papel absorvente, e colocado em estufa para secagem, por 15 a 20 minutos, a 37°C. O RNA então foi ressuscitado em 30 µL de água Ultra Pure (Invitrogen).

Os *primers* (Quadro 4) utilizados para os ensaios de detecção de partículas virais de ZIKV e CHIKV nos diferentes tecidos ao longo do período de incubação nas espécies estudadas estão descritos, respectivamente, em Lanciotti et al. (2007, 2008).

**Quadro 4** – Primers e sondas utilizados nas reações de RT-qPCR para detecção de partículas virais dos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV)

VÍRUS	PRIMERS – sequência 5' – 3'	SONDAS
ZIKV	1087 CCGCTGCCCAACACAAG	1108 FAM
	1163cCCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGAC ACTCAA
CHIKV	6856 TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA	6919 VIC
	6981 TTG ACG AGA GTT AGG AAC ATA CC	AGGTACGCGCTTCAAGTTTCGGCG

Fonte: Lanciotti et al. (2007, 2008).

A detecção dos vírus realizou-se por RT-PCR quantitativo (RT-qPCR), em um sistema QuantStudio® 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Para tal reação, utilizou-se o kit QuantiNova Probe RT-PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha). O volume de reação utilizado foi de 10 µL, contendo 3,5 µL de RNA extraído sob as condições descritas no item anterior; 1 × QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix; 0,1 µL do QuantiNova, Probe RT Mix; 0,1 µL do ROX Reference Dye, 0,8 µM de cada primer e 0,1 µM da sonda (estoque). Os *primers*, sonda e condições de PCR foram inicialmente descritos em Lanciotti et al. (2008) para ZIKV e Lanciotti et al. (2007) para CHIKV. A ciclagem consiste de um ciclo de transcrição reversa, por 15 minutos, a 45°C, seguido por 5 minutos, a 95°C, para inativação da transcriptase

reversa e ativação de DNA polimerase. Em seguida, a ciclagem prossegue em 45 ciclos de 5 segundos, a 95°C, e 45 segundos, a 60°C. Os valores do limiar do ciclo – *Cycle Threshold* (Ct) – são utilizados para estimar a quantidade de RNA viral, tendo a curva padrão como referência para cada ensaio RT-qPCR. A curva padrão consiste em diferentes diluições do RNA de amostra de ZIKV BRPE243/2015 e do RNA de CHIKV PE480/2016 previamente titulados.

#### 7.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE FÊMEAS DE *Ae. aegypti* AOS REPELENTE DEET – N,N-DIETIL-3-METILBENZAMIDA E PICARIDINA (HIDROXIETIL ISOBUTIL-PIPERIDINA CARBOXILATO DE ETILO), APÓS INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA

Como um dos objetivos deste trabalho, foi avaliada a resposta de fêmeas de *Ae. aegypti* da colônia de laboratório (RecLab) aos repelentes DEET – N,N-dietil-3-metilbenzamida e Picaridina (hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato de etilo), após infecção com ZIKV.

Inicialmente, foram realizados testes para comparar a eficácia dos dois repelentes estudados: DEET e Picaridina, na colônia RecLab, com fêmeas entre 5 e 7 dias pós-emergência, conforme recomendado pela OMS para testes de eficácia de repelentes na dose de 1%.

A infecção dos mosquitos foi feita conforme descrito na seção 7.4 do procedimento metodológico. Os ensaios de avaliação da repelência, após infecção com o vírus aqui estudado, foram realizados no 7º dia pós-exposição (DPE), quando as fêmeas estavam com idade entre 14 e 17 dias (segundo ciclo gonadotrófico), uma vez que essas precisaram passar pela exposição ao ZIKV quando nulíparas. Os testes foram feitos na dose de 1%. Para o DEET, avaliou-se também a dose de 5%.

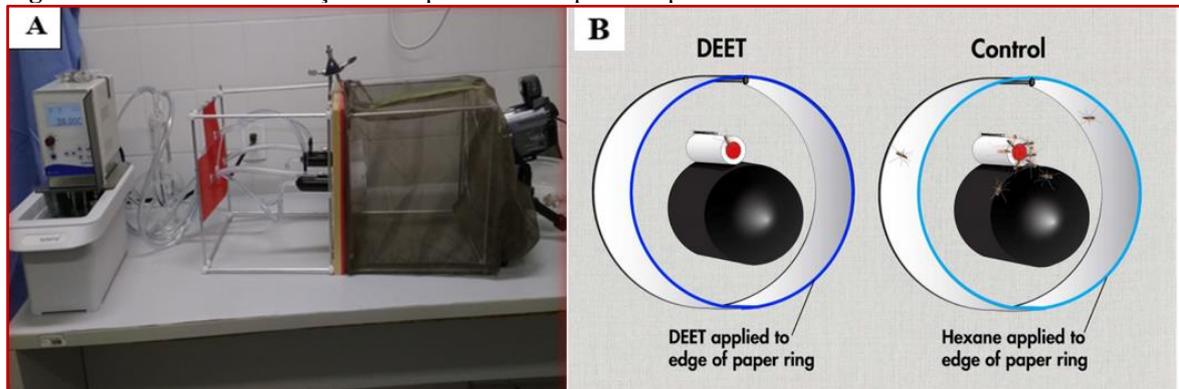
Foram realizados ainda testes de comparação entre fêmeas jovens (5 e 7 dias) e fêmeas mais velhas (segundo ciclo gonadotrófico (14 e 17 dias), expostas a doses de 1% e 5% do DEET, com o objetivo de avaliar se a idade impacta na resposta ao repelente.

Esses ensaios foram realizados utilizando-se um aparato que permite a avaliação da repelência, por teste de escolha, simulando a mão humana, pulverizada com repelentes (Figura 15). Esse ensaio atrai mosquitos a um repasto sanguíneo, em algodão dental embebido em sangue de coelho desfibrinado, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e estímulos físicos (cor escura e

de calor). Uma “cortina química” de repelente é lançada por meio de anéis de papel de filtro em torno das iscas.

Trata-se de uma arena constituída por uma gaiola dobrável, com contorno de alumínio (30,5 × 30,5 × 30,5 cm) e cobertura em poliéster (Bioquip), adequada para conter cerca de 50 fêmeas. Essa gaiola é fixada a uma placa de madeira (30 x 30 x 2,5 cm), a qual projeta para seu interior dois tubos Dudley (5,5 cm), os quais são pintados internamente com tinta preta e mantidos aquecidos por um banho de água circulante a 38°C. À mesma tábua de madeira, são presas duas agulhas de seringa projetadas 4 cm para dentro da gaiola. Essas servem como saída de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que flui a 50 ml/min.

**Figura 15** – Ensaio de avaliação de resposta do mosquito a repelente



Fonte: Leal et al. (2017).

Legendas: A) gaiola, câmara e banho de água circulante utilizados em ensaio de avaliação de resposta do mosquito a repelente; B) representação diagramática do ensaio dentro da gaiola (sangue em algodão; saída de CO<sub>2</sub>; tubos aquecedores conectados ao banho de água circulante e anéis de papel de filtro contendo repelente e hexano).

Os tubos Dudley e as agulhas são colocados transversalmente na linha média da placa de madeira. Entre cada tubo de Dudley e a seringa (8 mm), são colocados os rolos de algodão dental embebidos em sangue (100 µL) no momento de cada ensaio. Alfinetes entomológicos são colocados 1,8 cm acima das agulhas, aos quais são presos os anéis de papel de filtro (largura de 4 cm; 25 cm), que servem como fonte repelente espacial e controle.

A superfície superior da gaiola contém um zíper para permitir o acesso da mão do operador ao interior da gaiola. A superfície oposta à placa de madeira tem uma abertura pela qual uma câmara filmadora registra os experimentos.

O DEET foi adquirido da Sigma-Aldrich (catálogo número 36452–250 MG), com pureza de aproximadamente 99%. A Picaridina foi uma doação do Dr. Kamal Chauhan – United States Department of Agriculture (USDA), ARS, Beltsville). Estimou-se a pureza em aproximadamente 99%, por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) e

ressonância magnética nuclear (RMN) – VNMR600, Varian, Departamento de Química. Utilizou-se hexano para preparação da solução estoque de cada repelente estudado (10% m/v) e suas diluições (5, 1 e 0,2%), as quais foram mantidas a -20°C. Para cada experimento, alíquotas de 200 µl foram aplicadas na borda dos anéis de papel de filtro. Nos anéis do controle, foram aplicados apenas 200 µl do hexano.

Os resultados foram obtidos de três grupos de, no mínimo, 50 fêmeas infectadas pelo ZIKV. Cada grupo experimental foi exposto por, pelo menos, sete vezes, compreendendo sete repetições do ensaio, com troca dos anéis de papel de filtro, contendo repelente e/ou hexano, a cada 15 minutos. Finalizado o experimento, é feita a observação da filmagem e o registro, a cada minuto, de quantas fêmeas ultrapassam a arena em busca do repasto sanguíneo. Ao final, é feita a seleção do minuto em que o maior número de fêmeas ultrapassou a arena em cada repetição.

Para confirmar a infecção dos mosquitos a serem utilizados nos testes de repelência, analisaram-se as amostras de mosquitos expostos ao sangue contendo partículas virais, por reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR), conforme descrição na seção 7.6 do procedimento metodológico deste estudo. Os mosquitos foram coletados no dia da exposição ao ZIKV (0 DPE), assim como no terceiro e sétimo dias pós-exposição (3 C e 7 DPE), em *pools* de até 10 mosquitos. Aqueles coletados no 7 DPE são os mesmos utilizados nos ensaios de resposta aos repelentes aqui avaliados. Nestes ensaios, a infecção foi confirmada pela detecção de RNA nos *pools* de até 10 fêmeas expostas ao vírus, e não individualmente, como descrito nas seções 7.5.1 e 7.5.2, nos ensaios para avaliação de capacidade reprodutiva, longevidade e atividade de repastos sanguíneos.

Foram coletadas também amostras do sangue com vírus e daquele contendo apenas células Vero (controle negativo), utilizados no ensaio de alimentação oral. Amostras de mosquitos expostos ao sangue sem vírus foram utilizadas como controle negativo.

## 7.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A apresentação das variáveis foi feita por meio de gráficos e tabelas, incluindo o uso de medidas descritivas como mínimo, máximo, média e desvio padrão. As suposições de normalidade das variáveis envolvidas foram testadas aplicando-se os testes de Shapiro Wilk. Quando observados os pressupostos de normalidade, utilizou-se o teste de T-Student para avaliar as diferenças de médias para as variáveis independentes. Quando não, avaliou-se as medianas, utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Também se utilizou o teste de Bartlett para

avaliar a homogeneidade dos dados, e quando observado a suposição aplicou-se o teste de média Anova, com post hoc, o teste de Tukey. Caso contrário, avaliou-se a mediana, aplicando o teste de Kruskal-Wallis, com post hoc, o teste de Fisher. O teste de Cox foi utilizado para avaliação da sobrevida. As proporcionalidades das curvas foram avaliadas com o teste de Schoenfeld, a apresentação realizada com o gráfico de Kaplan-Meier. As conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

De acordo com o recomendado pela OMS, para as avaliações de resposta a repelentes, essas foram expressas em taxas de proteção, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$P\% = [1 - (T/C)] \times 100$$

Onde “P%” é a taxa de proteção; “T” é o número de fêmeas que ultrapassaram a arena no lado do teste (arena com repelente) e “C” é o número de fêmeas que ultrapassaram a arena no lado do controle.

## 8 RESULTADOS

Os resultados apresentados referem-se à avaliação dos parâmetros de custo biológico e às taxas de infecção e disseminação, obtidos após exposição aos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), nas colônias de *Ae. aegypti* de campo (AeCamp) e de laboratório (RecLab), como também os mesmos parâmetros na colônia de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório, CqSLab, após exposição ao ZIKV. São apresentados, ainda, os resultados da suscetibilidade da colônia RecLab aos repelentes DEET e Picaridina, após infecção com o ZIKV, já publicados no artigo: *Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents* (LEAL et al., 2017).

### 8.1 TAXAS DE INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DOS VÍRUS ZIKA (ZIKV) E CHIKUNGUNYA (CHIKV)

A média das taxas de infecção (TI) pelo ZIKV, calculadas entre as fêmeas coletadas nos 7º, 14º e 21º dias pós-exposição (DPE), foi de 75% para colônia de *Ae. aegypti* RecLab e de 68% para AeCamp (Tabela 3). A taxa de disseminação (TD) das fêmeas coletadas no 7º DPE foi de 90% para RecLab e de 70% para AeCamp. O percentual de cards positivos foi de 30% entre as fêmeas da colônia RecLab expostas ao ZIKV. Na colônia AeCamp, esse valor subiu para 60% dos cards avaliados. Os títulos das misturas (sangue + cultivo viral) utilizadas nos experimentos de exposição de *Ae. aegypti* foram  $2,7 \times 10^6$ ;  $8,5 \times 10^5$  e  $4 \times 10^6$  PFU/mL respectivamente para os experimentos 1, 2 e 3. Para CHIKV, as taxas de infecção (Tabela 3) e disseminação foram de 96% e 100% para RecLab e de 93 e 94% para AeCamp respectivamente. Não foram detectados cards positivos nos ensaios com CHIKV.

Com relação a CqSLab, as taxas de infecção e disseminação obtidas a partir da exposição de fêmeas da colônia CqSLab ao ZIKV foram de 22,5% (Tabela 3) e 57% respectivamente. Os títulos das misturas (sangue + cultivo viral) utilizadas nos experimentos de exposição de CqSLab foram  $7,8 \times 10^5$ ;  $3,5 \times 10^6$  e  $3,9 \times 10^6$  PFU/ml, respectivamente, para os experimentos 1, 2 e 3.

A carga viral média de ZIKV, detectada por RT-qPCR (número de cópias de RNA/mL - NC), não apresentou diferença entre os tempos de coleta 14º e 21º DPE nas duas colônias de *Ae. aegypti* (RecLab e AeCamp). Essa diferença foi encontrada nas duas colônias, com o ZIKV, quando se compara com o 7º DPE, pois nesse ponto de coleta, analisou-se apenas a

cabeça e, possivelmente, por isso, a quantidade de RNA detectada foi menor. Para CHIKV, nos três tempos avaliados, os NC foram semelhantes nas duas colônias estudadas (Tabela 3).

**Tabela 3** – Taxa de infecção dos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), em colônias de *Aedes aegypti* de laboratório (RecLab); *Aedes aegypti* de campo (AeCamp) e *Culex quinquefasciatus* de laboratório (CqSLab) e número médio de cópias de RNA (NC) detectada por ponto de coleta (7, 14 e 21 dias pós exposição - DPE)

Vírus	Colônias	Taxa de Infecção							
		7 DPE		14 DPE		21 DPE		Total	
		% (n/N)	NC	% (n/N)	NC	% (n/N)	NC	% (n/N)	NC
ZIKV	RecLab	80 (24/30)	5,07E+11	83 (23/28)	5,48E+11	63 (19/30)	1,01E+12	75 (66/88)	6,90E+11
	AeCamp	61 (17/28)	2,54E+17	80 (22/28)	6,70E+11	63 (19/30)	4,00E+11	68 (58/86)	6,48E+11
CHIKV	RecLab	100 (19/19)	1,38E+12	94 (17/18)	2,96E+12	94 (17/18)	1,33E+12	96 (53/55)	1,89E+12
	AeCamp	85 (17/20)	1,13E+12	100 (19/19)	1,42E+12	94 (16/17)	1,36E+12	93 (52/56)	1,30E+12
ZIKV	CqSLab	-	-	-	-	-	-	22,5 (18/80)	8,64E+10

Fonte: A autora, 2021.

Legendas: n = número de fêmeas infectadas; N = número de fêmeas avaliadas; DPE = dias pós exposição; NC = número de cópias de RNA

O valor mediano de cópias de RNA por mL (NC) aumentou significativamente ( $p = 0.019$ ) entre as fêmeas da colônia RecLab, infectadas por ZIKV, que fizeram um segundo repasto sanguíneo em sangue livre de partículas virais. Essa alimentação foi oferecida sete dias após o experimento de infecção. A mediana da NC aumentou de  $4,41E+08$ , entre as que não se alimentaram, para  $1,42E+11$  entre as que fizeram esse segundo repasto sanguíneo (Tabela 4). Essa diferença na carga viral, após segundo repasto sanguíneo não foi detectada entre as fêmeas infectadas com CHIKV (Tabela 4).

Não foi possível comparar as fêmeas de CqSlab, com relação ao número de cópias de RNA, pelo pequeno percentual de fêmeas infectadas com ZIKV.

**Tabela 4** – Quantidade de cópias de RNA (NC) dos vírus Zika (ZIKV), detectadas por RT-qPCR, em fêmeas das colônias de *Aedes aegypti* de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, e do vírus chikungunya (CHIKV), detectadas em fêmeas da colônia RecLab, que completaram um segundo repasto sanguíneo no 7º dia após exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais

Vírus	Colônias	Fêmeas	Número de fêmeas (N)	NC Média	NC Mediana	Desvio padrão	Valor de p
ZIKV	RecLab	Repasto sanguíneo negativo	22	4,31E+11	4,44E+08	1,75E+12	<b>0,019</b>
		Repasto sanguíneo positivo	35	5,81E+11	1,42E+11	1,1E+12	
	AeCamp	Repasto sanguíneo negativo	30	2,01E+11	2,94E+09	3,98E+11	<b>0,810</b>
		Repasto sanguíneo positivo	22	6,45E+11	3,4E+09	1,21E+12	
CHIKV	RecLab	Repasto sanguíneo negativo	12	2,213E+12	3,768E+11	2,754E+12	<b>0,582</b>
		Repasto sanguíneo positivo	10	9,233E+13	1,535E+12	2,863E+14	

Fonte: A autora, 2021.

## 8.2 AVALIAÇÃO DE CUSTO BIOLÓGICO

Aqui são apresentados os resultados obtidos com relação aos parâmetros de fecundidade, fertilidade, sobrevivência, longevidade e atividade de repastos sanguíneos das colônias de *Ae. aegypti*, após exposição aos vírus Zika e chikungunya, e de *Cx. quinquefasciatus* após exposição ao vírus Zika.

### 8.2.1 Custo biológico da infecção com o vírus Zika (ZIKV) em *Ae. aegypti*

Para análise do custo biológico com ZIKV, os grupos foram definidos de acordo com os resultados da exposição. Desse modo, esses foram divididos em três: controle (C); expostos, que não se infectaram (E) e expostos infectados (EI).

#### 8.2.1.1 Sobrevivência e Longevidade

A sobrevivência (expressa pelo risco de morte) da colônia RecLab mostrou diferença significativa entre os dois grupos expostos ao ZIKV (E e EI), com relação ao grupo controle ( $p = 0.014$  e  $p = 0.003$  respectivamente), onde o risco encontrado para fêmeas

expostas que não se infectaram foi de 1,845 e para fêmeas infectadas foi de 2,014 (Tabela 5; Figura 16A). O tempo médio de vida para cada grupo mostrou-se semelhante: 33,36; 31,04 e 26, 23 dias para C, E e EI respectivamente.

**Tabela 5** – Risco de morte de fêmeas da colônia de *Aedes aegypti* de laboratório – RecLab – após exposição ao vírus Zika (ZIKV)

Variáveis	Hz	Sobrevida		Valor de p
		IC 95%		
		Inf	Sup	
Grupo Controle	1,000			
Grupo Exposto	1,845	1,130	3,013	<b>0,014</b>
Grupo Exposto I	2,014	1,272	3,189	<b>0,003</b>
Variáveis		Proporcionalidade		Valor de p
		Análise de Schoenfeld		
		rho	chisq	
Exposto		0,162	3,30	0,0695
Exposto I		0,162	3,36	0,0670
<b>GLOBAL</b>			4,87	0,0876

Fonte: A autora, 2021.

Legenda: IC: intervalo de confiança; Inf: limite inferior do IC; Sup: limite superior do IC; rho: coeficiente de correlação linear; chisq: estatística qui-quadrado; p: valor de p da estatística (CARVALHO et al., 2011)

Para *Ae. aegypti* de campo (AeCamp), o risco de morte foi 1,289 para o grupo E e de 1,212 para EI (Tabela 6; Figura 16B). Não há diferença significativa entre os três grupos analisados. O tempo médio de vida para cada grupo também se mostrou semelhante (34,19; 31,19; e 31, 6 dias, para C, E e EI respectivamente).

**Tabela 6** – Risco de morte de fêmeas da colônia de *Aedes aegypti* de campo – AeCamp – após exposição ao vírus Zika (ZIKV)

Variáveis	Hz	Sobrevida		Valor de p
		IC 95%		
		Inf	Sup	
Grupo Controle	1,000			
Grupo Exposto	1,289	0,8165	2,034	0,276
Grupo Exposto I	1,212	0,7696	1,910	0,406
Exposto		-0,0308	0,112	0,738
Exposto I		0,0967	1,142	0,285
<b>GLOBAL</b>			1.582	0,453

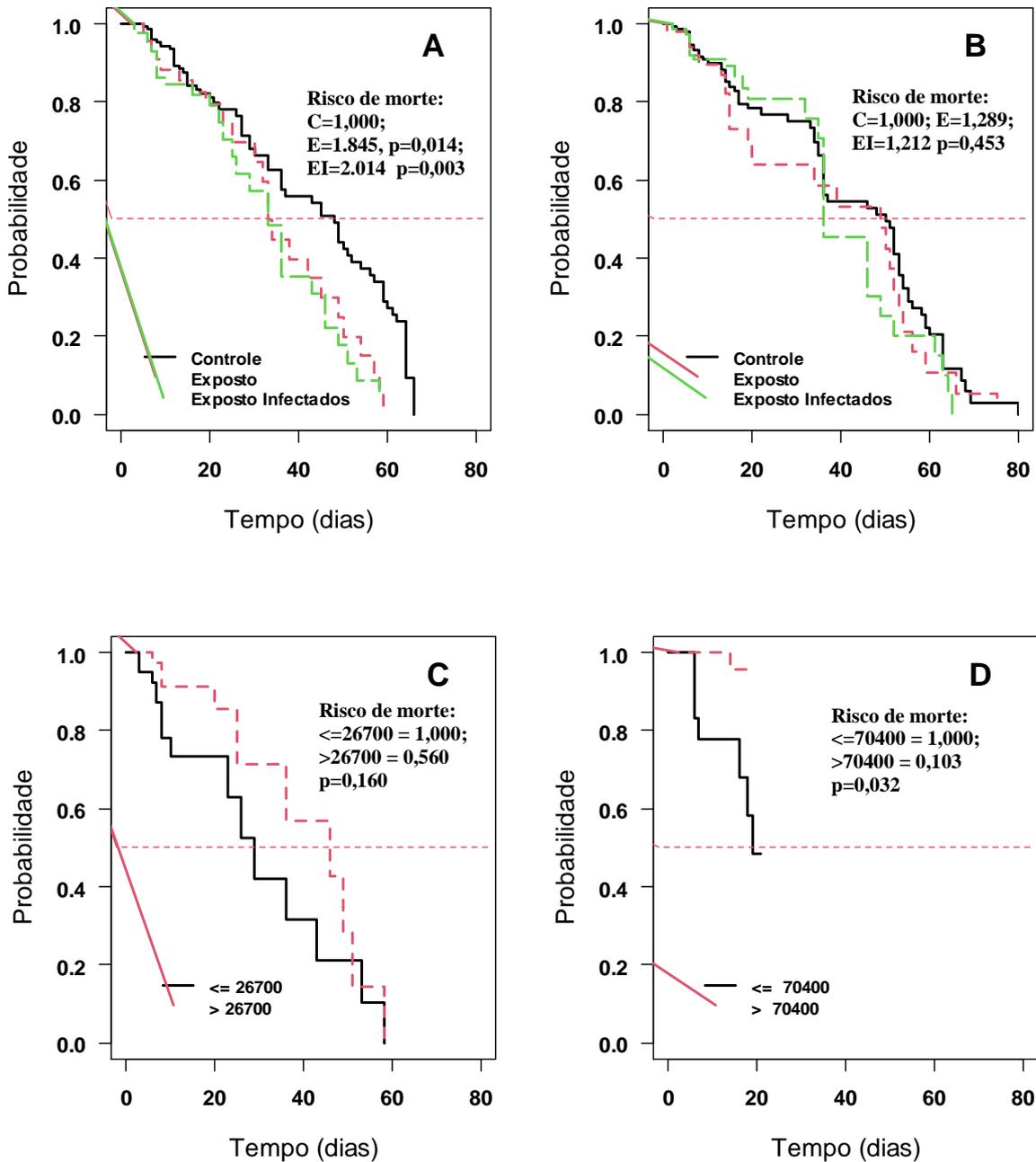
Fonte: A autora, 2021.

Legenda: IC: intervalo de confiança; Inf: limite inferior do IC; Sup: limite superior do IC; rho: coeficiente de correlação linear; chisq: estatística qui-quadrado; p: valor de p da estatística (CARVALHO et al., 2011)

Analisando-se a curva de sobrevivência em relação à carga viral, detectada por RT-qPCR, entre as fêmeas de RecLab infectadas com ZIKV, verificou-se que não houve diferença quando se comparam aquelas que apresentaram quantidades de cópias de RNA (NC) menores ou iguais a  $2,67E+09$  cópias por mL (valor mediano das NC obtidas), com as que apresentaram quantidades de RNA maiores que esses valores (Figura 16C). O ponto de corte para definição dos grupos (com maior e menor carga viral) foram os valores medianos das NC obtidos pelas fêmeas infectadas. Diferença significativa ( $p = 0,062$ ) foi encontrada para a colônia AeCamp (Tabela 7; Figura 16D), utilizando-se o mesmo critério (valores medianos de NC:  $7E+09$ ), em que o risco de morte entre as fêmeas com maior carga viral foi de 0,103 (9,69 vezes menor que o encontrado para o grupo com menor carga viral).

Adicionalmente, os tempos médios de vida entre as fêmeas da colônia RecLab e AeCamp foram maiores entre as fêmeas que apresentaram maior carga viral (18,51 dias,  $p = 0,021$ , para RecLab e 14,66 dias,  $p = 0,042$ , para AeCamp), com relação às que apresentaram menor número de cópias de RNA do ZIKV (14,62 e 11,79, para RecLab e AeCamp respectivamente). Desta análise, foram retiradas as fêmeas que foram censuradas (coletadas antes de morrerem) no 7º, 14º e 21º dias.

**Figura 16** – Curva de sobrevivência de fêmeas da espécie *Aedes aegypti* – colônia de laboratório– RecLab, ao longo de 66 dias de observação; colônia de campo - AeCamp, ao longo de 80 dias de observação, após exposição ao vírus Zika (ZIKV), e curva de sobrevivência de fêmeas de RecLab e AeCamp, em função do número de cópias de RNA do ZIKV (NC) por mL, detectadas por RT-qPCR



Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Nota: Grupos Controle; exposto e exposto infectado; Pontos de corte definidos pelos valores medianos das NCs, obtidos pelas fêmeas infectadas de cada colônia.

Legendas: A – colônia RecLab; B – colônia AeCamp; C – colônia RecLab ( $NCs \leq 2,67E+09 < NCs$ ); D – colônia AeCamp ( $NCs \leq 7E+09 < NCs$ ).

**Tabela 7** – Risco de morte de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônia de campo – AeCamp, após exposição ao vírus Zika (ZIKV), comparando-se quantidade de cópias de RNA (NC) por mL, detectadas por RT-qPCR. Grupos: NC  $\leq 7E+09$  e NC  $> 7E+09$

Variáveis	Hz	Sobrevida		Valor de p
		IC 95%		
		Inf	Sup	
Grupo NC $\leq 7E+09$	1,000			
Grupo NC $\geq 7E+09$	0,103	0,013	0,827	<b>0,032</b>

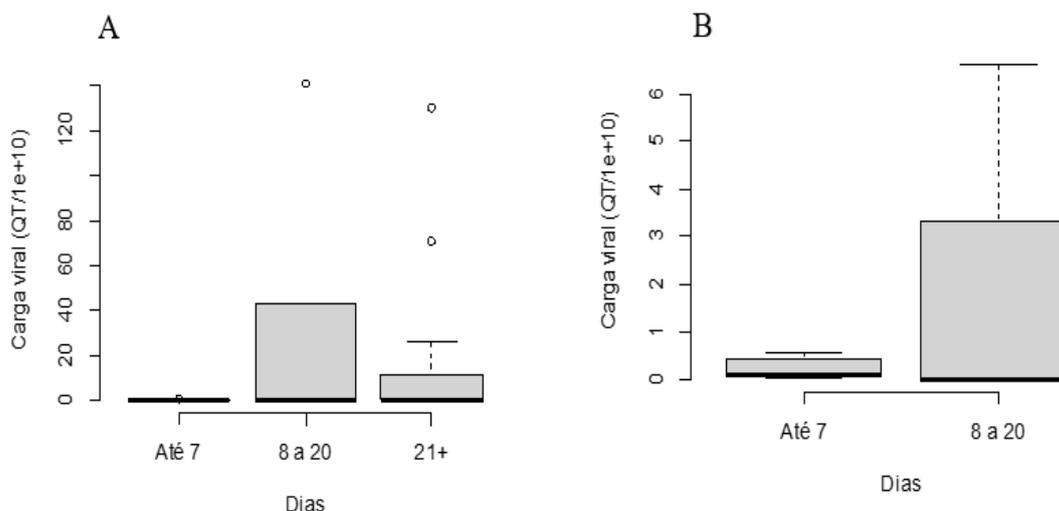
Variáveis	Proporcionalidade		Valor de p
	Análise de Schoenfeld		
	rho	chisq	
NC $\geq 7E+09$	0,173	0,250	0,617

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Legenda: IC: intervalo de confiança; Inf: limite inferior do IC; Sup: limite superior do IC; rho: coeficiente de correlação linear; chisq: estatística qui-quadrado; p: valor de p da estatística (CARVALHO et al., 2011)

Contudo, nas duas colônias de *Ae. aegypti* avaliadas, verificou-se que não houve correlação entre o tempo de vida e a carga viral das fêmeas infectadas com ZIKV,  $p = 0,571$ , para RecLab e  $p = 0,689$ , para AeCamp. Quando a análise foi feita categorizando-se o tempo de vida após a exposição, em três períodos (1: até 7 dias, 2: de 8 a 20 dias e 3:  $> 21$  dias), a carga viral também foi semelhante ( $p = 0,402$ , para RecLab e  $p = 0,286$ , para AeCamp), nas duas colônias de *Ae. aegypti* (Figura 17). Assim como nas análises de tempo médio de vida, desta também foram retiradas as fêmeas censuradas durante os experimentos.

**Figura 17** – Carga viral (número de cópias de RNA por mL - NC) e tempo de vida das fêmeas de *Aedes aegypti* das colônias de laboratório e de campo após exposição ao vírus Zika (ZIKV)



Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Legendas: (A) – RecLab; (B) – AeCamp

### 8.2.1.2 Fecundidade e Fertilidade

Na colônia de laboratório, RecLab, não se observou diferença significativa no número médio de ovos postos (fecundidade) entre os grupos C, E e EI, no primeiro e terceiro ciclos gonadotróficos (Tabela 8). Contudo, o número médio de ovos postos por fêmeas de RecLab, no segundo ciclo gonadotrófico, foi significativamente menor ( $p = 0,0490$ ) no grupo E: 42 ovos, em relação ao EI: 58 ovos. Os grupos E e EI não diferiram do grupo controle nos três ciclos analisados, sugerindo que a infecção não impactou na fecundidade dessa colônia (Figura 18).

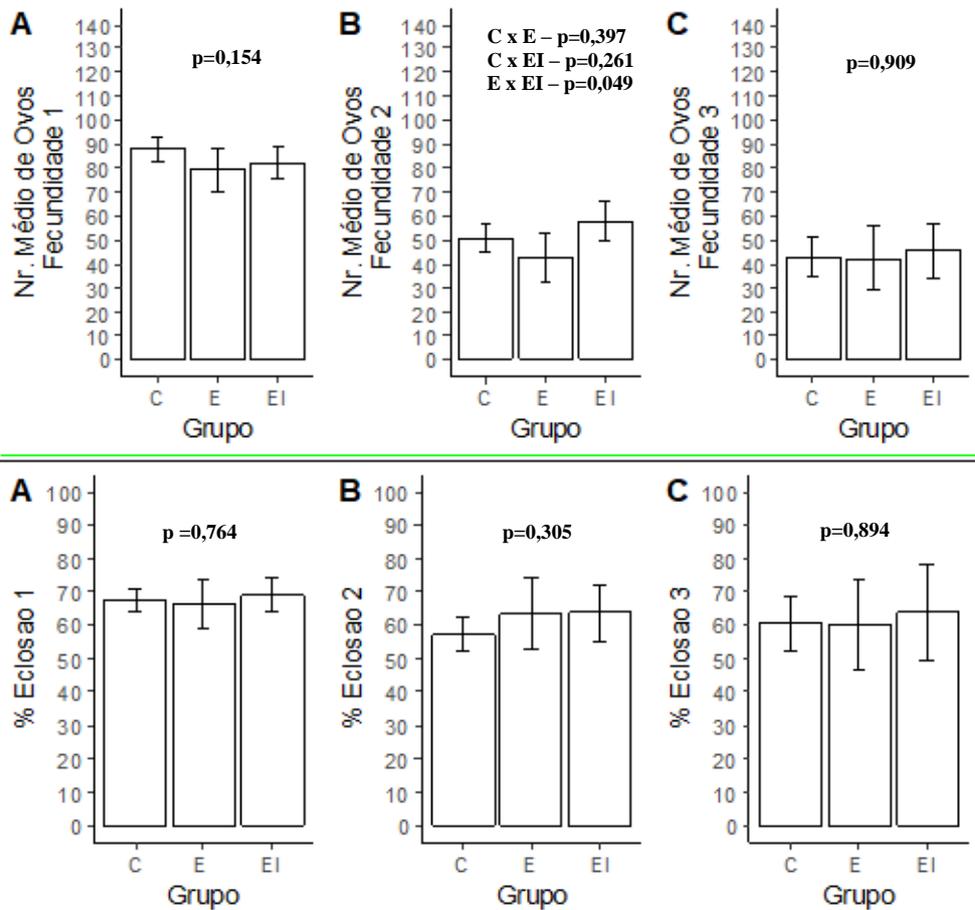
Com relação ao percentual de ovos viáveis (fertilidade) na colônia RecLab, não houve diferenças significativas entre os grupos C, E e EI nos três ciclos gonadotróficos (Figura 18).

**Tabela 8** – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão das larvas nos três primeiros ciclos gonadotróficos de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônia de laboratório - RecLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)

CG	Grupos	Fecundidade (n.º de ovos)				Valor de p	Fertilidade (n.º de larvas que eclodiram)				Valor de p
		Número de fêmeas avaliadas (N)	Intervalo de Confiança	Média	Mediana		Número de fêmeas avaliadas (N)	Intervalo de Confiança	Média	Mediana	
1º	Controle	149	82,95 - 92,71	87,83	88	<b>0,154</b>	149	55,79 – 65,40	60,60	59,00	<b>0,207</b>
	Exposto	46	70,02 - 88,24	79,13	74		46	45,25 – 58,93	52,09	52,50	
	Exposto infectado	83	75,42 – 88,72	82,07	89		82	51,53 - 64,29	57,91	61,00	
<b>Significância:</b>											
2º	Controle	67	44,49 – 55,96	50,22	52	<b>0,058</b>	67	25,19 – 33,49	29,34	28,00	<b>0,055</b>
	Exposto	22	32,79 – 52,57	42,68	34,5		22	19,45 – 35,82	27,64	23,00	
	Exposto infectado	34	49,51 – 66,55	58,03	62		34	30,66 - 44,93	37,79	38,5	
<b>Significância:</b> exposto x exposto I p = <b>0,049</b>											
3º	Controle	37	34,40 – 51,22	42,81	43	<b>0,909</b>	37	21,09 – 32,16	26,62	24,00	<b>0,580</b>
	Exposto	15	28,84 – 55,43	42,13	36		15	15,04 – 40,16	27,60	19,00	
	Exposto infectado	17	33,72 - 57,33	45,53	50		17	21,12 – 43,94	32,53	31,00	
<b>Significância:</b>											

Fonte: A autora, 2021.

**Figura 18** – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão por ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônia de laboratório - RecLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)



Fonte: A autora, 2021

Legendas: A) 1º ciclo gonadotrófico; B) 2º ciclo gonadotrófico; C) 3º ciclo gonadotrófico; C: Controle; E: exposto; EI: exposto infectado.

Em AeCamp, semelhante ao encontrado para RecLab, a fecundidade entre os grupos C, E e EI não diferiu significativamente no primeiro ciclo gonadotrófico (Tabela 9). Embora o número de ovos postos pelo grupo de fêmeas expostas, mas que não se infectaram (E), tenha sido significativamente maior no segundo ciclo gonadotrófico ( $p = 0,012$ ) em relação ao grupo controle (70,43 e 50,89 respectivamente). Ambos não diferiram do grupo de fêmeas infectadas (EI). No terceiro ciclo, o grupo EI apresentou menor fecundidade (42,07 ovos) em relação a E (63,27 ovos), entretanto, não diferiu do grupo controle (47,32 ovos), sugerindo não haver impacto da infecção por ZIKV sob a produção de ovos da colônia AeCamp (Tabela 9; Figura 19).

Com relação à fertilidade na colônia AeCamp, esta foi afetada pela exposição e infecção pelo ZIKV no primeiro ciclo, onde a redução ocorreu nos grupos E e EI, em relação ao grupo C (C: 65,46% - n.º médio de ovos eclodidos = 49,42; E: 50,68% - n.º médio de ovos

eclodidos = 35,94 e EI: 49,38% - n.º médio de ovos eclodidos = 34,09 -  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$  respectivamente). No segundo ciclo, EI (53,58% - n.º médio de ovos eclodidos = 28,52) apresentou menor percentual em relação ao C (64,85%, n.º médio de ovos eclodidos = 34,72 -  $p = 0,036$  -) e ao E (69,44%, n.º médio de ovos eclodidos = 48,43 -  $p = 0,030$ ) (Tabela 9; Figura 19).

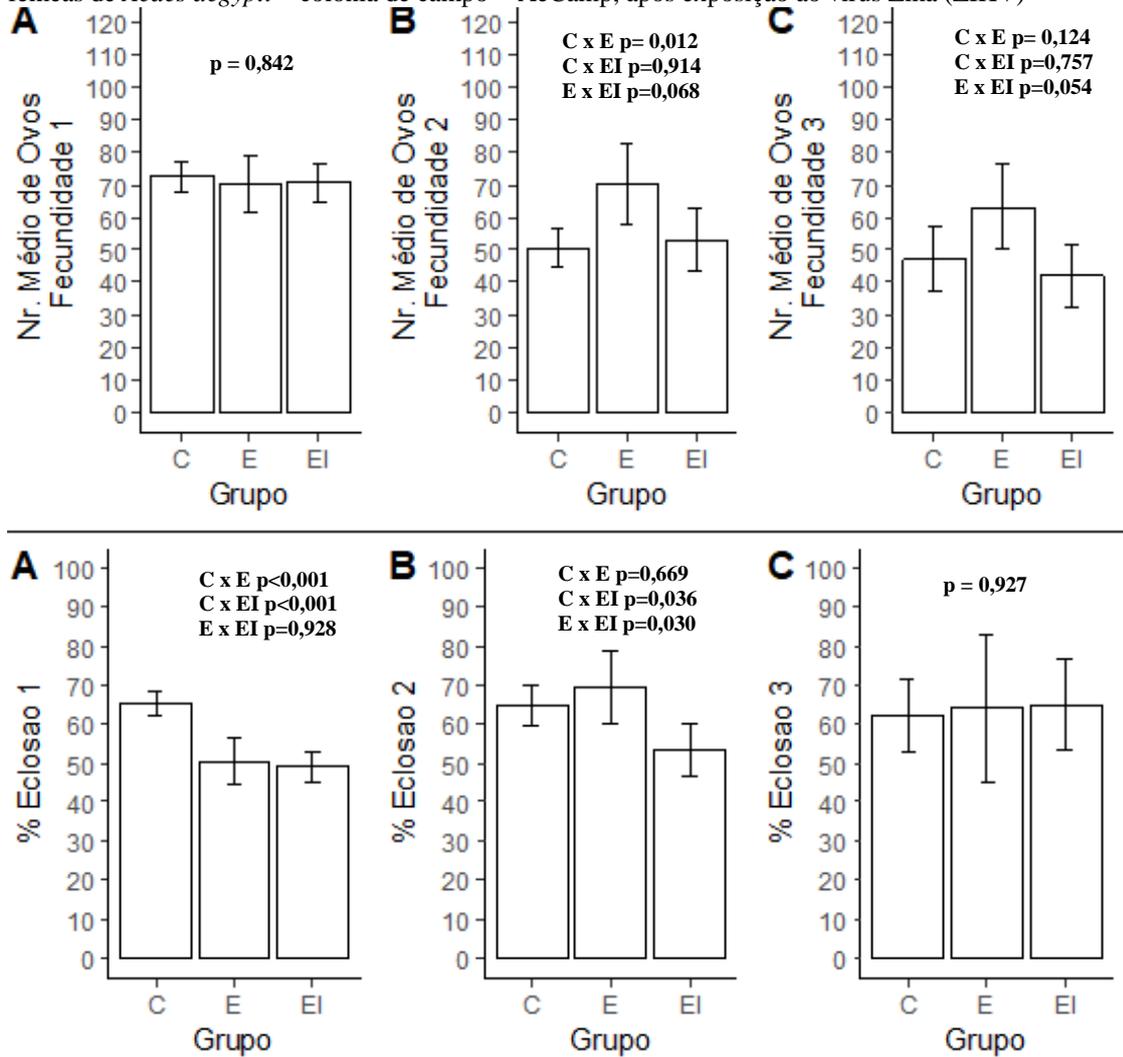
Analisando-se a fecundidade e fertilidade, no primeiro ciclo gonadotrófico, em relação à carga viral, detectada por RT-qPCR, entre as fêmeas de RecLab infectadas com ZIKV, verificou-se que não houve diferença significativa ( $p = 0,448$  e  $p = 0,670$ , para fecundidade e fertilidade respectivamente), utilizando-se o mesmo critério usado na avaliação de sobrevivência (valor mediano dos NCs =  $2,67E+09$  cópias por mL). A fecundidade e fertilidade no primeiro ciclo gonadotrófico também foram estatisticamente semelhantes, com relação à carga viral das fêmeas de AeCamp infectadas com ZIKV ( $p = 0,387$  e  $p = 0,715$ , para fecundidade e fertilidade respectivamente). O valor mediano detectado para esta colônia foi  $7E+09$  cópias de RNA. Os segundo e terceiros ciclos não foram avaliados.

**Tabela 9** – Números médios e medianas de ovos postos e de larvas que eclodiram nos três primeiros ciclos gonadotróficos (CG) de fêmeas de *Aedes aegypti*, colônia de campo – AeCamp, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)

CG	Grupos	Fecundidade (n.º de ovos)				Fertilidade (n.º de larvas que eclodiram)					
		Número de fêmeas avaliadas (N)	Intervalo de Confiança	Média	Mediana	Valor de p	Número de fêmeas avaliadas (N)	Intervalo de Confiança	Média	Mediana	Valor de p
1º	Controle	150	67,93 - 77,48	72,7	75,0	<b>0,842</b>	150	45,39 – 53,45	49,42	49,00	<b>&lt; 0,001</b>
	Exposto	50	61,97 - 78,79	70,4	70,0		50	30,24 - 41,64	35,94	36,00	
	Exposto infectado	76	64,99 - 76,85	70,9	71,5		76	30,44 - 37,74	34,09	35,50	
	<b>Significância:</b>		controle x exposto p < <b>0,001</b> ; controle x exposto infectado p < <b>0,001</b>								
2º	Controle	54	44,76 - 57,01	50,9	54,5	<b>0,016</b>	53	28,96 – 40,48	34,72	31,00	<b>0,011</b>
	Exposto	14	58,27 - 82,59	70,4	69,5		13	40,22 - 56,64	48,43	44,00	
	Exposto infectado	21	43,10 - 63,28	53,2	50,0		21	21,66 - 35,39	28,52	23,00	
	<b>Significância:</b>		exposto x controle p = <b>0,012</b>				controle x exposto p = <b>0,046</b> ; exposto x exposto infectado p = <b>0,008</b>				
3º	Controle	25	36,95 – 57,68	47,3	40,0	<b>0,057</b>	23	21,99 - 41,61	31,80	25,00	<b>0,160</b>
	Exposto	11	50,20 - 76,34	63,3	60,0		8	28,23 – 60,50	44,36	47,00	
	Exposto infectado	14	31,97 – 52,17	42,1	44,5		12	16,39 – 37,89	27,14	29,00	
	<b>Significância:</b>		exposto x exposto infectado p = <b>0,054</b>								

Fonte: A autora, 2021.

**Figura 19** – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão por ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônia de campo - AeCamp, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)



Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Legendas: A) 1º ciclo gonadotrófico; B) 2º ciclo gonadotrófico; C) 3º ciclo gonadotrófico;

C: Controle; E: exposto; EI: exposto infectado.

### 8.2.1.3 Atividade de Repasto Sanguíneo

A atividade de repastos sanguíneos das colônias RecLab e AeCamp (expressa pelo número e percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento, em até 30 minutos, em sistema de alimentação artificial, nos 7º, 14º e 21º dias da exposição ao vírus) não foi alterada pela exposição ou infecção (Tabela 10).

**Tabela 10** – Número e percentual de fêmeas das colônias de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, que completaram o repasto sanguíneo nos 7°, 14° e 21° dias após exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)

Colônias	DPE	Grupos	Repastos Sanguíneos				Valor de p	
			Negativo (-)		Positivo (+)			
			Nº	%	Nº	%		Nº total
RecLab	7°	Controle	42	35,59	76	64,41	118	0,695
		Exposto	16	43,24	21	56,76	37	
		Exposto infectado	22	38,6	35	61,4	57	
	14°	Controle	45	55,56	36	44,44	81	0,526
		Exposto	15	51,72	14	48,28	29	
		Exposto infectado	14	43,75	18	56,25	32	
	21°	Controle	21	72,41	8	27,59	29	0,085
		Exposto	7	43,75	9	56,25	16	
		Exposto infectado	14	77,78	4	22,22	18	
AeCamp	7°	Controle	61	52,59	55	47,41	116	0,142
		Exposto	24	64,86	13	35,14	37	
		Exposto infectado	30	57,69	22	42,31	52	
	14°	Controle	56	70	24	30	80	0,342
		Exposto	31	62	19	38	50	
		Exposto infectado	18	56,25	14	43,75	32	

Fonte: A autora, 2021.

Na seção 8.1, comparou-se a carga viral mediana entre as fêmeas que realizaram repasto sanguíneo pós-exposição ao ZIKV no 7° DPE em relação àquelas que não completaram esse repasto. Aqui, compara-se o mesmo parâmetro (atividade de repasto sanguíneo), em outra análise, onde se observou maior percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento no 7° DPE, dentro do grupo que apresentou número de cópias acima da mediana  $2,65 \times 10^9$ , na colônia RecLab ( $p = 0,032$ ) (Tabela 11), utilizando-se o mesmo critério descrito para sobrevivência, fecundidade e fertilidade (valores medianos dos NCs obtidos pelas fêmeas infectadas). Em AeCamp, o percentual de fêmeas alimentadas foi semelhante entre os grupos com maior e menor carga de ZIKV.

Categorizando a análise em função do tempo de vida após a exposição, verificou-se que a carga viral foi significativamente maior entre as fêmeas de RecLab que completaram o ingurgitamento no 7° DPE ( $p = 0,008$ ), e morreram entre o 8° e 22° DPE (Figura 20). Após o 22° dia, a carga viral de RecLab foi semelhante ( $p = 0,079$ ). Em AeCamp, embora se tenha observado um aumento no período de 8 a 22 dias (Figura 20), não foi significativo ( $p = 0,075$ ).

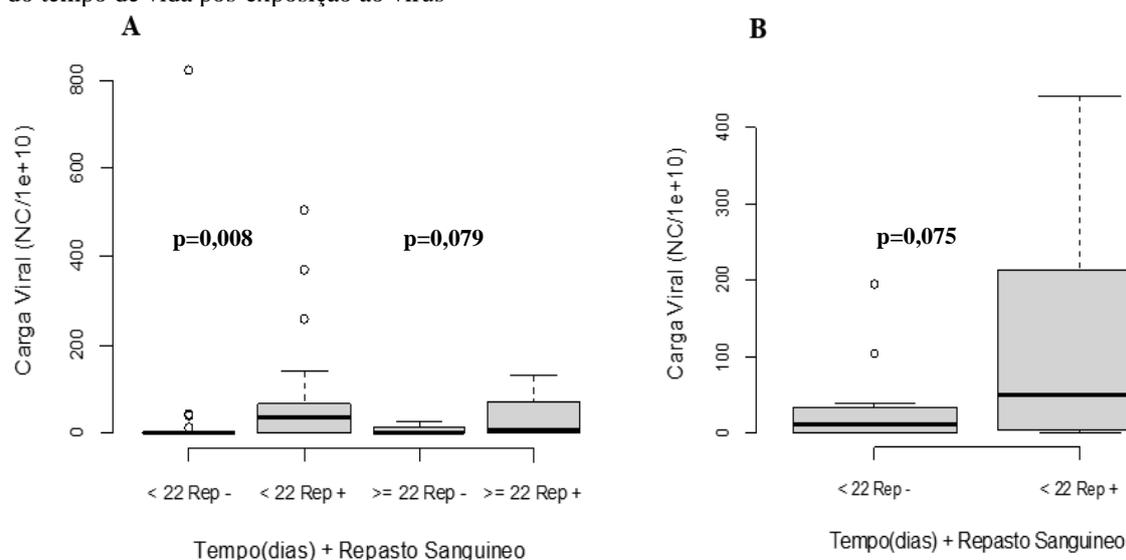
**Tabela 11** – Número e percentual de fêmeas das colônias de *Aedes aegypti* de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, infectadas com vírus Zika (ZIKV), que completaram o repasto sanguíneo no 7º dia pós-exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais, em função do número de cópias de RNA do vírus Zika (NC) por mL, detectadas por RT-qPCR

Colônias	Grupos	Repastos Sanguíneos				Valor de p	
		Negativo (-)		Positivo (+)			
		Nº	%	Nº	%		Nº total
RecLab	NCs $\leq 2,67E+09$	12	60,00	8	40,00	20	<b>p = 0,032</b>
	NCs $>2,67E+09$	8	25,81	23	74,19	31	
AeCamp	NCs $\leq 7E+09$	11	73,33	4	26,67	15	<b>p = 0,480</b>
	NCs $> 7E+09$	13	56,52	10	43,48	23	

Fonte: A autora, 2021.

Notas: Grupos: colônia RecLab (NCs  $\leq 2,67E+09$  e NCs  $>2,67E+09$ ); Colônia AeCamp (NCs  $\leq 7E+09$  e NCs  $> 7E+09$ ). Pontos de corte definidos pelos valores medianos das NCs, obtidos pelas fêmeas infectadas de cada colônia.

**Figura 20** – Carga viral (número de cópias de RNA do ZIKV – NC, por mL, detectadas por RT-qPCR), nas colônias de *Aedes aegypti* de laboratório - RecLab e campo - AeCamp, infectadas com vírus Zika (ZIKV), que completaram o repasto sanguíneo no 7º dia pós-exposição (DPE), em sangue livre de partículas virais, em função do tempo de vida pós-exposição ao vírus



Fonte: A autora, 2021.

Legendas: A: colônia RecLab; B: colônia AeCamp.

Notas: < 22 Rep -: fêmeas que não realizaram o repasto sanguíneo no 7º DPE pós-exposição ao ZIKV e morreram até o 21º DPE; >=22 Rep -: fêmeas que não realizaram o repasto sanguíneo no 7º DPE pós-exposição ao ZIKV e morreram a partir do 22º DPE; < 22 Rep +: fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo no 7º DPE pós-exposição ao ZIKV e morreram até o 21º DPE; >=22 Rep +: fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo no 7º DPE pós-exposição ao ZIKV e morreram a partir do 22º DPE.

### 8.2.2 Custo biológico da infecção com o vírus chikungunya (CHIKV) em *Ae. aegypti*

Para análise do custo biológico com CHIKV, os grupos foram definidos de acordo com os resultados da exposição. Desse modo, esses foram devidos em dois: controle (C) e expostos infectados (EI), considerando que, com esse vírus, as taxas de infecção foram mais

altas (acima de 90%), o que tornou o número de expostos não infectados insuficiente para análise estatística (representando 4% e 8% para RecLab e AeCamp respectivamente).

### 8.2.2.1 Sobrevida e Longevidade

A curva de sobrevivência da colônia de laboratório (RecLab), após exposição ao CHIKV, não apresentou proporcionalidade ( $p = 0,008$ ) quando avaliada ao longo dos 69 dias de observação (período de acompanhamento da longevidade). Desse modo, foi feita a estratificação dos grupos em dois períodos: 1 – até 20 dias de observação e 2 – a partir do 21º dia de observação. Após estratificação, encontrou-se proporcionalidade ( $p = 0,799$ ) nas curvas de sobrevida dos dois períodos selecionados. Os resultados obtidos com a colônia RecLab, após exposição com o CHIKV, mostraram impacto da infecção (risco de morte = 3,963 para o grupo exposto infectado) sobre as curvas de sobrevivência (Tabela 12; Figura 21), entretanto essa diferença apareceu apenas entre o dia zero e o 20º dia de observação ( $p = 0,001$ ). A análise estatística não apresentou normalidade entre os números médios de tempo de vida, por isso, neste caso, analisaram-se as medianas. As medianas entre os grupos também diferiram significativamente entre as fêmeas de RecLab (38 e 17 dias para C e E, respectivamente –  $p = 0,002$ ).

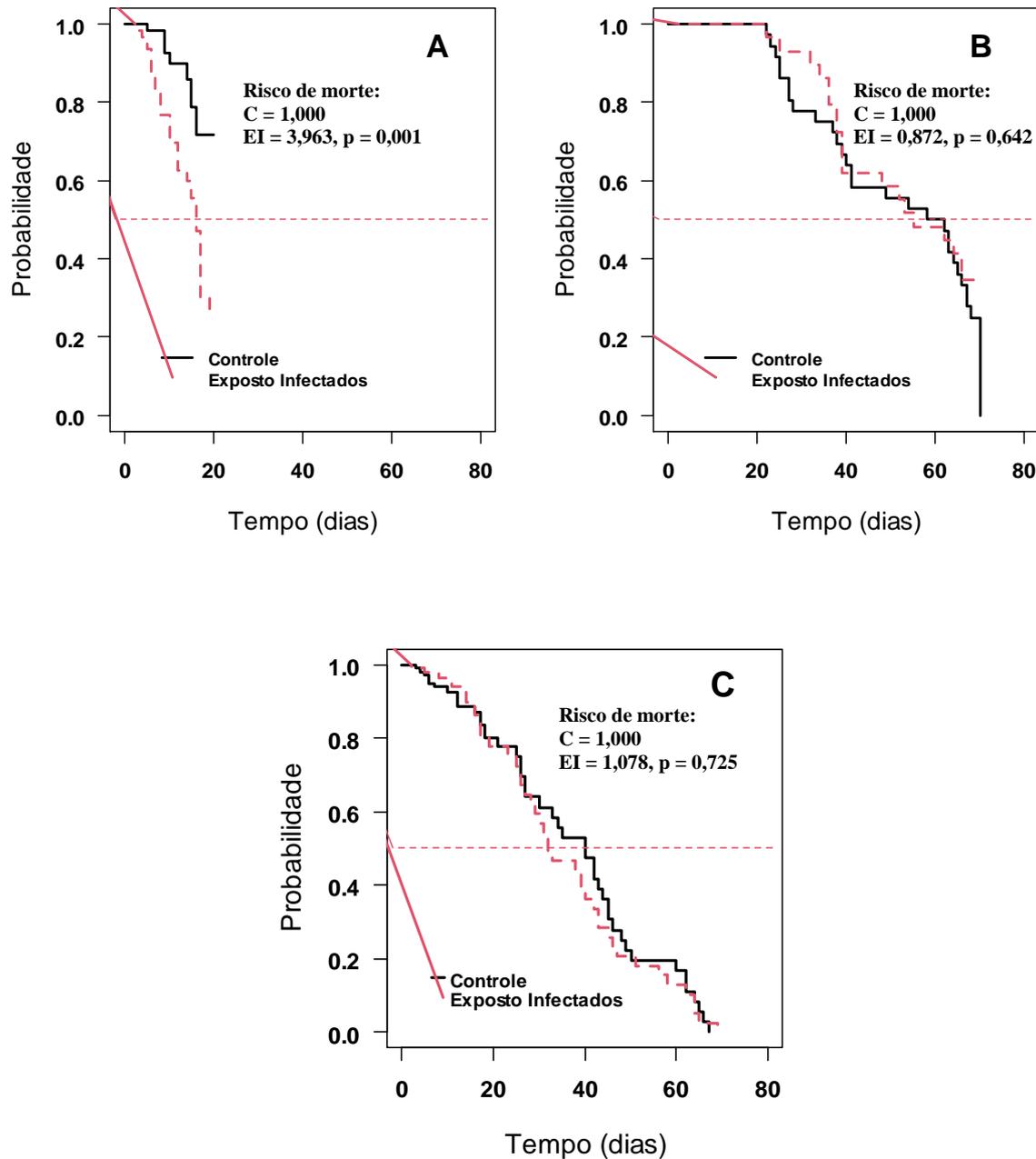
**Tabela 12** – Risco de morte de fêmeas da colônia de *Aedes aegypti* de laboratório – RecLab após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV) ao longo dos primeiros 20 dias de observação

Variáveis	Hz	Sobrevida		Valor de p
		IC 95%		
		Inf	Sup	
Grupo Controle	1,000			
Grupo Exposto infectado	3,963	1,73	9,08	<b>0,001</b>
Variáveis	Proporcionalidade		Valor de p	
	Análise de Schoenfeld			
	rho	chisq		
Exposto I		-0,0427	0,0647	<b>0,799</b>

Fonte: A autora, 2021.

Legendas: IC: intervalo de confiança; Inf: limite inferior do IC; Sup: limite superior do IC; rho: coeficiente de correlação linear; chisq: estatística qui-quadrado; p: valor de p da estatística (CARVALHO et al., 2011)

**Figura 21** – Curvas de sobrevivência: indivíduos da colônia de *Aedes aegypti* de laboratório – RecLab, ao longo de 70 dias, e da colônia de campo - AeCamp, ao longo 69 dias de observação, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV)



Fonte: A autora, 2021.

Legendas A) Colônia RecLab - período de observação menor ou igual a 20 dias; B) Colônia RecLab - período de observação maior que 20 dias; C) Colônia AeCamp – período de observação de 69 dias.

Por outro lado, na colônia de campo – AeCamp –, as curvas de sobrevivência não apresentaram diferença significativa entre os grupos E e EI (Figura 21; Tabela 13). As medianas foram de 37,5 dias para o grupo C e de 32 dias para o grupo EI.

**Tabela 13** – Risco de morte de fêmeas da colônia de *Aedes aegypti* de campo – AeCamp após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV)

Variáveis	Hz	Sobrevida		Valor de p
		IC 95%		
		Inf	Sup	
Grupo Controle	1,000			
Grupo Exposto I	0,928	0,7092	1,638	<b>0,725</b>

Variáveis	Proporcionalidade		Valor de p
	Análise de Schoenfeld		
	rho	chisq	
Exposto I	0,0073	0,0047	<b>0,945</b>

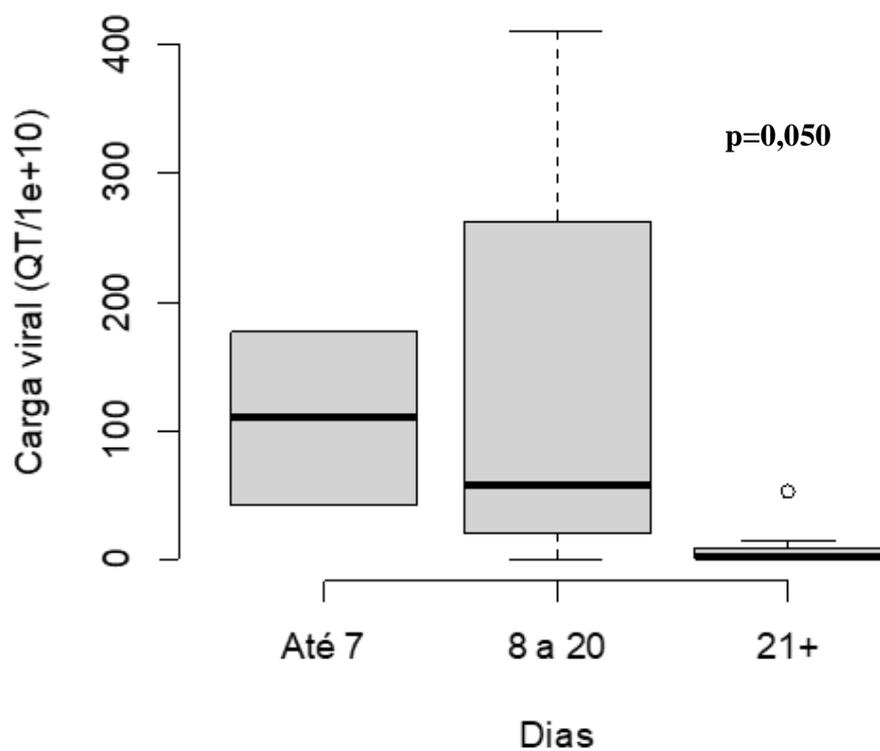
Fonte: A autora, 2021.

Legendas: IC – intervalo de confiança; Inf – limite inferior do IC; Sup – limite superior do IC; rho – coeficiente de correlação linear; chisq – estatística qui-quadrado; p – valor de p da estatística (CARVALHO et al., 2011)

Analisando-se a curva de sobrevivência em relação à quantidade de cópias de RNA (NC), detectadas por RT-qPCR, entre as fêmeas de RecLab e AeCamp infectadas com CHIKV, verifica-se que não houve diferença significativa (RecLab:  $p = 0,726$ ; AeCamp:  $p = 0,903$ ) quando se comparam as que apresentaram maior ou menor carga viral, utilizando-se o mesmo critério descrito para ZIKV. Os valores medianos entre as infectadas com CHIKV foram de  $5,5E+11$  para colônia RecLab, e de  $5,6E+11$ , para colônia AeCamp. O tempo médio de vida das fêmeas infectadas com relação à carga viral, em RecLab, também foi semelhante ( $p = 0,104$ ). Porém, em AeCamp, as fêmeas que apresentaram carga viral acima do valor mediano de NC tiveram menor tempo médio de vida (12 dias,  $p < 0,001$ ) em relação às que apresentaram menor número de cópias de RNA ao morrer (28, 45 dias).

Essa diferença não apareceu quando se realizou análise de correlação ( $p = 1,385$ , para RecLab e  $p = 0,112$ , para AeCamp). Categorizando-se os tempos de vida de AeCamp após a exposição, por período (1: até 7 dias; 2: de 8 a 20 dias, e 3: > 21 dias), a carga viral das fêmeas infectadas com CHIKV diferiu, reduzindo ( $p = 0,050$ ) entre os períodos 2 e 3, em AeCamp (Figura 22). Não foi possível essa última análise entre os indivíduos de RecLab pelo número insuficiente da amostra de infectadas após o 20º dia.

**Figura 22** – Carga viral (número de cópias de RNA por mL - NC) e tempo de vida das fêmeas de *Aedes aegypti* da colônia de campo - AeCamp, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV) por período: até 7 dias; de 8 a 20 dias e > 21 dias



Fonte: A autora, 2021.

#### 8.2.2.2 Fecundidade e Fertilidade

As análises dos dados dos experimentos com CHIKV, com relação à fecundidade e fertilidade, referem-se ao primeiro ciclo gonadotrófico. Utilizou-se o número médio de ovos para análise de fecundidade (número de ovos postos por fêmea) da colônia RecLab em relação ao CHIKV. Para as avaliações de fertilidade de RecLab, bem como para fecundidade e fertilidade de AeCamp, foi necessária a utilização da mediana após análise dos pressupostos de normalidade.

Os resultados apresentados mostram que a fecundidade das fêmeas da colônia RecLab não foi alterada significativamente pela infecção com o CHIKV no primeiro ciclo gonadotrófico. Por outro lado, a infecção impactou a fertilidade, com redução no percentual mediano de eclosão ( $p < 0,001$ ) de 63,48%, no grupo C, para 40,67% no grupo EI (Figura 23). Diferentemente, em AeCamp, o CHIKV impactou na fecundidade, reduzindo o número mediano de ovos ( $p < 0,001$ ) de 48, no grupo C, para 38 no grupo EI (Tabela 14; Figura 23), e

a fertilidade, com redução no percentual mediano de 57,50% para 37,50% ( $p < 0,001$ ), entre os grupos C e EI respectivamente (Figura 23).

Em relação à carga viral, tanto em RecLab como em AeCamp infectadas com CHIKV, a fecundidade e fertilidade no primeiro ciclo gonadotrófico foram semelhantes quando se comparam as que apresentaram maior ou menor NC detectadas por RT-qPCR (RecLab: NC mediano =  $5,5E+11$ ; AeCamp: NC mediano =  $5,6E+11$ ).

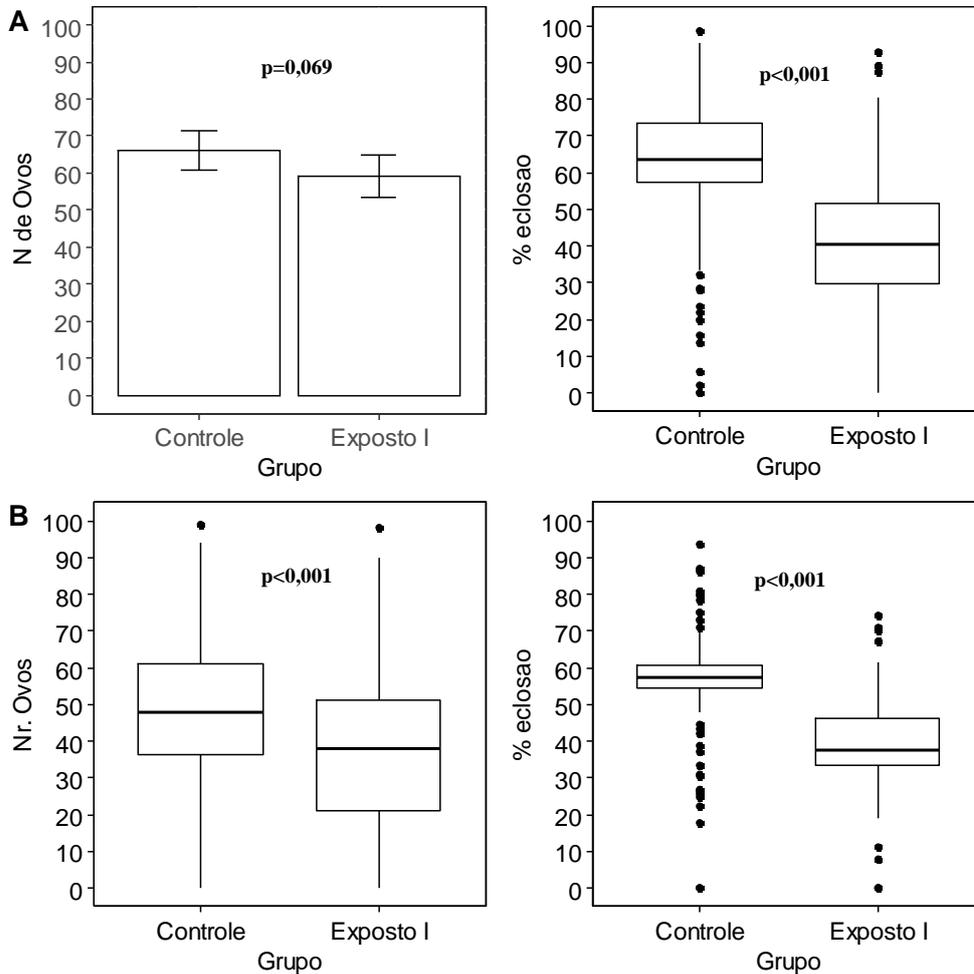
**Tabela 14** – Número médio e mediana de ovos postos e número médio e mediana de larvas que eclodiram nos três primeiros ciclos gonadotróficos de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônias de laboratório - RecLab e campo – AeCamp, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV)

Colônia		Grupos	Número de fêmeas avaliadas (N)	Intervalo de Confiança (IC)	Média	Mediana	Valor de p
Fecundidade (n° de ovos)	RecLab	Controle	99	60,87 – 71,48	66,17	68,00	<b>0,069</b> <sup>1</sup>
		Exposto infectado	98	53,23 – 64,72	58,98	61,00	
	AeCamp	Controle	100	47,00 - 55,50	50,56	48,00	<b>&lt; 0,001</b> <sup>2</sup>
		Exposto infectado	94	36,50 – 45,50	39,60	38,00	
Fertilidade (n° de larvas que eclodiram)	RecLab	Controle	98	35,50 – 44,50	39,89	39,50	<b>&lt; 0,001</b> <sup>2</sup>
		Exposto infectado	94	21,00 - 27,50	24,44	23,00	
	AeCamp	Controle	97	27,00 – 33,50	29,78	29,00	<b>&lt; 0,001</b> <sup>2</sup>
		Exposto infectado	88	14,50 – 19,50	16,91	16,00	

Fonte: A autora, 2021.

Notas: <sup>1</sup>Teste t-Student; <sup>2</sup>Mann-Whitney.

**Figura 23** – Números médio ou mediano de ovos e percentual mediano de eclosão de larvas de fêmeas de *Aedes aegypti* – colônia de laboratório - RecLab e colônia de campo - AeCamp, no primeiro ciclo gonadotrófico, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV)



Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

Legendas: A) Colônia RecLab; B) Colônia AeCamp. C) Controle; EI) exposto infectado.

### 8.2.2.3 Atividade de Repasto Sanguíneo

A atividade de repasto sanguíneo de fêmeas da colônia RecLab, após 7 dias da exposição ao CHIKV, não foi alterada pela exposição ou infecção. O percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento foi de 42,50% (n = 34, entre 80 avaliadas) e 43,42% (n = 33, entre 76 avaliadas) para os grupos controle e infectados respectivamente (Tabela 15).

A carga viral entre as fêmeas de RecLab que realizaram o repasto sanguíneo no 7º DPE não diferiu dos grupos que não realizaram essa alimentação sanguínea (p = 0,606).

**Tabela 15** – Número e percentual de fêmeas de *Aedes aegypti*, colônia de laboratório - RecLab que completaram o repasto sanguíneo em sangue livre de partículas virais, após exposição ao vírus chikungunya (CHIKV), no 7º dia pós-exposição (DPE)

Grupos	Repastos Sanguíneos				Nº total	Valor de p
	-		+			
	Nº	%	Nº	%		
<b>Controle</b>	46	57,50	34	42,50	80	<b>1,000</b>
<b>Exposto infectado</b>	43	56,58	33	43,42	76	

Fonte: A autora, 2021.

Não foi possível avaliar estatisticamente a busca por um segundo repasto sanguíneo na colônia AeCamp exposta ao CHIKV, pelo número limitado de fêmeas que se alimentaram na semana subsequente à exposição. Considera-se, além do número de indivíduos que foi reduzindo durante os experimentos, por censura ou morte das fêmeas, o fato de AeCamp ser uma colônia recém chegada de campo, em processo de adaptação à alimentação artificial.

### 8.2.3 Custo biológico da infecção com o vírus Zika (ZIKV) em *Culex quinquefasciatus*

Para análise do custo biológico de *Cx. quinquefasciatus*, colônia de laboratório, CqSLab, exposta ao ZIKV, os grupos foram definidos de acordo com os resultados da exposição. Desse modo, esses foram divididos em três: controle (C); expostos, que não se infectaram (E) e expostos infectados (EI).

#### 8.2.3.1 Sobrevida e Longevidade

A sobrevida (expressa pelo risco de morte) da colônia CqSLab não apresentou diferença significativa entre os três grupos avaliados ao longo de 70 dias de observação. O risco de morte foi 1,300 para o grupo E e de 0,805 para EI (Tabela 16; Figura 24). O tempo médio de vida para cada grupo também se mostrou semelhante (34, 73; 31, 34 e 39, 50 dias, para C, E e EI respectivamente).

**Tabela 16** – Risco de morte de fêmeas da colônia de *Culex quinquefasciatus* de laboratório – CqSLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)

Variáveis	Hz	Sobrevida		Valor de p
		IC 95%		
		Inf	Sup	
Grupo Controle	1,000			
Grupo Exposto	1,300	0,903	1,871	<b>0,158</b>
Grupo Exposto I	0,805	0,473	1,368	<b>0,422</b>

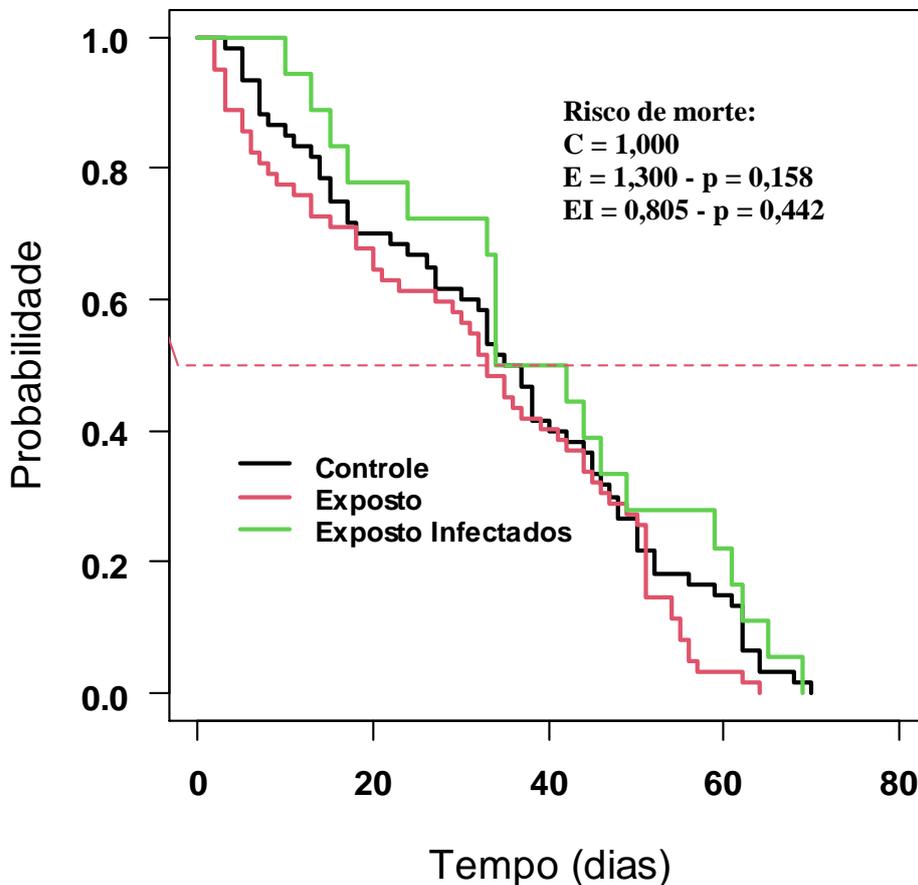
  

Variáveis	Proporcionalidade		Valor de p
	Análise de Schoenfeld		
	rho	chisq	
Exposto	0,051	0,373	<b>0,541</b>
Exposto I	0,032	0,144	<b>0,704</b>
<b>GLOBAL</b>		0,411	<b>0,814</b>

Fonte: A autora, 2021.

Legendas: IC – intervalo de confiança; Inf – limite inferior do IC; Sup – limite superior do IC; rho: coeficiente de correlação linear; chisq – estatística qui-quadrado; p – valor de p da estatística (CARVALHO et al., 2011)

**Figura 24** – Curva de sobrevivência de fêmeas da espécie *Culex quinquefasciatus* – colônia de laboratório – CqSLab, ao longo de 70 dias de observação, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)



Fonte: A autora, 2021.

Grupos Controle; exposto e exposto infectado.

### 8.2.3.2 Fecundidade e Fertilidade

A fecundidade de CqSLab reduziu significativamente, no primeiro ciclo gonadotrófico, entre as fêmeas que foram expostas ao ZIKV e não desenvolveram a infecção (E: 76,90 ovos), com relação ao grupo controle - C ( $p < 0,001$ ) (Tabela 17; Figura 25). Os números médios de ovos postos entre os grupos controle (C: 102,25 ovos) e exposto infectado (EI: 92,67 ovos) foram semelhantes.

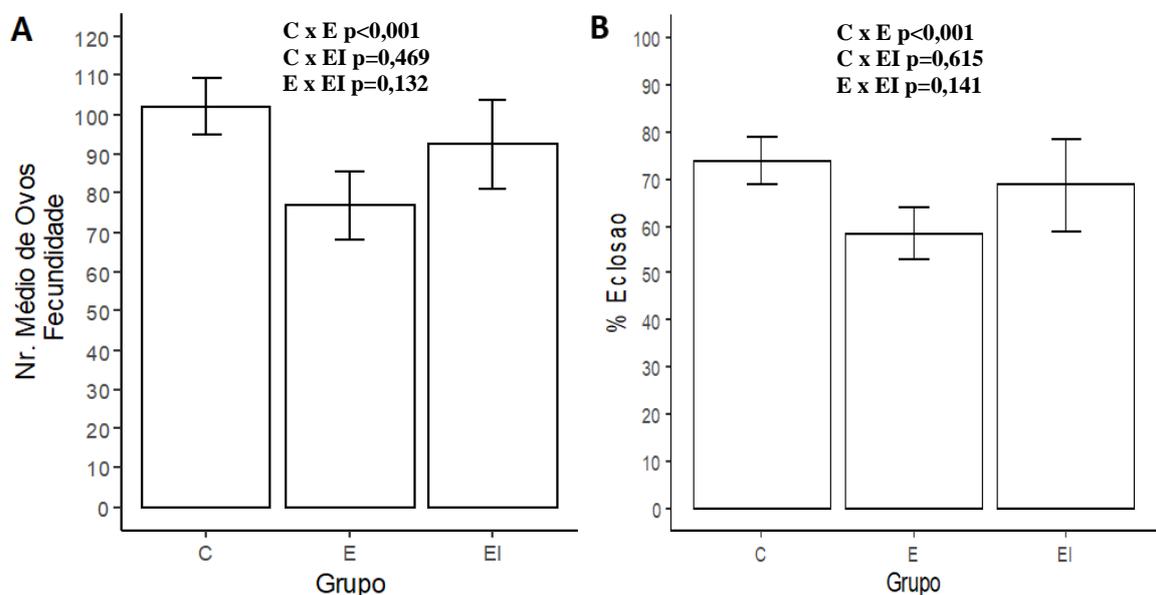
Do mesmo modo, com relação ao percentual médio de ovos viáveis (fertilidade) na colônia CqSLab, não houve diferenças significativas entre os grupos C e EI. O percentual de eclosão reduziu significativamente entre as fêmeas expostas não infectadas (E: 58,20% e C: 73,76%,  $p < 0,001$ ) (Tabela 17; Figura 25).

**Tabela 17** – Número médio e mediana de ovos postos e número médio e mediana de larvas que eclodiram no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* – colônia de laboratório – CqSLab, após exposição ao vírus Zika (ZIKV)

Parâmetro	Grupos	N	Intervalo de Confiança (IC)	Média	Mediana	Valor de p
Fecundidade (n° de ovos)	Controle	60	95,12 - 109,38	102,25	105,00	<b>p &lt; 0,001</b>
	Exposto	61	68,09 - 85,71	76,90	85,00	
	Exposto infectado	18	81,19 - 104,14	92,67	94,50	
<b>Significância: controle x exposto p&lt;0,001</b>						
Fertilidade (n° de larvas que eclodiram)	Controle	59	75,50 – 86,77	81,14	83,00	<b>p &lt; 0,001</b>
	Exposto	56	57,85 – 70,18	64,02	70,50	
	Exposto infectado	18	64,73 – 86,27	75,50	78,00	
<b>Significância: controle x exposto p&lt;0,001</b>						

Fonte: A autora, 2021.

**Figura 25** – Número médio de ovos postos e percentual médio de eclosão de larvas de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* – colônia de laboratório – CqSLab, no primeiro ciclo gonadotrófico após exposição ao vírus Zika (ZIKV)



Fonte: A autora, 2021.

### 8.2.3.3 Atividade de Repasto Sanguíneo

A atividade de busca por repasto sanguíneo de fêmeas da colônia CqSLab, após 7 dias da exposição ao ZIKV, não foi alterada pela exposição ou infecção. O percentual de fêmeas que completaram o ingurgitamento foi de 65,45%, (entre 55 avaliadas); 71,15% (entre 52 avaliadas) e 72,22% (entre 18 avaliadas), para os grupos controle (C), exposto não infectado (E) e exposto infectados (EI) respectivamente (Tabela 18).

**Tabela 18** – Número e percentual de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, colônia de laboratório - CqSLab que completaram o repasto sanguíneo em sangue livre de partículas virais, após exposição ao vírus Zika (ZIKV), no 7º dia pós- infecção (DPE)

Grupos	Repastos Sanguíneos				Nº total	Valor de p
	-		+			
	Nº	%	Nº	%		
Controle	19	34,55	36	65,45	55	p = 0,771
Exposto	15	28,85	37	71,15	52	
Exposto infectado	5	27,78	13	72,22	18	

Fonte: Dados da pesquisa, 2021.

### 8.2.4 Sistematização dos resultados sobre custo biológico da exposição aos ZIKV e CHIKV

O quadro 5 apresenta uma síntese sistematizada dos principais resultados encontrados neste estudo com relação ao custo biológico das colônias de *Ae. aegypti* (RecLab e AeCamp), após exposição aos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), e de *Cx. quinquefasciatus*, após exposição ao ZIKV.

**Quadro 5** – Custo biológico das colônias de *Aedes. aegypti* (RecLab e AeCamp) após exposição aos vírus Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), e de *Culex quinquefasciatus* após exposição ao ZIKV, incluindo os parâmetros de sobrevivência, longevidade, fecundidade, fertilidade, carga viral e atividade de repasto sanguíneo

Parâmetros avaliados	ZIKV			CHIKV	
	RecLab	AeCamp	CqSLab	RecLab	AeCamp
Sobrevivência	Reduzida pela exposição e infecção	Não alterada	Não alterada	Reduzida pela infecção	Não alterada
Longevidade	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Reduzida pela infecção	Não alterada
Carga viral em relação ao tempo de vida	Aumentou com o tempo de vida das fêmeas infectadas	Aumentou com o tempo de vida das fêmeas infectadas	Não avaliada	Não alterada	Reduziu com o tempo de vida das fêmeas infectadas
Fecundidade	Não alterada	Não alterada	Reduzida pela exposição	Não alterada	Reduzida pela infecção
Fertilidade	Não alterada	Reduzida pela infecção	Reduzida pela exposição	Reduzida pela infecção	Reduzida pela infecção
Fecundidade e fertilidade no primeiro ciclo gonadotrófico, em relação à carga viral	Não alterada	Não alterada	Não avaliada	Não alterada	Não alterada
Atividade de repasto sanguíneo	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada

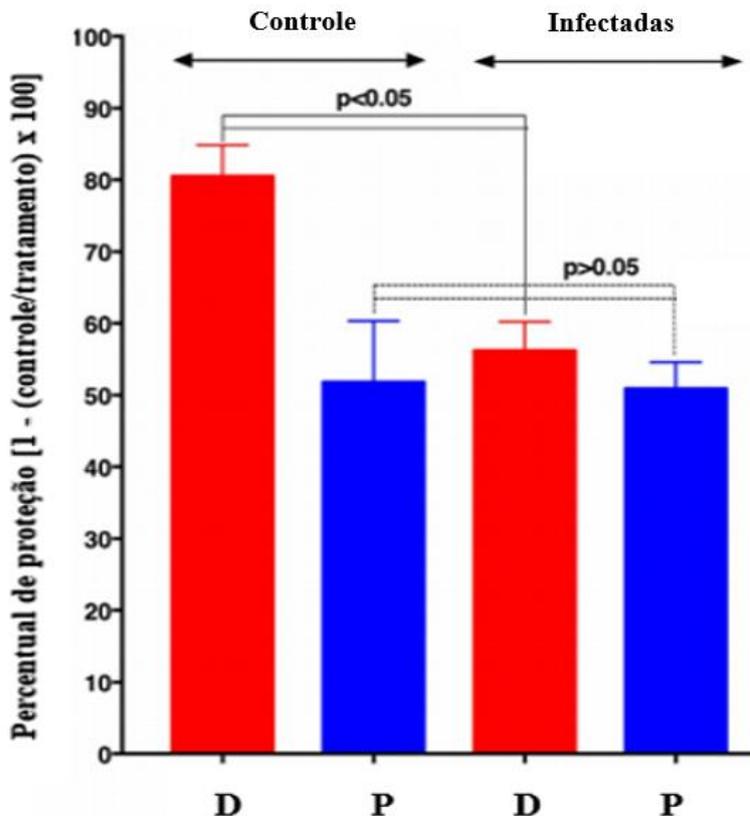
Fonte: A autora, 2021.

### 8.3 RESPOSTA DE *Ae. aegypti* AOS REPELENTES DEET – N,N-DIETIL-3-METILBENZAMIDA E PICARIDINA (HIDROXIETIL ISOBUTIL-PIPERIDINA CARBOXILATO DE ETILO)

Parte dos resultados obtidos neste trabalho de Tese consiste na avaliação de suscetibilidade da colônia *Ae. aegypti* de laboratório (RecLab) aos repelentes DEET – N,N-diethyl-3-metilbenzamida e Picaridina (hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato de etilo), após infecção pelo ZIKV, considerando o papel dos repelentes no controle de mosquitos vetores e o impacto causado pela infecção viral sobre vários aspectos da capacidade vetorial, incluindo alterações nas respostas a repelentes. Esses resultados foram publicados em Leal et al. (2017), artigo anexo.

Os resultados obtidos, comparando-se a proteção entre os dois repelentes estudados, mostraram que o DEET a 1% apresentou eficácia significativamente maior (proteção,  $80,5 \pm 4,3\%$ ) contra *Ae. aegypti*, colônia RecLab, do que a Picaridina (proteção,  $51,8 \pm 8,5\%$ ), também testada a 1% ( $n = 4-6$ ;  $P = 0,018$ , teste bicaudal de Mann-Whitney) (Figura 26).

**Figura 26** – Proteção induzida pelo DEET (-N,N-diethyl-3-methylbenzamide) ou Picaridina (hidroxietil isobutil-piperidina carboxilato de etilo) a 1%, contra mosquitos *Aedes aegypti*, colônia de laboratório – RecLab, infectados e não infectados (Controle) pelo ZIKV



Fonte: Adaptado de Leal et al. (2017).

Legendas: D: DEET (barras em vermelho); P: Picaridina (barras em azul)

Nas avaliações do impacto da infecção sobre a resposta de RecLab infectados com o vírus Zika a esses repelentes, observou-se redução significativa na resposta ao DEET das

fêmeas infectadas, na dose de 1%, em relação às não infectadas ( $n = 7$  não infectados,  $n = 17$  infectados pelo ZIKV;  $P = 0,033$ ) (Figura 26). A Picaridina induziu menor resposta, na mesma dose, nos mosquitos infectados em relação aos não infectados. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $n = 4$  não infectados,  $n = 21$  infectados por ZIKV;  $P = 0,84$ , teste de Mann-Whitney bicaudal).

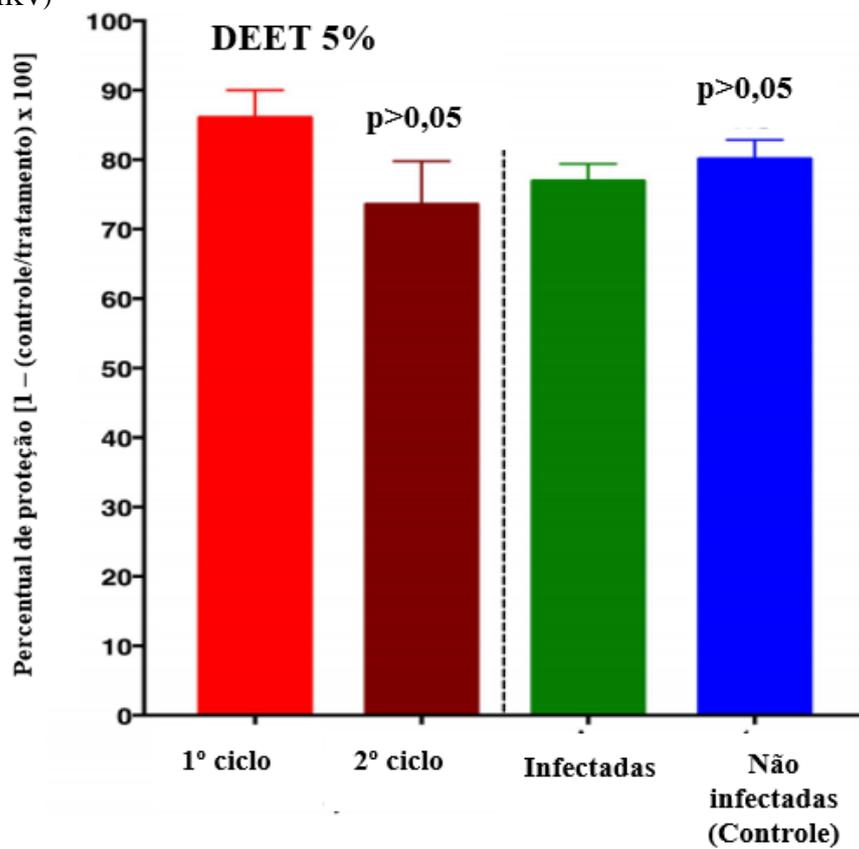
A Figura 26 apresenta também os dados obtidos com a colônia de Fernando de Noronha (FN), por fazerem parte do artigo publicado. Entretanto, as avaliações com a colônia de FN não estão nos objetivos deste trabalho de tese, não sendo, por isso, aqui comentadas.

Para avaliar se a idade das fêmeas altera a resposta ao DEET, também foram realizados testes no primeiro ciclo gonadotrófico (fêmeas com idade entre 5 e 7 dias), conforme recomendado pela OMS para testes de eficácia de repelentes. Os testes de avaliação do impacto da infecção foram feitos com fêmeas mais velhas (14 a 17 dias de idade), pois essas precisaram passar pelo primeiro repasto sanguíneo para adquirir a infecção. Os resultados revelaram uma pequena redução na proteção contra as fêmeas de RecLab, do primeiro para o segundo ciclo gonadotrófico, na dose de 1%, mas esta não foi significativa.

Para aumentar a taxa de proteção, foi testada também a dose de 5% de DEET nos dois ciclos gonadotróficos. A proteção no primeiro ciclo gonadotrófico aumentou de  $80,5 \pm 4,4\%$ , com 1% DEET para  $86,1 \pm 3,9\%$ , com 5% DEET (Figura 27). Na dose de 5%, observou-se uma diminuição do primeiro para o segundo ciclo gonadotrófico, mas essa não foi significativa ( $n = 7$ ;  $P = 0,116$ , teste t bicaudal não pareado) (Figura 27).

Do mesmo modo, testou-se a resposta de repelência ao DEET a 5%, de fêmeas infectadas e não infectadas com ZIKV, no segundo ciclo gonadotrófico (14 a 17 dias de idade). Não foram observadas diferenças significativas na resposta de RecLab com DEET a 5%, entre mosquitos infectados por ZIKV e não infectados no segundo ciclo gonadotrófico (Figura 27).

**Figura 27** – Atividade de repelência provocada por DEET (-N,N-diethyl-3-methylbenzamide) a 5%, contra *Aedes aegypti*, colônia de laboratório – RecLab, no primeiro e segundo ciclos gonadotróficos e após infecção com vírus Zika (ZIKV)



Fonte: Leal et al. (2017).

## 9 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a exposição ou infecção pelos vírus Zika (ZIKV) ou chikungunya (CHIKV), em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, alteram o *fitness* das três colônias avaliadas (RecLab, AeCamp e CqSLab), sobretudo a fertilidade e fecundidade, o que implica a redução no número de descendentes para as gerações subsequentes. A capacidade reprodutiva, sobrevivência e longevidade são aspectos biológicos diretamente relacionados à capacidade vetorial, e quaisquer alterações nesses parâmetros poderão impactar diretamente na dinâmica de transmissão de patógenos. Porém, é preciso ter cautela ao se avaliar isoladamente qualquer aspecto da capacidade vetorial, considerando que essa propriedade do vetor é multifatorial, especialmente em situações de campo (MAYTON et al., 2019).

Estudos demonstram um custo biológico da infecção pelos diversos arbovírus e apresentam diferentes resultados, os quais parecem estar estreitamente relacionados com a espécie e linhagem dos vetores e arbovírus investigados (PADILHA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2018; STYER; MEOLA; KRAMER, 2007; SYLVESTRE; GANDINI; MACIEL-DE-FREITAS, 2013).

Neste estudo, as alimentações sanguíneas para exposição das fêmeas aos vírus foram realizadas em alimentadores artificiais. Entretanto, sugere-se que os resultados sobre o custo biológico da infecção não tenham sido influenciados por essa condição. Apesar do processo adaptativo necessário para a realização dos experimentos, as colônias estudadas mostraram capacidade de adaptação à alimentação artificial em experimentos desenvolvidos em laboratório, sugerindo não haver comprometimento de seu desempenho biológico pela alimentação artificial (ROSS; LAU; HOFFMANN, 2019).

Por outro lado, é possível que, neste estudo, a ingestão do sangue misturado com células infectadas e não infectadas, na proporção de 1:1, oferecida às fêmeas na primeira alimentação sanguínea, pode ter reduzido a produção de ovos nos grupos expostos e não expostos aos vírus aqui estudados independentemente da infecção.

O grupo de fêmeas que foram expostas ao ZIKV mas que não se infectaram foi incluído neste estudo, considerando-se relatos de estudos anteriores, os quais encontraram resultados diferentes em parâmetros da capacidade reprodutiva e sobrevivência entre fêmeas não expostas (controle); expostas que não se infectaram e expostas que desenvolveram a infecção (CIOTA et al., 2013; STYER, MEOLA; KRAMER, 2007). Aqui, verificou-se que a exposição ao ZIKV reduziu a sobrevivência da colônia de laboratório (RecLab), mesmo entre as

fêmeas expostas, mas que não foram infectadas. Entretanto, a longevidade não foi alterada, uma vez que não houve diferença significativa no tempo médio de vida entre os três grupos avaliados (C, E e EI). Isso teoricamente não impactaria na sua capacidade de transmissão, considerando-se o curto período de incubação extrínseco do ZIKV, sua alta competência vetorial (GUEDES et al., 2017) e antropofilia da espécie (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Por outro lado, a colônia de campo, AeCamp, não teve sua sobrevida e longevidade afetadas pela infecção ou exposição ao ZIKV. Esta, por sua vez, teve contato, durante a recente epidemia de ZIKV em Pernambuco, com a cepa utilizada neste estudo, o que pode ter levado a uma rápida adaptação, proporcionando vantagens à infecção. Estudos prévios relatam custo quanto à sobrevida (SILVEIRA et al., 2018) e longevidade de populações de campo após infecção com ZIKV (PETERSEN et al., 2018). Entretanto, deve-se considerar a linhagem utilizada para infecção em laboratório, uma vez que, além do incremento da diversidade genética do ZIKV na América Latina (SHI et al., 2016), o contato prévio patógeno-vetor, em campo, leva a interações complexas e adaptativas. Um mosquito infectado tem um padrão específico de resposta imune e de transcrição, e essa resposta pode impactar na sua capacidade de transmitir um patógeno, afetando aspectos de seu desempenho (KRAMER; CIOTA, 2015).

Um desses estudos, por exemplo, utilizou a cepa ZIKV BRPE243/2015, obtida de sangue de pacientes de Pernambuco, durante a epidemia de Zika em 2015. Porém, os mosquitos foram coletados no bairro da Urca, Rio de Janeiro, os quais possivelmente não tiveram contato com a cepa de Pernambuco (PETERSEN et al., 2018). Além disso, segundo Silveira et al. (2018), os custos da infecção, assim como a competência vetorial, podem variar até entre populações geograficamente próximas, sobretudo em *Ae. aegypti*, pelo alto dinamismo de sua suscetibilidade a patógenos em função de fatores genéticos e ambientais.

Na colônia de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório, CqSLab, a curva de sobrevivência não foi alterada pela exposição ou infecção pelo ZIKV. Styer, Meola e Kramer (2007) demonstraram não haver diferença significativa na sobrevida de *Cx. tarsalis*, utilizando uma colônia de laboratório, após infecção com vírus do Oeste do Nilo (WNV), entre as fêmeas expostas não infectadas, infectadas e as não expostas. Por outro lado, a infecção de indivíduos de *Cx. tarsalis* com vírus da encefalite equina ocidental – *Western equine encephalitis virus* (WEEV) alterou a expectativa de vida das fêmeas.

Foram utilizadas duas doses do WEEV em experimentos de infecção artificial oral ( $10^6$  e  $10^4$  PFU/mL) e o impacto na sobrevivência ocorreu nas duas doses testadas, com alguma diferença detectada entre os dias 17 e 40, quando as fêmeas infectadas com a dose

mais alta morreram mais. Os mesmos autores relatam ainda que os títulos nos corpos das fêmeas aumentaram na fase inicial de observação, por conta da replicação durante a infecção. Porém, no período de maior mortalidade, esses títulos estiveram constantes, reduzindo à medida que as fêmeas mais velhas morriam (MAHMOOD et al., 2004). Neste estudo, com *Cx. quinquefasciatus* expostos à infecção com ZIKV, utilizou-se a dose de  $10^6$  PFU/mL e não foram detectadas alterações na sobrevivência e no tempo médio de vida das fêmeas entre os três grupos avaliados.

Com relação a este e outros diferentes resultados encontrados nos estudos que avaliam os custos biológicos da exposição a arbovírus sobre os mosquitos vetores, Ciota et al. (2013) sugerem que as interações específicas modulam o processo adaptativo no hospedeiro invertebrado e no patógeno. Os mesmos autores demonstraram que a virulência de uma cepa de WNV, já adaptada à colônia de *Cx. pipiens* utilizada no estudo, resultou em redução na sobrevivência das fêmeas expostas à infecção, mesmo entre aquelas que não se infectaram, o que não ocorreu quando se utilizou a cepa selvagem do mesmo vírus, que nunca havia entrado em contato com a colônia estudada.

É possível que resistência à infecção não seja unicamente o fator determinante do custo biológico sofrido pelas fêmeas expostas, mas, sim, o impacto da especificidade da cepa, resultante de constante exposição em estudos de evolução experimental. Essa hipótese poderia explicar os resultados aqui encontrados com relação à sobrevivência de CqSLab, mas contradiz os encontrados aqui e em outros estudos para colônias de *Ae. aegypti* de campo e de laboratório, com relação aos custos da exposição sobre a curva de sobrevivência (CIOTA et al., 2013), já discutidos no parágrafo anterior.

De modo geral, a fecundidade e fertilidade de RecLab não foram afetadas pela infecção com o ZIKV, embora, no segundo ciclo gonadotrófico, a exposição ao vírus tenha causado efeito negativo na produção de ovos quando se comparou com as fêmeas que foram infectadas. Mesmo que essa diferença não tenha aparecido com relação ao grupo controle, sugere-se que pode haver uma tendência a alteração no *fitness* dessa colônia, considerando-se que a curva de sobrevivência também foi significativamente alterada entre as fêmeas expostas não infectadas. Fêmeas com idade de 7 a 14 dias de uma colônia de *Ae. aegypti* de laboratório, oriunda da Polinésia Francesa, também não tiveram sua fecundidade e fertilidade alteradas pela infecção com ZIKV (RESCK et al., 2020).

Semelhantemente ao encontrado por Padilha et al. (2018), em experimento com ZIKV, na colônia AeCamp, a fecundidade total não sofreu efeito negativo pela infecção, independentemente do ciclo gonadotrófico. Ao contrário, neste estudo, a exposição ao ZIKV

(grupo E), mas não a infecção (grupo EI), favoreceu a produção de ovos nos segundo e terceiro ciclos, o que mostra mais uma vez uma tendência à alteração do *fitness* dessa espécie pela exposição ao ZIKV, mesmo sem o estabelecimento da infecção. Apesar dos ovários de mosquitos serem atingidos já no segundo dia após a infecção (LI et al., 2017), o ZIKV não reduziu a fecundidade de *Ae. aegypti*, como encontrado também por Silveira et al. (2018) e Resck et al. (2020).

Diferentemente, uma população de campo do Rio de Janeiro apresentou custo biológico na produção total de ovos, embora um dos grupos infectados tenha mostrado um incremento nesse parâmetro, entre o primeiro e terceiro ciclos, com relação ao grupo não infectado (PETERSEN et al., 2018). Nesse sentido, sugere-se que, como relatado para o vírus do Oeste do Nilo (ZINK et al., 2015), o ZIKV pode associar-se à regulação positiva de vias imunes, como RNA de interferência (RNAi), obtendo vantagens pela interação vetor-parasito. Segundo os mesmos autores, é possível também que a interação de bactérias com vírus tenha influência sobre aspectos importantes do desempenho biológico do vetor. Em *Cx. pipiens*, após exposição e/ou infecção com o Vírus do Oeste do Nilo, esses pesquisadores encontraram muitos gêneros de bactérias em maior quantidade nos grupos expostos e/ou infectados em relação aos não expostos ao vírus. Entre essas, as do gênero *Serratia* estavam em grandes proporções, o que sugere papel importante desses microrganismos na microbiota de mosquitos. A espécie *S. odorífera*, por exemplo, aumentou a suscetibilidade de *Ae. aegypti* para CHIKV em ensaios de coinfeção, como resultado da interação da proteína P40 com a porina de *S. odorífera* na membrana do intestino médio, o que provocou supressão da resposta imune de *Ae. aegypti* (APTE-DESHPANDE et al., 2014).

A fertilidade de AeCamp foi significativamente alterada pela exposição e pela infecção com o ZIKV no primeiro ciclo gonadotrófico. No segundo ciclo, as fêmeas infectadas também apresentaram redução no percentual de ovos postos, o que não ocorreu com aquelas que foram expostas, mas não se infectaram. Sugere-se que o custo pelo estabelecimento da infecção entre as fêmeas dessa colônia foi direcionado à viabilidade dos ovos, mas não à sua produção. Diferentemente, Resck et al. (2020) não observaram impacto da infecção com ZIKV sobre a fertilidade de fêmeas de uma colônia de *Ae. aegypti* de laboratório.

Nesse caso, convém ressaltar o contraditório demonstrado por Ciota et al. (2013), que afirmam ser o processo adaptativo o responsável pelo aumento da virulência, que retrata alta replicação viral, no caso do sucesso da infecção, e o desenvolvimento de uma resposta imune mais robusta, que possa ou não impedir a infecção, causando custos ao *fitness* do hospedeiro

invertebrado. Os resultados aqui encontrados para colônia de campo corroboram a hipótese de Ciota et al. (2013) no sentido de que a colônia AeCamp teve contato com a cepa utilizada nesses experimentos durante a epidemia entre 2015 e 2026, tendo assim iniciado esse processo adaptativo que leva à alta virulência e à consequente resposta imune que leva a algum tipo de custo biológico.

Em CqSLab, tanto a fecundidade como a fertilidade foram alteradas pela exposição ao ZIKV, mas não pela infecção. As fêmeas, expostas ao vírus, que não desenvolveram infecção, apresentaram redução no número de ovos postos e no percentual de eclosão em relação às não expostas. Styer, Meola e Kramer (2007) demonstraram que a fecundidade e fertilidade de *Cx. tarsalis* infectados pelo vírus do Oeste do Nilo (WNV) foram significativamente menores no grupo infectado, com relação aos mosquitos não expostos (grupo controle) e expostos que não foram infectados. Curiosamente, os mesmos autores destacaram que as fêmeas expostas ao WNV, mas não se infectaram, apresentaram maior fertilidade (65,8%) com relação aos grupos controle (55,6%) e infectado (42,5%). *Cx. pipiens*, uma colônia de laboratório pré-selecionada por exposições contínuas a uma linhagem de WNV, teve sua fecundidade alterada pela exposição e infecção em experimento com a mesma linhagem do vírus.

Avaliando o custo da infecção pelo verme filarial *Wuchereria bancrofti*, pesquisadores encontraram que fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* infectadas, em baixos níveis de parasitemia sanguínea, apresentaram incremento na fecundidade, enquanto nos níveis mais altos, houve redução significativa nesse parâmetro da capacidade reprodutiva (LIMA et al., 2003). Aqui, as alterações detectadas pela exposição ou infecção não estão sendo associadas à carga viral durante a exposição, pois neste estudo apenas uma dose foi testada.

Porém, os resultados aqui apresentados sugerem relação positiva entre a carga viral de ZIKV, detectada entre as fêmeas de AeCamp após a morte e a curva de sobrevivência. Com relação ao tempo médio de vida, essa relação positiva ocorreu nas duas colônias de *Ae. aegypti*; ou seja, aquelas que apresentaram maior carga viral de ZIKV, em análise categórica do número de cópias de RNA, tiveram menor risco de morte, assim como maior tempo médio de vida, demonstrando sucesso da interação vetor parasito, com a replicação viral ao longo do tempo.

Como na análise de correlação essa diferença não foi significativa, há de se considerar o número limitado de fêmeas que chegaram até o fim dos experimentos, o que dificultou as análises estatísticas. Sendo assim, são necessários novos experimentos para melhor investigação desse aspecto. Styer, Meola e Kramer (2007) encontraram associação positiva entre carga viral nas patas e fecundidade de fêmeas de *Cx. tarsalis* infectadas com vírus do

Oeste do Nilo. É provável que os mosquitos que apresentem resposta imune mais eficiente apresentem títulos menores do vírus, como também sofram um custo biológico decorrente da ativação da maquinaria imunológica (AHMED et al., 2002).

Com relação ao CHIKV, a curva de sobrevivência da colônia de laboratório foi alterada pela infecção. Essa diferença entre os grupos C e EI só apareceu nos 20 primeiros dias de observação, quando as fêmeas estavam entre 7 e 30 dias de emergência. Sylvestre, Gandini e Maciel-de-Freitas (2013) afirmam que o *Ae. aegypti* tem sobrevida maior que o período de incubação extrínseco do DENV, e o custo biológico da infecção por esse vírus sobre a sobrevivência esteve associado ao envelhecimento das fêmeas, o que não impactaria na sua capacidade vetorial. Nesse caso, o impacto da infecção pelo CHIKV pode não estar associado ao envelhecimento das fêmeas de RecLab, o que indica a necessidade de aprofundamento nas análises de sobrevida. Sirisena, Kumar e Sunil (2018) relataram haver redução na taxa de sobrevivência e fecundidade, conferidas pelo processo de adaptação do *Ae. aegypti* à infecção viral pelo CHIKV. Por meio da análise da expressão de transcritos envolvidos na via de postura de ovos, os mesmos pesquisadores revelaram haver regulação negativa desses genes nas fêmeas infectadas, com relação àquelas não infectadas (SIRISENA; KUMAR; SUNIL, 2018).

Em AeCamp, não houve efeito da infecção pelo CHIKV sobre a sobrevida das fêmeas. Esses resultados reforçam a hipótese colocada para ZIKV de adaptação dessa colônia à linhagem estudada (CHIKV PE480/2016), considerando ser a mesma que causou o surto entre 2014 e 2016 em Pernambuco. Resultados semelhantes foram encontrados com relação à longevidade de *Ae. aegypti* de *Palm Beach County*, Flórida, utilizando-se a linhagem CHIK LR2006-OPY1. O mesmo estudo afirma que a adaptação de CHIKV ao *Ae. albopictus* gerou um custo biológico sobre a longevidade que foi significativamente menor entre as fêmeas infectadas. Os autores sugerem que pode haver restrições fisiológicas na evolução da infecção do CHIKV sobre essa espécie (REISKIND; WESTBROOK; LOUNIBOS, 2010).

Adicionalmente, a longevidade e o título corporal de fêmeas de *Ae. albopictus* infectadas com CHIKV foram inversamente correlacionados (REISKIND; WESTBROOK; LOUNIBOS, 2010). Esses resultados corroboram os encontrados neste estudo com relação às fêmeas de *Ae. aegypti* da colônia AeCamp infectadas com CHIKV, em que os tempos médios de vida foram significativamente menores quando a carga viral detectada foi maior (28,45 dias para valores de NC menores ou iguais à  $5,6E+11$  e 12 dias para valores maiores). Semelhantemente ao observado nas fêmeas infectadas com ZIKV, não houve correlação entre

carga viral e tempo de vida das fêmeas, sendo necessária a realização de novos experimentos para melhor avaliação.

Parâmetros da capacidade reprodutiva, sobretudo a fertilidade, apresentaram um custo biológico pela infecção com CHIKV, tanto na colônia de *Ae. aegypti* de campo como na de laboratório. Resultados semelhantes foram encontrados por Sirisena, Kumar e Sunil (2018) com relação à fecundidade. Resck et al. (2020) relataram que o percentual de eclosão de larvas de *Ae. aegypti* é alterado pela infecção com CHIKV independentemente da idade das fêmeas. Os autores avaliaram fêmeas com 7 e 14 dias de emergência. Estudo prévio com esse vírus, em *Ae. albopictus*, utilizando linhagens de mosquito e vírus da mesma área, na Itália, encontrou redução na taxa de eclosão das larvas, mas não na fecundidade das fêmeas infectadas. Esse efeito sobre a fertilidade foi descrito para outros vírus (PETERSEN et al., 2018; STYER; MEOLA; KRAMER, 2007) e sugere que CHIKV pode afetar o desenvolvimento embrionário e a sobrevivência do embrião (BELLINI et al., 2012). Por outro lado, em estudo com vírus dengue (DENV), não foi detectada alteração na capacidade reprodutiva de *Ae. aegypti* embora a infecção dos ovários das fêmeas tenha apresentado títulos similares a outros órgãos (CARVALHO-LEANDRO et al., 2012). Neste estudo, efeito relevante sobre a fertilidade foi encontrado para as duas colônias infectadas com CHIKV, sugerindo ser esse um ponto crítico no mecanismo de interação vetor-parasito, que precisa ser mais bem investigado.

Estudo demonstra impacto negativo da infecção por DENV-2 ter sido detectado em *Ae. aegypti*, com relação ao sucesso de repasto sanguíneo (SYLVESTRE; GANDINI; MACIEL-DE-FREITAS, 2013). Os autores avaliaram o tempo gasto pelas fêmeas para completar o ingurgitamento e verificaram que as infectadas gastaram mais tempo em relação ao grupo controle.

Neste trabalho, os resultados obtidos para ZIKV e CHIKV, com relação à atividade de alimentação sanguínea pós-infecção, em alimentador artificial, sugerem não haver efeito da exposição ou infecção sobre esse parâmetro, nas duas colônias de *Ae. aegypti* (RecLab e AeCamp) e em *Cx. quinquefasciatus* (colônia CqSLab), considerando-se o critério avaliado (percentual de fêmeas que completaram o repasto sanguíneo em até 30 minutos de exposição ao alimentador). Styer, Meola e Kramer (2007) relataram que um maior percentual de fêmeas de *Cx. tarsalis* infectados pelo WNV realizou repasto sanguíneo em alimentações artificiais subsequentes à infecção, comparado com as fêmeas não expostas (grupo controle) e as expostas que não se infectaram. Os mesmos autores destacaram não haver diferença

significativa no status de ingurgitamento (quantidade de sangue ingerida) entre os três grupos avaliados.

Como relatado para o vírus do Oeste do Nilo (STYER; MEOLA; KRAMER, 2007), é possível que o custo de infecção por ZIKV e CHIKV, sobre a capacidade reprodutiva, isoladamente, tenha pouca relevância, considerando-se que outros aspectos não foram afetados pela exposição ou infecção aos vírus, com exceção para a sobrevivência da colônia de *Ae. aegypti* de laboratório nas condições experimentais deste estudo. A sobrevivência das fêmeas infectadas e as taxas de repasto sanguíneo teriam maior efeito sobre o número de novas infecções causadas pelos mosquitos (DYE, 1992).

Na colônia RecLab, as fêmeas infectadas com ZIKV, que realizaram um segundo repasto sanguíneo no 7º dia pós-exposição (DPE), apresentaram número de cópias de RNA significativamente maior, com relação àquelas que não fizeram essa segunda alimentação sanguínea. Esses resultados corroboram os encontrados por Cui et al. (2019), os quais relataram aumento de três a quatro vezes na carga viral entre fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV 4, após alimentação sanguínea no 5º dia pós-infecção (CUI et al., 2019). Contudo, considerando o número limitado de fêmeas infectadas e o necessário para melhor avaliação estatística dessa relação, envolvendo outras variáveis, sugere-se a realização de novos experimentos que possam confirmar esse resultado.

De modo geral, os resultados deste estudo indicam que a exposição e/ou infecção por ZIKV impactam diferentemente sobre a capacidade reprodutiva quando se compara *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Neste último, apenas a exposição ao ZIKV, mas não a infecção, reduziu a fecundidade e fertilidade das fêmeas. Em *Ae. aegypti*, a infecção pelo ZIKV reduziu a fertilidade da colônia de campo, AeCamp, mas não a sua fecundidade. Adicionalmente, o impacto da infecção pelo CHIKV em *Ae. aegypti* foi maior com relação ao custo biológico das fêmeas das mesmas colônias expostas ao ZIKV, considerando-se que o primeiro alterou negativamente os dois parâmetros da capacidade reprodutiva de AeCamp, como também a fecundidade de RecLab.

Outro aspecto importante do comportamento de fêmeas de mosquitos infectadas com patógenos é sua suscetibilidade a repelentes tópicos, uma vez que essa é uma medida de proteção amplamente utilizada e recomendada pela OMS, sobretudo em situações de epidemia. Porém, são poucos os estudos desenvolvidos com a perspectiva de avaliar o comportamento de fêmeas infectadas com arbovírus em relação à resposta a repelentes. De modo geral, o DEET é o mais estudado, com a espécie *Ae. aegypti*. Esses dados foram levantados em uma revisão sistemática, a qual demonstrou também que os estudos realizados

apontam uma redução na eficácia de repelentes em fêmeas infectadas por arbovírus (LAJEUNESSE et al., 2020).

Neste estudo verificou-se redução da suscetibilidade de fêmeas da colônia RecLab, infectadas com o ZIKV, aos repelentes DEET e Picaridina, na dose de 1%. Porém, com o DEET na dose de 5%, essa diferença não foi observada. Resultados semelhantes foram encontrados por Leal et al. (2017) em estudo com uma colônia de campo oriunda de Fernando de Noronha, Pernambuco, utilizando-se os mesmos repelentes na dose de 1%. Em estudo com os quatro sorotipos DENV, não foram encontradas diferenças significativas nas respostas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* infectados ao DEET na dose de 5% (FRANCES; SITHIPRASASNA; LINTHICUM, 2011). A infecção pelo Sindbis vírus resultou em maior habilidade para alimentação sanguínea em *Ae. aegypti*, as quais utilizaram menos tempo para completar o ingurgitamento, em invólucro contendo DEET, com relação àquelas não infectadas. A disseminação do SINV também favoreceu a habilidade para alimentação, resultando em um aumento de 12% e 10% na quantidade de sangue ingerida, em relação aos mosquitos não expostos ao vírus e àqueles sem uma disseminação positiva do patógeno respectivamente (QUALLS et al., 2012).

O risco de transmissão de patógenos ocorre com fêmeas mais velhas, a partir do segundo ciclo gonadotrófico, uma vez que elas precisam de, pelo menos, duas alimentações sanguíneas para transmiti-lo. Entretanto, os testes de eficácia desses produtos são feitos em fêmeas nulíparas, o que pode comprometer a indicação da eficácia por serem fêmeas jovens. Assim, neste estudo, ensaios de comportamento de repelência foram realizados durante o primeiro e o segundo ciclos gonadotróficos de fêmeas de RecLab, ambos sem a presença do vírus. Uma pequena redução na resposta de RecLab foi observada a 1% e 5% entre os dois ciclos, mas esta não foi estatisticamente significativa. Estudo anterior verificou maior taxa de ataque ao hospedeiro para fêmeas mais velhas de *Ae. albopictus*, com 20 e 15 dias de emergência, com relação às mais jovens, de 10 e 5 dias (XUE et al., 1995). Diferentemente, outro estudo demonstrou maior eficácia do DEET em fêmeas mais velhas das espécies *An. gambiae*, 18 dias de idade, e *Ae. albopictus*, 20 dias (MULATIER et al., 2018).

Neste estudo, sugere-se que a infecção pelo ZIKV, isoladamente, não altera significativamente a suscetibilidade de *Ae. aegypti*, colônia RecLab, ao repelente DEET. A sensibilidade olfatória dos mosquitos mais velhos pode ser um pouco menor, mas essa diminuição pode ser compensada pela aplicação de doses mais altas (LEAL et al., 2017).

Diante do exposto, os resultados deste trabalho podem desencadear o desenvolvimento de futuras investigações na perspectiva de elucidar as muitas lacunas ainda existentes sobre os

vários aspectos da capacidade vetorial de mosquitos. Esses poderão contribuir, sobretudo, para a definição e implementação de métodos mais eficazes de controle populacional de vetores, de modo a potencializar o custo biológico causado pela exposição ao patógeno, aqui especificamente caracterizado pela fecundidade, fertilidade e resposta ao DEET, repelente mais utilizado mundialmente.

## 10 CONCLUSÃO

- a) Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) infectam e disseminam, em altas taxas, em fêmeas de *Ae. aegypti*, colônias RecLab e AeCamp; porém, em *Cx. quinquefasciatus*, colônia CqSLab, expostas ao ZIKV, essas taxas são mais baixas;
- b) A exposição e/ou infecção pelos ZIKV ou CHIKV aumentam o risco de morte e reduzem a longevidade de RecLab, mas não alteram esses parâmetros em AeCamp;
- c) Em *Ae. aegypti*, a fertilidade é reduzida pela infecção com os ZIKV ou CHIKV, mas o CHIKV reduz também a fecundidade na colônia AeCamp;
- d) A sobrevivência e longevidade de fêmeas de CqSLab não sofrem impacto pela exposição e/ou infecção pelo ZIKV. Entretanto, a fecundidade e fertilidade são reduzidas pela exposição ao vírus, mas não pela infecção;
- e) A exposição e/ou infecção pelos ZIKV e CHIKV, em RecLab e AeCamp, assim como pelo ZIKV em CqSLab, não alteram a atividade de repasto sanguíneo pós-exposição aos vírus, considerando-se o parâmetro avaliado;
- f) De modo geral, a exposição e/ou infecção por ZIKV impactam diferentemente sobre a fecundidade e fertilidade, quando se comparam *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. O impacto do CHIKV em *Ae. aegypti* é maior com relação ao impacto causado pelo ZIKV, considerando-se os mesmos parâmetros;
- g) A exposição ao ZIKV reduz a resposta ao repelente DEET em RecLab, na dose de 1%, mas não à Picaridina. Essa redução pode ser compensada pelo uso de doses mais altas.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. *et al.* Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of chikungunya virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, e2990, Jul. 2014.

AGHA, S. B. *et al.* Vector competence of populations of *Aedes aegypti* from three distinct cities in Kenya for chikungunya virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 8, e0005860, Aug. 2017.

AHMED, A. M. *et al.* The costs of mounting an immune response are reflected in the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Oikos**, Copenhagen, v. 97, n. 3, p. 371–377, 2002.

ALIOTA, M. T. *et al.* The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of chikungunya virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, e0004677, Apr. 2016.

ALMEIDA, A. P. G. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal: Desafios para o século XXI. **Acta medica Portuguesa**, Lisboa, v.24, n.6, p. 961-974, 2011.

ALMEIDA, P. R. *et al.* Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. **bioRxiv**, Cold Spring Harbor, Nov. 2019. Preprint. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/828871v1.full.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2021.

AMRAOUI, F. *et al.* *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 21, n. 35, p. 30333, Sept. 2016.

AMRAOUI, F. *et al.* Potential of *Aedes albopictus* to cause the emergence of arboviruses in Morocco. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. 1-12, Feb. 2019.

ANDERSON, J. R.; RICO-HESSE, R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 75, n. 5, p. 886-892, 2006.

ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y. I. *et al.* *Aedes aegypti* molecular responses to Zika virus: modulation of infection by the toll and Jak/Stat immune pathways and virus host factors. **Frontiers in Microbiology**, Bethesda, Maryland, v. 23, n. 8, p. 1-12, Oct. 2017.

APTE-DESHPANDE, A. D. *et al.* *Serratia odorifera* mediated enhancement in susceptibility of *Aedes aegypti* for chikungunya virus. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 139, p. 762-768, 2014.

ARANKALLE, V. A. *et al.* Genetic divergence of chikungunya viruses in India, 1963-2006, with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n. 7, p. 1967-1976, Aug. 2007.

- ARUNACHALAN, N. *et al.* Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 127, p. 395-397, Apr. 2008.
- ASGARI, S. Role of microRNAs in arbovirus vector interactions. **Viruses**, Basel, v. 6, n. 9, p. 3514-3534, Sept. 2014.
- AUGUSTO, M. **Brasil**: em todo local que há mosquitos *Aedes*, existe o risco de contrair a febre amarela. Maceió: Blog Alagoas Real, 2017. Disponível em: <https://alagoasreal.blogspot.com/2017/01/brasil-entodo-lugar-onde-existe-vetor-aedes-risco-infeccao-virus-febre-amarela.html>. Acesso em: 26 mar. 2018.
- AYRES, C. F. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 3, p. 278-279, Mar. 2016.
- AYRES, C. F. J. *et al.* Response to: “lack of evidence for Zika virus transmission by *Culex* mosquitoes”. **Emerging Microbes & Infections**, Bern, v. 6, n. 10, e91, Oct. 2017.
- AYRES, C. F. J. *et al.* Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Parasites and Vectors**, New York, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2019.
- AZAR, S. R. *et al.* Naturally infected *Aedes aegypti* collected during a Zika virus outbreak have viral titres consistent with transmission. **Emerging Microbes and Infections**, Bern, v. 8, n. 1, p. 242-244, Feb. 2019.
- AZEVEDO, R. S. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 49, p. 1-6, set. 2015.
- BADOLO, A. *et al.* Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 330-334, Mar. 2004.
- BALM, M. N. *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, London, n. 84, n. 9, p. 1501-1505, Sept. 2012.
- BARATA, E. A. M. *et al.* População de *Aedes aegypti* (l.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil = *Aedes aegypti* (l.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 237-242, jun. 2001.
- BARBOSA, R. M. R.; REGIS, L. N. Monitoring temporal fluctuations of *Culex quinquefasciatus* using oviposition traps containing attractant and larvicide in an urban environment in Recife, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 451-455, jun. 2011.
- BARKER, J. S. F. Defining fitness in natural and domesticated populations. In: WERF, J. van der *et al.* (ed.). **Adaptation and fitness in animal populations**: evolutionary and breeding perspectives on genetic resource management. Heidelberg: Springer, 2009. p. 3-14.

BARRETT, A. D. T. Current status of Zika vaccine development: Zika vaccines advance into clinical evaluation /692/308/153 /631/326/590/1883 perspective. **NPJ Vaccines**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1-4, June 2018.

BARROWS, N. J. *et al.* A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 20, n. 2, p. 259-270, July 2016.

BELLINI, R. *et al.* Impact of chikungunya virus on *Aedes albopictus* females and possibility of vertical transmission using the actors of the 2007 outbreak in Italy. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, e28360, Feb. 2012.

BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 19, n. 13, p. 20751, Apr. 2014. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20751>. Acesso em: 26 jan. 2021.

BINGHAM, A. M. *et al.* Comparison of test results for Zika virus RNA in Urine, serum, and saliva specimens from persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 18, 475-478, May 2016.

BLAIR, C. D.; OLSON, K. E. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. **Viruses**, Basel, v. 7, n. 2, p. 820-843, Feb. 2015.

BOCCOLINI, D. *et al.* Experimental investigation of the susceptibility of Italian *Culex pipiens* mosquitoes to Zika virus infection. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 21, n. 35, 30328, Sept. 2016.

BRADY, O. J.; HAY, S. I. The first local cases of Zika virus in Europe. **The Lancet**, New York, v. 394, n. 10213, p. 1991-1992, Nov. 2019.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 113-118, jun. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica e eliminação da filariose linfática**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_filariose\\_linfatica.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_filariose_linfatica.pdf). Acesso em: 14 maio 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus***. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 46, n. 7, 2015.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 47, n. 25, p. 1-10, 2016a.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, Informe epidemiológico n. 25, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Resumo Executivo Saúde Brasil 2015/2016**: uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vírus Zika no Brasil**: a resposta do SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2017b. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus\\_zika\\_brasil\\_resposta\\_sus.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf). Acesso em: 14 maio 2018.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 48, n. 3, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, n. 2, 2018a.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, n. 47, 2018b.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, n. 15, 2018c.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, n. 6, 2018d.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 50, n. 4, 2019a.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 50, n. 13, 2019b.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 51, n. 2, 2020.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 52, n. 3, 2021a.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 52, n. 4, 2021b.

BROWN, J. E. *et al.* Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proceedings Biological Sciences**, London, v. 278, n. 1717, p. 2446-2454, July 2011.

CAMPOS, T. D. L. *et al.* Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the Mainland Americas through large-scale phylogenomics. **International Journal of Genomics**, New York, v. 2018, n. 3, 6941735, p. 1-9, Oct. 2018.

CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D. Emerging arboviruses in the Pacific. **The Lancet**, New York, v. 384, n. 9954, p. 1571-1572, Nov. 2014.

CARVALHO, M. S. *et al.* **Análise de sobrevivência: teoria e aplicações em saúde**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2011.

CARVALHO, D. O. *et al.* *Aedes aegypti* lines for combined sterile insect technique and incompatible insect technique applications: the importance of host genomic background. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Hoboken, v. 168, n. 6–7, p. 560-572, 2020.

CARVALHO, O. V. *et al.* The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptapurine riboside (6MMPr) effectively blocks Zika virus replication. **International Journal of Antimicrobial Agents**, New York, v. 50, n. 6, p. 718-725, Dec. 2017.

CARVALHO-LEANDRO, D. *et al.* Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. **Acta Tropica**, New York, v. 124, n. 2, p. 113-119, Nov. 2012.

CASTANHA, P. M. S. *et al.* Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 141, n. 5, p. 1080-1088, May 2013.

CHIN, W. X. *et al.* A single-dose live attenuated chimeric vaccine candidate against Zika virus. **Nature partner journals vaccines**, London, v. 6, n. 1, p. 20, 2021.

CHOUIN-CARNEIRO, T. *et al.* Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, e0004543, Mar. 2016.

CIOTA, A. T. *et al.* The evolution of virulence of West Nile virus in a mosquito vector: Implications for arbovirus adaptation and evolution. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 13, n. 71, Mar. 2013.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1.

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

CRESPO, M. M. *et al.* Amigos do bairro contra a dengue: a experiência do Distrito Sanitário III da Secretaria de Saúde do Recife na implantação de um projeto de participação popular em saúde: relato de experiência. **Revista de APS**, Juiz de Fora, v. 15, n. 4, p. 517-521, out. 2012.

CUI, Y. *et al.* Zika virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is facilitated by bloodmeal-mediated structural modification of the midgut basal lamina. **Viruses**, Basel, v. 11, nov. 2019.

DIAGNE, C. T. *et al.* Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 15, n. 1, p. 1-6, Dec. 2015.

DIALLO, D. *et al.* Vectors of chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 60, n. 2, p. 281-286, Feb. 1999.

DIALLO, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, Oct. 2014.

DÍAZ-QUÍÑONEZ, J. A. *et al.* Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. **Virus Genes**, New York, v. 52, n. 6, p. 855-857, Dec. 2016.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I): isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 509-520, Sept. 1952.

DODSON, B. L.; PUJHARI, S.; RASGON, J. L. Vector competence of selected North American Anopheles and *Culex* mosquitoes for Zika virus. **PeerJ**, New York, v. 6, e4324, Feb. 2018.

DONALD, C. L. *et al.* Full genome sequence and sRNA Interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-20, 2016.

DUFFY, M. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, June 2009.

DURRHEIM, D. N.; GOVERE, J. M. Malaria outbreak control in an African village by community application of “deet” mosquito repellent to ankles and feet. **Medical and Veterinary Entomology**, New York, v. 16, n. 1, p. 112-115, Mar. 2002.

DYE, C. Epidemiological significance of vector-parasite interactions. **Parasitology**, Cambridge, v. 101, n. 3, p. 409-415, Dec. 1990.

DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, n. p. 1–19, Dec. 1992.

ELIZONDO-QUIROGA, D. *et al.* Zika virus in salivary glands of five different species of wild-caught mosquitoes from Mexico. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1-7, Jan. 2018.

ELIZONDO-QUIROGA, D. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from the metropolitan area of Guadalajara, Jalisco, Mexico for Zika virus. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1-10, Nov. 2019.

ENFISSI, A. *et al.* Zika virus genome from the Americas. **The Lancet**, New York, v. 387, n. 10015, p. 227-228, Jan. 2016.

ENSERINK, M. Infectious diseases: massive outbreak draws fresh attention to little-known virus. **Science**, New York, v. 311, n. 5764, p. 1085a-1085a, Feb. 2006.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **The Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 83, n. 2, p. 213-219, Oct. 1979.

- FARAJOLLAHI, A. *et al.* “Bird biting” mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes. **Infection, Genetics and Evolution**, New York, v. 11, n. 7, p. 1577-1585, Oct. 2011.
- FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, New York, v. 352, n. 6.283, p. 345-349, Mar. 2016.
- FAYE, O. *et al.* One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, New York, v. 43, n. 1, p. 96-101, Sept., 2008.
- FAYE, O. *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 311, Oct. 2013.
- FAYE, O. *et al.* Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 36, Jan. 2014.
- FERNANDES, R. S. *et al.* *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro is not competent to transmit the local Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 9, e0004993, Sept. 2016.
- FERNANDES, R. S. *et al.* *Culex quinquefasciatus* from areas with the highest incidence of microcephaly associated with Zika virus infections in the northeast region of Brazil are refractory to the virus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 8, p. 577-579. Aug. 2017.
- FERNÁNDEZ-SALAS, I. *et al.* Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. **Antiviral Research**, New York, v. 124, p. 30-42, Oct. 2015.
- FERREIRA-DE-BRITO, A. *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 10, p. 655-658, out. 2016.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 224-229, mar./abr. 2007.
- FISCHER, C. *et al.* External quality assessment for Zika virus molecular diagnostic testing, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 24, n. 5, p. 888-892, May 2018.
- FONSECA, D. M. *et al.* Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 74, n. 2, p. 284-289, Mar. 2006.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia médica: parte geral, diptera, anophelini**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. v. 1.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: EdUSP, 2002. v. 2.

FORTUNA, C. *et al.* Vector competence of *Aedes albopictus* for the Indian Ocean lineage (IOL) chikungunya viruses of the 2007 and 2017 outbreaks in Italy: a comparison between strains with and without the E1: A226V mutation. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 23, n. 22, p. 1-5, May 2018.

FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 17, n. 5, p. 880-882, May 2011.

FRADIN, M. S. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 128, n. 11, p. 931-940, June 1998.

FRADIN, M. S.; DAY, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against Mosquito Bites. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 347, n. 1, p. 13-18, July 2002.  
Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/nejmoa011699>. Acesso em: 26 abr. 2018.

FRANCES, S. P.; SITHIPRASASNA, R.; LINTHICUM, K. J. Laboratory Evaluation of the Response of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* uninfected and infected with dengue virus to deet. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 334-336, Mar. 2011.  
Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/download/55714/PDF>. Acesso em: 26 abr. 2018.

FRANCO, O. **História da febre amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1969.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 1996.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Plano de intensificação das ações de controle da dengue**. Brasília: Funasa, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Dados e indicadores selecionados**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

GARDNER, L.; CHEN, N.; SARKAR, S. Global risk of Zika virus depends critically on vector status of *Aedes albopictus*. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 5, p. 522-523, May 2016.

GARDNER, L.; CHEN, N.; SARKAR, S. Vector status of *Aedes* species determines geographical risk of autochthonous Zika virus establishment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 3, e0005487, Mar. 2017.

GARRET-JONES, C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. **Bull World Health Organ**, Grimstad, v. 30, n. 2, p. 241-261, 1964.

GATHANY, J. **House mosquitoes**. Biogents, [20--.] Disponível em: <https://us.biogents.com/house-mosquitoes/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

- GAUDINSKI, M. R. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. **The Lancet**, New York, v. 391, n. 10120, p. 552-562, Feb. 2018.
- GLORIA-SORIA, A. *et al.* Vector competence of *Aedes albopictus* populations from the northeastern United States for Chikungunya, dengue, and Zika viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. 1123–1130, 2020.
- GOMARD, Y. *et al.* Contrasted transmission efficiency of Zika virus strains by mosquito species *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Reunion Island. **Parasites and Vectors**, New York, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2020.
- GOULD, E. A. *et al.* First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 16, n. 12, p. 1702-1704, 2010.
- GUEDES, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, Bern, v. 6, n. 8, e69, Aug. 2017.
- GUERBOIS, M. *et al.* Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 214, n. 9, p. 1349-1356, Nov. 2016.
- GUO, X.-X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, Bern, v. 5, n. 9, e102, Sept. 2016.
- HADDAD, N. *et al.* *Aedes albopictus* in Lebanon, a potential risk of arboviruses outbreak. **BMC Infectious Diseases**, New York, v. 12, n. 1, p. 300, Nov. 2012.
- HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: Geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 2, e1477, Feb. 2012.
- HALSTEAD, S. B. Reappearance of chikungunya, formerly called Dengue, in the Americas. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 21, n. 4, p. 557-561, Apr. 2015.
- HARBACH, R. E. *Culex pipiens*: Species versus species complex: taxonomic history and perspective. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Washington, v. 28, n. 4 (suppl.), p. 10-23, Dec. 2012.
- HARDY, J. L. *et al.* Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annual Review of Entomology**, Annapolis, v. 28, n. 1, p. 229-262, Jan. 1983.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging infectious diseases**, New York, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, Sept. 2009.
- HEITMANN, A. *et al.* Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 22, n. 2, Jan. 2017.

HERY, L. *et al.* Transmission potential of African , Asian and American Zika virus strains by *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from Guadeloupe, French West Indies. **Emerging microbes & infections**, Bern, v. 8, p. 1, p. 699-706, 2019.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 15, n. 4, p. 231-240, Apr. 2015.

HONÓRIO, N. A. *et al.* Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 906-908, maio 2015.  
Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v31n5/0102-311X-csp-31-5-0906.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2019.

HONÓRIO, N. A. *et al.* Experimental vertical transmission of chikungunya virus by brazilian and florida *Aedes albopictus* populations. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 4, pii: E353, Apr. 2019.

HUANG, Y.-J. S. *et al.* *Culex* species mosquitoes and Zika virus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 16, n. 10, p. 673-676, Oct. 2016.

JUPP, P. G. *et al.* Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 75, n. 1, p. 15-19, Jan. 1981.

KASPRZYKOWSKI, J. I. *et al.* A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 96, p. 579–581, 2020.

KENNEY, J. L. *et al.* Transmission Incompetence of *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens pipiens* from North America for Zika virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 96, n. 5, p. 1235-1240, May 2017.

KHAN, A. H. *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, Londres, v. 83, n. 2002, 30753084, Dec. 2002.

KLOWDEN, M. J.; BRIEGEL, H. Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 618-622, July 1994.

KLUN, J. A. *et al.* Synthesis and repellent efficacy of a new chiral piperidine analog: comparison with Deet and Bayrepel activity in human-volunteer laboratory assays against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 293-299, May 2003.

KRAEMER, M. U. G. *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 854–863, May 2019.

KRAMER, L. D.; CIOTA, A. T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. **Current Opinion in Virology**, New York, v. 15, p. 112-118, Dec. 2015.

LAJEUNESSE, M. J. *et al.* Infected mosquitoes have altered behavior to repellents: a

systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 57, n. 2, p. 542–550, 2020.

LAMBRECHTS, L. *et al.* Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. **BMC Evolutionary Biology**, Bern, v. 9, n. 1, p. 1-11, July 2009.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 13, n. 5, p. 764-767, May 2007.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, Aug. 2008.

LAPORTA, G. Z.; URBINATTI, P. R.; NATAL, D. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 125-127, mar. 2006.

LAROCCA, R. A. *et al.* Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, London, v. 536, n. 7617, p. 474-478, Jun. 2016.

LAU, M. J.; ROSS, P. A.; HOFFMANN, A. A. Infertility and fecundity loss of Wolbachia-infected *Aedes aegypti* hatched from quiescent eggs is expected to alter invasion dynamics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 15, n. 2, p. 1–16, fev. 2021.

LEAL, W. S. *et al.* Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents? **Scientific Reports**, London, n. 7, p. 1-9, Feb. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep42826.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2020.

LEDERMANN, J. P. *et al.* *Aedes hensilli* as a potential vector of chikungunya and Zika viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. 1-9, Oct. 2014.

LEDNICKY, J. *et al.* Zika virus outbreak in Haiti in 2014: molecular and clinical data. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, e0004687, Apr. 2016.

LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, New York, v. 383, n. 9916, p. 514, Feb. 2014.

LEQUIME, S.; PAUL, R. E.; LAMBRECHTS, L. Determinants of *Arbovirus* vertical transmission in mosquitoes. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. 1-14, May 2016.

LEVI, L. I. *et al.* Defective viral genomes from chikungunya virus are broad-spectrum antivirals and prevent virus dissemination in mosquitoes. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 17, n. 2, p. e1009110, 2021.

LI, C.-X. *et al.* Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. **Emerging Microbes and Infections**, Bern, v. 6, n. 4, Apr. 2017.

- LI MI *et al.* Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 8, e1792, Aug. 2012.
- LIMA, C. A. *et al.* Reproductive aspects of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 217-222, Mar. 2003.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 50, n. 36, p. 1-7, jun. 2016.
- LIU, J. *et al.* Role of mutational reversions and fitness restoration in Zika virus spread to the Americas. **Nature Communications**, London, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021.
- LIU, Y. *et al.* The expression profile of *Aedes albopictus* miRNAs is altered by dengue virus serotype-2 infection. **Cell and Bioscience**, Houston, v. 5, n. 16, p. 1-11, Apr. 2015.
- LIU, Y. *et al.* Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature**, London, v. 545, n. 7655, p. 482-486, May 2017.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014.
- LOUNIBOS, L. P. Habitat segregation among African tree hole mosquitoes. **Ecological Entomology**, New York, v. 6, n. 2, p. 129-154, May 1981.
- LOUNIBOS, L. P.; KRAMER, L. D. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, n. 214 (suppl. 5): S453-S458, Dec. 2016.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo Lourenço *et al.*, *Culex quinquefasciatus* mosquitoes do not support replication of Zika virus. **Journal of General Virology**, London, n. 99, p. 258-264, 2018.
- LUPI, E.; HATZ, C.; SCHLAGENHAUF, P. The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp.: a literature review. **Travel Medicine and Infectious Diseases**, New York, v. 11, n. 6, p. 374-411, Nov./Dec. 2013.
- LUZ, P. M. *et al.* Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 871-878, out. 2003.
- MACDONALD, G. Epidemiologic models in studies of vector-bourne diseases. **Public Health Reports**, Washington, D. C., v. 76, n. 9, p. 753-764, Sept. 1961.
- MACDONALD, G. **The epidemiology and control of malaria**. New York: Oxford University Press, 1957. 201 p.
- MACIEL-DE-FREITAS, R. A review on the ecological determinants of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vectorial capacity. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 726-736, Sept. 2010.

- MACIEL-DE-FREITAS, R. *et al.* Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 76, n. 4, p. 659-665, Apr. 2007.
- MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 20, n. 1, p. 91-98, Jan./Fev. 2016.
- MAHMOOD, F. *et al.* Western equine encephalomyelitis virus infection affects the life table characteristics of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, n. 41, 982-986, 2004.
- MAIN, B. J. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex tarsalis*, and *Culex quinquefasciatus* from California for Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. 1-13, 2018.
- MANORE, C. A. *et al.* Defining the risk of Zika and chikungunya virus transmission in human population centers of the Eastern United States. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1-19, Jan. 2017.
- MATTINGLY, P. F. The urban mosquito hazard today. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 29, p. 135-139, 1963.
- MAVALE, M. *et al.* Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes, Diptera: Culicidae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 83, n. 6, p. 1242-1244, Dec. 2010.
- MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and Zika fevers. **Acta Tropica**, New York, v. 166, p. 155-163, Feb. 2017.
- MAYTON, E. H. *et al.* Vector competence for Zika virus is not affected by mosquito age but vectorial capacity of *Ae. aegypti* is multifactorial and age-dependent. **bioRxiv**, Cold Spring Harbor, Feb. 2019. Preprint. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/03/06/552125.full.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2019.
- MBUBA, E. *et al.* Single blinded semi-field evaluation of MAÏA® topical repellent ointment compared to unformulated 20% DEET against *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* and *Aedes aegypti* in Tanzania. **Malaria Journal**, London, v. 20, n. 1, p. 12, 2021.
- MCCLELLAND, G. A. H. A worldwide survey of variation in scale pattern of the abdominal tergum of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 126, n. 2, p. 239-259, Nov. 1974.
- MCCRACKEN, M. K. *et al.* Analysis of early dengue virus infection in mice as modulated by *Aedes aegypti* probing. **Journal of Virology**, New York, v. 88, n. 4, p. 1881-1889, Feb. 2014.

- MCKENZIE, B. A.; WILSON, A. E.; ZOHDY, S. *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: a meta-analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 5, e0216794, May 2019.
- MCTIGHE, S. P.; VAIDYANATHAN, R. Vector competence of *Aedes albopictus* from Virginia and Georgia for chikungunya virus isolated in the Comoros Islands 2005. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 12, n. 10, p. 867-871, Oct. 2012.
- MILLER, B. R. *et al.* Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. **Tropical Medicine and Parasitology**, New York, v. 40, n. 4, p. 396-399, Dec. 1989.
- MILLER, J. R. *et al.* Designation of chemicals in terms of the locomotor responses they elicit from insects: an update of Dethier *et al.* 1960. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 102, n. 6, p. 2056-2060, Dec. 2009.
- MORRISON, T. E. Reemergence of chikungunya virus. **Journal of Virology**, New York, v. 88, n. 20, p. 11644-11647, Oct. 2014.
- MULATIER, M. *et al.* DEET efficacy increases with age in the vector Mosquitoes *Anopheles gambiae* s.s. and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 55, n. 6, p. 1542–1548, 2018.
- MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, New York, 21, n. 10, p. 1887, Oct. 2015.
- MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, New York, v. 68, p. 53-55, July 2015a.
- MUSSO, D. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 21, n. 2, p. 359-361, Feb. 2015b.
- ODUYEBO, T. *et al.* Update: interim guidance for health care providers caring for pregnant women with possible Zika virus exposure: United States, including U.S. Territories, July 2017. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 66, n. 29, p. 781-793, July 2017.
- OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 19, n. 9, p. 20720, Mar. 2014.
- OLSON, J. G. *et al.* Zika virus, a cause of fever in central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 389-393, Jan. 1981.
- ONYANGO, M. G. *et al.* Increased temperatures reduce the vectorial capacity of *Aedes* mosquitoes for Zika virus. **Emerging Microbes and Infections**, Bern, v. 9, n. 1, p. 67–77, 2020.
- OSANAI, C. H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima: nota prévia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 53-54, jan-fev. 1983.

PADILHA, K. P. *et al.* Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 10, p. 1-6, ago. 2018.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. **Informe epidemiológico SE 52**: Período de referência de 04/01/2015 a 02/01/2016. Recife: SES/PE, 2016.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. **Informe epidemiológico nº 50 SE 52**: Período de referência de 03/01/2016 a 31/12/2016. Recife: SES/PE, 2017.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. **Boletim Arboviroses SE 52**: Período de referência de 01/01/2017 a 31/12/2017. Recife: SES/PE, 2018.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. **Boletim Arboviroses SE 52**: Período de referência de 31/12/2017 a 29/12/2018. Recife: SES/PE, 2019.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. **Boletim Arboviroses SE 52**: Período de referência de 30/12/2018 a 28/12/2019. Recife: SES/PE, 2020.

PETERSEN, M. T. *et al.* The impact of the age of first blood meal and Zika virus infection on *Aedes aegypti* egg production and longevity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 7, p. 1-15, July 2018.

PHUMEE, A. *et al.* Vertical transmission of Zika virus in *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1-9, Mar. 2019.

PHUMEE, A. *et al.* Molecular detection of Indian Ocean Lineage Chikungunya virus RNA in field collected *Culex quinquefasciatus* Say from Bangkok, Thailand but no evidence of virus replication. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 16, n. 1 January, p. 1-12, 2021.

PINHEIRO, Pedro. *Aedes aegypti*: como é o mosquito da dengue. MD. Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.mdsaude.com/doencas-infecciosas/fotos-mosquito-dengue/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, p. 11-17, 2013. Suppl.1, Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v108s1/0074-0276-mioc-108-s1-0011.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2019.

POWERS, A. M. *et al.* Re-emergence of chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, London, v. 81, n. 2, p. 471-479, Fev. 2000.

QUALLS, W. A. *et al.* Sindbis virus infection alters blood feeding responses and DEET repellency in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 418-423, Mar. 2012.

RASGON, J. L.; BENELLI, G.; DODSON, B. L. Vector competence of *Anopheles* and *Culex* mosquitoes for Zika virus. **PeerJ**, New York, n. 5, e3096, Mar. 2017.

- REICHERT, W. *et al.* Repellency Assessment of *Nepeta cataria* essential oils and isolated nepetalactones on *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1-9, Mar. 2019.
- REISINGER, E. C. *et al.* Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectorized chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. **The Lancet**, New York, v. 392, n. 10165, p. 2718-2727, Dec. 2018.
- REISKIND, M. H.; WESTBROOK, C. J.; LOUNIBOS, L. P. Exposure to chikungunya virus and adult longevity in *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse). **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 35, n. 1, p. 61-68, June 2010.
- RESCK, M. E. B. *et al.* Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.
- RESTREPO-JARAMILLO, N. B. Infección por el virus del chikungunya. **CES Medicina**, Medellín, v. 28, n. 2, p. 313-323, Jul.-Dic. 2014.
- RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T.; CAO-LORMEAU, V. M. Vector competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 9, e0005024, Sept. 2016.
- RIEMERSMA, K. K.; COFFEY, L. L. Chikungunya virus populations experience diversity-dependent attenuation and purifying intra-vector selection in Californian *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 11, e0007853, p. 1–25, 2019.
- ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory in 1952-53. I. Clinical features. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan. 1955.
- RODRIGUEZ, S. D. *et al.* Efficacy of some wearable devices compared with spray-on insect repellents for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 1-6, Jan. 2017.
- ROSA, A. P. A.T. *et al.* Epidemia de febre do Oropouche em Serra Pelada, município de Curionópolis, Pará, 1994. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 29, n. 6, p. 537-541, nov./dez. 1996.
- ROSS, H. H. The colonization of temperate North America by mosquitoes and man. **Mosquito News**, New York, v. 24, n. 2, p. 113-118, 1964.
- ROSS, P. A.; LAU, M. J.; HOFFMANN, A. A. Does membrane feeding compromise the quality of *Aedes aegypti* mosquitoes? **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 11, p. 1–19, 2019.
- ROSS, R. W. The newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, London, v. 54, n. 2, p. 177-191, June. 1956.
- ROTH, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: an

unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 19, n. 41, p. 1-8, 16 Oct. 2014.

ROUNDY, C. M. *et al.* Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for Zika virus transmission. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 23, n. 4, p. 625-632, Apr. 2017.

ROZILAWATI, H. *et al.* Entomological study of chikungunya infections in the State of Kelantan, Malaysia. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 133, n. 6, p. 670-673, June 2011.

RUTLEDGE, L. C. *et al.* Comparative sensitivity of mosquito species and strains to the repellent diethyl toluamide. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 536-541, Feb. 1978.

SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology**, New York, v. 7, n. 9, p. 1-13, Jan. 2007.

SALDAÑA, M. A. *et al.* Zika virus alters the microRNA expression profile and elicits an RNAi response in *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. 1-18, July 2017.

SAM, I.-C. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of chikungunya virus of different genotypes from Malaysia. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 11, e50476, Nov. 2012.

SAMBRI, V. *et al.* The 2007 epidemic outbreak of chikungunya virus infection in the Romagna region of Italy: a new perspective for the possible diffusion of tropical diseases in temperate areas? **New Microbiologica**, Pavia, v. 31, n. 3, p. 303-304, July 2008.

SANIT'ALL Saúde Ambiental. **Produtos:** Capturador Manual de Castro (Látex). Sanit'All, 2018. Disponível em: <http://www.sanitall.com.br/individual.php?codigo=200010>. Acesso em: 5 fev. 2021.

SARDELIS, M. R. *et al.* Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquilletidia* mosquitoes for West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 7, n. 6, p. 1018-1022, Nov.-Dec. 2001.

SAXENA, S. K. *et al.* Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **Virus Disease**, Bern, v. 27, n. 2, p. 111-115, June 2016.

SEVERINI, F. *et al.* Vector competence of Italian *Aedes albopictus* populations for the chikungunya virus, E1-226V. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 4, e0006435, Apr. 2018.

SEVERSON, D. W.; BEHURA, S. K. Genome investigations of vector competence in *Aedes aegypti* to inform novel arbovirus disease control approaches. **Insects**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1-15, Oct. 2016.

SHARP, T. M. *et al.* Dengue and zika virus diagnostic testing for patients with a clinically compatible illness and risk for infection with both viruses. **MMWR recommendations and**

reports., Atlanta, v. 68, n. RR-1, p.1-10, Jun. 2019.

SHI, W. *et al.* Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin American outbreak. **Emerging Microbes & Infection**, Bern, v. 5, 7 e 68. 6 Jul. 2016.

SILVA, H. H.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, p. 349-355, jul./ago. 1999.

SILVA, S. J. R. *et al.* Development and validation of reverse transcription loop- mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1-12, Mar. 2019.

SILVEIRA, I. D. *et al.* Reduction on *Aedes aegypti* lifespan but no effects on mosquito fecundity and oviposition success. **Frontiers in Microbiology**, Bethesda, v. 9, p. 1-8, Dec. 2018.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 335-338, July 1964.

SIRISENA, P. D. N. N.; KUMAR, A.; SUNIL, S. Evaluation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) life table attributes upon chikungunya virus replication reveals impact on egg-laying pathways. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 1580-1587, 2018.

SMARTT, C. T. *et al.* *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Florida transmitted Zika virus. **Frontiers in Microbiology**, Bethesda, v. 9, p. 2016-2019, Apr. 2018.

SOPER, F. L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 14, p. 887-891, Nov. 1965.

STEFANI, G. P. *et al.* Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 81-89, mar. 2009.

STRICKMAN, D. Rate of oviposition by *Culex quinquefasciatus* in San Antonio, Texas, during three years. **Journal of American Mosquito Control Association**, New York, v. 4, n. 3, p. 339-344, Sept. 1988.

STYER, L. M.; MEOLA, M. A; KRAMER, L. D. West Nile virus infection decreases fecundity of *Culex tarsalis* females. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 1074-1085, Nov. 2007.

STYER, L. M. *et al.* Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. **Journal of Virology**, New York, v. 85, n. 4, p. 1517-1527, Feb. 2011.

SUBRA, R. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa. **International Journal of Tropical Insect Science**, Cambridge, v. 1, n. 4, p. 319-338, Dec. 1981.

- SULEMAN, M. Intraspecific variation in the reproductive capacity of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 819-828, Sept. 1990.
- SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. 1-8, Mar. 2013.
- TABACHNICK, W. J. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 10, n. 1, p. 249-277, Jan. 2013.
- TANAKA, K.; MIZUSAWA, K.; SAUGSTAD, E. S. **A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae)**. Gainesville, FL: American Entomological Institute, 1979. 987 p.
- TEMPORÃO J. G. *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, New York, v. 17, n. 10, p. 1979-1980, May 2011.
- THANGAMANI, S. *et al.* Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 95, n. 5, p. 1169-1173, Nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0448>. Acesso em: 14 jul. 2019.
- THAVARA, U. *et al.* Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 40, n. 5, p. 951-962, Sept. 2009.
- THIBERVILLE, S. D. *et al.* Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, Jan. 2013.
- THOMAS, S. *et al.* Functional dissection of the alphavirus capsid protease: sequence requirements for activity. **Virology Journal**, London, v. 7, n. 1, p. 327, Nov. 2010.
- TSETSARKIN, K. A. *et al.* A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, Bethesda, v. 3, n. 12, p. 1895-1906, Dec. 2007.
- TURELL, M. J. Members of the *Culex pipiens* complex as vectors of viruses. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Washington, v. 28, n. 4, p. 123-126, Dec. 2012. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/8756-971X-28.4.123>. Acesso em: 26 mar. 2018.
- VAZEILLE, M.; MOUSSON, L.; FAILLOUX, A. B. Failure to demonstrate experimental vertical transmission of the epidemic strain of chikungunya virus in *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 632-635, Aug. 2009.

VEGA-RÚA, A. *et al.* High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten american countries as a crucial factor in the spread of chikungunya virus. **Journal of Virology**, New York, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, June 2014.

VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. **International Journal of Infectious Diseases**, New York, v. 48, p. 85-90, July 2016.

WANG, A. *et al.* Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes and Infections**, Bern, v. 6, n. 3, e13, Mar. 2017.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, New York, v. 120, p. 32-39, Aug. 2015.

WEGER-LUCARELLI, J. *et al.* Vector competence of American mosquitoes for three strains of Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 10, e0005101, Oct. 2016.

WHITE, G. B. Lymphatic filariasis. *In*: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors**. Geneva: OMS, 1989. p. 2334.

WIMALASIRI-YAPA, B. M. C. R. *et al.* Chikungunya virus in Asia-Pacific: a systematic review. **Emerging Microbes and Infections**, Bern, v. 8, n. 1, p. 70-79, Jan. 2019.

WONG, P. S. J. *et al.* *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 8, e2348, Aug. 2013.

XAVIER, M. do N. *et al.* Field evaluation of sticky BR-OVT traps to collect culicids eggs and adult mosquitoes inside houses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 51, n. 3, p. 297-303, abr./jun. 2018.

XUE, R. D.; BARNARD, D. R.; SCHRECK, C. E. Influence of body size and age of *Aedes albopictus* on human host attack rates and the repellency of Deet. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, n. 11, p. 50-53, 1995.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, jun. 2015.

ZELLER, H.; VAN BORTEL, W.; SUDRE, B. Chikungunya: its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. **Journal of Infectious Diseases**, New York, v. 214, n. Suppl 5, p. S436-S440, 2016.

ZINK, S. D. *et al.* Exposure to West Nile virus increases bacterial diversity and immune gene expression in *Culex pipiens*. **Viruses**, Basel, v. 7, n. 10, p. 5619-5631, Oct. 2015.

# SCIENTIFIC REPORTS

## OPEN Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents?

Walter S. Leal<sup>1</sup>, Rosângela M. R. Barbosa<sup>2</sup>, Fangfang Zeng<sup>3</sup>, Gabriel B. Faienstein<sup>2</sup>, Kaiming Tan<sup>1</sup>, Marcelo H. S. Paiva<sup>2,3</sup>, Duschinka R. D. Guedes<sup>2</sup>, Mônica M. Crespo<sup>2</sup> & Constância F. J. Ayres<sup>2</sup>

Received: 15 December 2016

Accepted: 13 January 2017

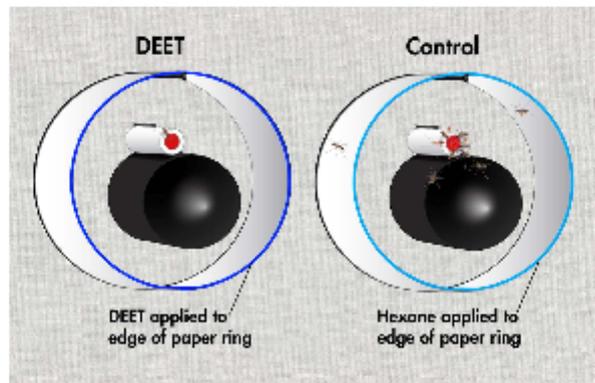
Published: 16 February 2017

The World Health Organization (WHO) recommends that people travelling to or living in areas with Zika virus (ZIKV) outbreaks or epidemics adopt prophylactic measures to reduce or eliminate mosquito bites, including the use of insect repellents. It is, however, unknown whether repellents are effective against ZIKV-infected mosquitoes, in part because of the ethical concerns related to exposing a human subject's arm to infected mosquitoes in the standard arm-in-cage assay. We used a previously developed, human subject-free behavioural assay, which mimics a human subject to evaluate the top two recommended insect repellents. Our measurements showed that DEET provided significantly higher protection than picaridin provided against noninfected, host-seeking females of the southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. When tested at lower doses, we observed a significant reduction in DEET-elicited protection against ZIKV-infected yellow fever mosquitoes from old and recent laboratory colonies. The reduction in protection is more likely associated with aging than the virus infection and could be compensated by applying a 5x higher dose of DEET. A substantial protection against ZIKV-infected and old noninfected mosquitoes was achieved with 5% DEET, which corresponds approximately to a 30% dose in the conventional arm-in-cage assays.

The Zika virus (ZIKV) was isolated from a sentinel rhesus monkey almost seven decades ago during a long-term research program sponsored by the Rockefeller Foundation and aimed at unravelling the cycle of sylvan yellow fever virus in Uganda<sup>1</sup>. Among the seven new viruses discovered in the Yellow Fever Research Institute at Entebbe, the West Nile Virus (WNV), became notorious earlier on, particularly for causing "seasonal epidemics" in North America and being the most common cause of neuroinvasive (encephalitis, meningitis, or acute flaccid paralysis) arboviral diseases in the United States of America<sup>2</sup>. Meanwhile, no one paid much attention to ZIKV, because up to an outbreak that occurred in the Yap Island in 2007 only 14 human cases had been identified<sup>3</sup>. On Yap Island, Federal State of Micronesia, it was estimated that 73% of residents 3 years of age or older have been infected with ZIKV<sup>4</sup>. Here, it was observed that in addition to rash, conjunctivitis, and arthralgia, Zika infection might lead to Guillain-Barré syndrome<sup>5</sup>. It was in Brazil in 2015, however, that ZIKV gained notoriety particularly given its teratogenic effect<sup>6</sup>, which led the World Health Organization (WHO) to declare on February 1, 2016 ZIKV an international public health emergency; as of November 18, 2016, WHO updated the ZIKV status to a "significant enduring public health challenge requiring intense action."<sup>7</sup> From Brazil, ZIKV disseminated so rapidly that one year after its isolation from Brazilian patients<sup>7,8</sup>, ZIKV reached as many as 40 countries in the Americas, including the United States. At the time of this writing, 4,575 ZIKV infections have been reported in the United States, mostly travel-associated cases, in addition to 185 locally transmitted by mosquito bites, with Florida leading the statistics on autochthonous transmission and New York reporting as many as 942 travel-associated ZIKV cases. In US territories, more than 33,000 cases have been reported, most of them being locally transmitted<sup>9</sup>. Therefore, people travelling to or living in ZIKV epidemic or outbreak areas are strongly advised to take prophylactic measures to avoid acquiring and further disseminating the virus. Without a ZIKV vaccine, the main recommendations by WHO are wearing clothes that cover as much of the body as possible, using physical barriers such as window screens, sleeping under mosquito nets, and using insect repellents for protection against mosquito bites.

Chemicals used to reduce mosquito bites are not only repellents *sensu stricto*, i.e., those compounds that cause the responder to steer away from the source, but also excitorepellents or irritants, i.e., chemicals eliciting

<sup>1</sup>Department of Molecular and Cellular Biology, University of California-Davis, Davis, CA 95616, USA. <sup>2</sup>Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50.740-465, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico do Agreste - Rodovia BR-104, Km 59 - Nova Caruaru, Caruaru - PE - CEP: 55002-970, Brasil. Correspondence and requests for materials should be addressed to W.S.L. (email: wsleal@ucdavis.edu)



**Figure 1.** Diagrammatic representation of the human subject-free, surface landing, and feeding assay. The ends of two internally painted Dudley bubbling tubes extend from a wooden board. The tubes were connected behind the board to a water bath and surrounded by filter paper rings in the behavioural arena. Blunted tips of stainless steel needles placed on the top of each tube served not only to deliver  $\text{CO}_2$ , but also to retain dental cotton rolls. The rolls were loaded with defibrinated sheep blood on the circular surface facing the mosquito cage (not seen). Hexane (200  $\mu\text{l}$ ) was applied to the edge of one ring (control), and the same volume of a solution of repellent (e.g., DEET) to another ring (test). After allowing evaporation for at least 3 min, the rings were placed in the arena and secured by insect pins. Graphics created by Steven Oerding, IET Academic Technology Services, University of California-Davis.

increasing locomotion activity after an insect makes contact with the source<sup>10</sup>. From a strict mechanistic perspective, these two groups should be named noncontact and contact disengagers, respectively<sup>11</sup>. From a pragmatic viewpoint, it would suffice to consider that spatial repellents are odorants and contact repellents are tastants, i.e., their modes of action are “smell and avoid” and “taste and walk away,” respectively. Although contact repellents (contact disengagers) are invaluable in preventing mosquito bites, spatial repellents are preferred for skin application given that viruses may be transmitted while a mosquito is probing the skin prior to initiating a blood meal<sup>12</sup>. Additionally, virus replication in the salivary glands may affect the gustatory system<sup>13</sup> and, consequently, reduce contact repellency sensitivity<sup>14</sup>.

We then raised the question whether ZIKV infection would alter mosquito responses to insect repellents recommended for ZIKV prevention<sup>15</sup>. Efficacy of mosquito repellents for human skin is measured according to guidelines by the Environmental Protection Agency (EPA)<sup>16</sup> and WHO<sup>17</sup>. In short, test repellents are applied directly to the arm of a human volunteer, which is then inserted into a cage housing healthy, host-seeking female mosquitoes to determine landing and/or probing activity. Although alternative methods that prevent direct contact between the mosquito and the subject’s arm have been designed<sup>18,19</sup>, legitimate ethical concerns preclude measuring repellency with EPA and WHO standard arm-in-cage protocols when using infected mosquitoes. We applied a previously developed two-choice human subject-free, noncontact repellency assay<sup>20</sup> to test protection of commercial repellents against ZIKV-infected mosquitoes. Here, we report that the oldest synthetic repellent on the market, DEET (*N,N*-diethyl-3-methylbenzamide), has a higher protection rate as a spatial repellent against both the southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, than its more modern counterpart, picaridin (Icaridin, Bayrepel®, butan-2-yl 2-(2-hydroxyethyl) piperidine-1-carboxylate). Additionally, we show both laboratory and field populations of the yellow fever mosquito from Brazil appear to have somewhat reduced responses to repellents at the age that they are competent for ZIKV transmission than younger, healthy mosquitoes used for standard efficacy testing. Our findings suggest, for protection against ZIKV, higher doses of DEET-based repellents should be applied.

### Results and Discussion

Our surface landing and feeding assay (Fig. 1) differs in multiple features from the arm-in-cage standard protocol<sup>16,17</sup>. First and foremost, it allows measurement of repellency behaviour in the absence of a human subject, which is invaluable when measuring behaviour of infected mosquitoes. Secondly, it evaluates only spatial repellency given that the blood and repellent sources are spatially separated; thus, to reach a blood source, no direct contact between the repellent and the gustatory system is needed. The chemical curtain generated by the vapour phase of a test repellent applied to a filter paper ring surrounding the attractant source causes the responder to steer away from airborne chemicals (spatial repellency). Lastly, this two-choice assay allows simultaneous assessment of repellency and mosquito avidity for a blood meal based on the responses to the control side of the arena. This assay thus reduces/eliminates the possibility of false-positives when testing one at a time in no-choice assays like