

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Análise da competência vetorial de populações de *Aedes aegypti* de diferentes
cidades brasileiras para os vírus da dengue e chikungunya**

por

Amanda Cupertino de Freitas

Belo Horizonte

2023

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

A. C. FREITAS

2023

AMANDA CUPERTINO DE FREITAS

Análise da competência vetorial de populações de *Aedes aegypti* de diferentes cidades brasileiras para os vírus da dengue e chikungunya

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Transmissores Patógenos.

Orientação: Álvaro Gil Araújo Ferreira

Coorientação: Luciano Moreira

Belo Horizonte

2023

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

F884a
2023

Freitas, Amanda Cupertino de.

Análise da competência vetorial de populações de *Aedes aegypti* de diferentes cidades Brasileiras para os vírus da dengue e chikungunya / Amanda Cupertino de Freitas. – Belo Horizonte, 2023

X, 57 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 53-57

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Transmissores Patógenos.

1. Dengue vírus/crescimento & desenvolvimento 2. Chikungunya virus crescimento & desenvolvimento 3. *Aedes aegypti*. 4. Vigilância de vetores I. Título. II. Ferreira, Álvaro Gil Araújo (Orientação). III. Moreira, Luciano Andrade (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.918

AMANDA CUPERTINO DE FREITAS

Análise da competência vetorial de populações de *Aedes aegypti* de diferentes cidades Brasileiras para os vírus da dengue e chikungunya

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Transmissores Patógenos.

Banca Examinadora:

Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira - IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientador/Presidente)

Dra. Alessandra Aparecida Guarneri - IRR/FIOCRUZ MINAS (Titular)

Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna - UFMG (Titular)

Dra. Anna Carolina Pinheiro Lage - IRR/FIOCRUZ MINAS (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 26/05/2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação. Sem o apoio e incentivo deles, este trabalho não teria sido possível.

Primeiramente, desejo agradecer ao meu orientador, Dr. Álvaro Gil pela orientação valiosa, paciência e conhecimentos transmitidos ao longo deste processo. Sua dedicação e expertise foram fundamentais para o sucesso desta dissertação. Agradeço também aos professores e membros da banca examinadora por dedicarem seu tempo e compartilharem suas perspectivas durante a defesa.

Expresso minha gratidão ao Dr. Luciano Moreira e aos meus colegas de pesquisa, que contribuíram com ideias e discussões enriquecedoras, em especial Siad, Thiago, Livia e Silvana. Agradeço pela troca de conhecimentos e pelo apoio mútuo ao longo dessa jornada acadêmica. À Fernanda, agradeço todo o apoio, dedicação, ajuda e compartilhamento de experiência. Agradeço a todos meus amigos e colegas da empresa Ecovec que colaboraram e me apoiaram durante todas as etapas do mestrado, em especial Rafael, Saulo, Ana Paula, Denise, Nathália, Luís e Peçanha.

Gostaria de agradecer à minha família pelo suporte incondicional ao longo dos anos, em especial minha mãe e meu namorado Átilla. Seu amor, encorajamento e compreensão foram essenciais para minha motivação e perseverança.

Por fim, expresso meu profundo agradecimento a todos os amigos e entes queridos que me apoiaram durante este processo desafiador. Suas palavras de encorajamento, gestos de carinho e compreensão foram uma fonte constante de inspiração.

A todos os mencionados e àqueles que, porventura, não foram citados, meu sincero agradecimento. Cada contribuição e apoio, grande ou pequeno, foram peças essenciais para a realização desta dissertação.

RESUMO

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes vetores que podem causar doenças como dengue, febre amarela, Zika e chikungunya. A epidemiologia desses vírus depende de fatores como densidade populacional, aumento da circulação de pessoas, presença de vetores e sua competência vetorial. No Brasil, uma das arboviroses de maior impacto na saúde pública é a dengue, que é endêmica e ocorre em epidemias intercaladas com transmissão contínua. Além disso, nos últimos anos, o Brasil tem enfrentado a rápida disseminação do vírus chikungunya (CHIKV), que tem originado vários surtos desde sua detecção inicial em 2014. A transmissão ocorre principalmente por mosquitos urbanos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* considerado o vetor principal dessas duas arboviroses no Brasil. Como a capacidade vetorial do mosquito varia de acordo com vários fatores, este estudo avaliou a competência vetorial de diferentes populações do mosquito *Ae. aegypti* capturados em cinco cidades brasileiras. Para isso, foram utilizados vírus recentemente isolados no Brasil para verificar a suscetibilidade à infecção, disseminação e transmissão desses dois arbovírus (DENV e CHIKV). O estudo começou com a coleta de ovos por meio de armadilhas ovitrampas. Após o estabelecimento das populações em laboratório, foi realizado o repasto sanguíneo em camundongos AG129 infectados com um dos vírus. Utilizando a técnica de RT-qPCR para avaliar a presença e quantidade de vírus, foi observado que todas as populações de mosquitos expostas ao CHIKV- ECSA, apresentaram altas taxas de infecção, eficiência de disseminação e alta eficiência na transmissão para um hospedeiro vertebrado. Essa eficiência de transmissão pode explicar a rápida expansão e aumento de casos dessa doença nos últimos anos, bem como a alta prevalência do CHIKV-ECSA em relação à linhagem africana. Para o DENV-1, também foram observadas altas taxas de infecção e disseminação nas populações brasileiras. Em conjunto, esses resultados demonstram a alta capacidade das populações brasileiras de *Ae. aegypti* em transmitir tanto CHIKV-ECSA como DENV-1. No entanto, mais estudos com outros genótipos de vírus e outras espécies de vetores, como o *Aedes albopictus*, são necessários para compreender a importância do vetor na ecologia e epidemiologia desses vírus.

Palavras chaves: Dengue vírus, Chikungunya vírus, *Aedes aegypti*, Vigilância de vetores

ABSTRACT

Arboviruses are viruses transmitted by arthropod vectors that can cause diseases such as dengue, yellow fever, Zika, and chikungunya. The epidemiology of these viruses depends on factors such as population density, increased human movement, vector presence, and vector competence. In Brazil, one of the arboviruses with the greatest impact on public health is dengue, which is endemic and occurs in alternating epidemics with continuous transmission. Additionally, in recent years, Brazil has experienced the rapid dissemination of the chikungunya virus (CHIKV), which has led to several outbreaks since its initial detection in 2014. Transmission occurs primarily through urban mosquitoes of the *Aedes* genus, with *Aedes aegypti* considered the main vector for these two arboviruses in Brazil. As the vector competence of mosquitoes varies according to various factors, this study assessed the vector competence of different populations of *Ae. aegypti* mosquitoes captured in five Brazilian cities. For this purpose, recently isolated viruses in Brazil were used to assess susceptibility to infection, dissemination, and transmission of these two arboviruses. The study began with the collection of eggs using ovitraps. After establishing laboratory populations, blood meals were taken from AG129 mice infected with one of the viruses. Using RT-qPCR to assess the presence and quantity of the viruses, it was observed that all populations of mosquitoes exposed to CHIKV-ECSA exhibited high infection rates, dissemination efficiency, and high efficiency in transmission to a vertebrate host. This transmission efficiency may explain the rapid expansion and increased cases of these diseases in recent years, as well as the high prevalence of CHIKV-ECSA compared to the African lineage. For DENV-1, high infection and dissemination rates were also observed in Brazilian populations. Together, these results demonstrate the high capacity of Brazilian populations of *Ae. aegypti* to transmit both CHIKV-ECSA and DENV-1. However, further studies with other virus genotypes and vector species, such as *Aedes albopictus*, are necessary to understand the importance of the vector in the ecology and epidemiology of these viruses.

Key words: Dengue virus, Chikungunya virus, *Aedes aegypti*, Vector Control of Diseases

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Cidades em que ocorreram coletas de <i>Aedes aegypti</i>	22
FIGURA 2: Armadilha ovitrampa instalada no peridomicílio em Porto Alegre.....	27
FIGURA 3: Taxa e carga identificadas no intestino em 4dpi – CHIKV.....	35
FIGURA 4: Taxa e carga identificadas no intestino em 8dpi - CHIKV.....	36
FIGURA 5: Taxa e carga identificadas em carcaça em 4dpi - CHIKV.....	37
FIGURA 6: Taxa e carga identificadas em carcaça em 8dpi - CHIKV.....	38
FIGURA 7: Eficiência de transmissão de CHIKV em 8dpi.....	39
FIGURA 8: Taxa de infecção no intestino em 4dpi.....	40
FIGURA 9: Taxa de infecção no intestino em 8dpi.....	40
FIGURA 10: Eficiência de disseminação – carcaça - 4dpi.....	41
FIGURA 11: Eficiência de disseminação – carcaça - 8dpi.....	41
FIGURA 12: Carga Viral DENV.....	42
FIGURA 13: Taxas de infecção e disseminação para DENV e CHIKV.....	44

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Histórico chikungunya no Brasil.....	13
QUADRO 2: Principais sintomas da febre Chikungunya.....	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

Ae. albopictus – *Aedes albopictus*

ARA - Araraquara

cDNA - DNA complementar

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CHIKV – Vírus chikungunya

cm - Centímetros

DENV - Vírus da dengue

DENV-1 a DENV-4 – Vírus da dengue e seus sorotipos (1 a 4)

Dpi – Dias pós infecção

H. sapiens – *Homo sapiens*

Hab - Habitantes

IRR – Instituto René Rachou

JABO - Jaboticatubas

Mg/Kg – Miligramas por quilo

mL - mililitros

ng/μL – nanograma por microlitro

p.f.u - Unidades de formação de placas

PET – Petrolina

POA – Porto Alegre

RNA - Ácido Ribonucleico

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa

SA - Santos

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

YFV – Vírus da febre amarela

ZIKV – Vírus zika

μL - microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ARBOVÍRUS	11
1.2 CHIKUNGUNYA.....	12
1.2.1 Histórico e epidemiologia	12
1.2.2 Agente etiológico	13
1.2.3 Manifestações Clínicas	14
1.3 DENGUE	15
1.3.1 Histórico e epidemiologia	15
1.3.2 Agente etiológico	16
1.3.3 Manifestações Clínicas	16
1.4 MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	17
1.4.1 Classificação, morfologia e ciclo de vida	17
1.4.2 Distribuição	17
1.4.3 Infecção e capacidade vetorial	18
2 JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVO	21
3.1 GERAL.....	21
3.2 ESPECÍFICOS	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA.....	22
4.1.1 Araraquara/SP	23
4.1.2 Jaboticatubas/MG.....	23
4.1.3 Petrolina/PE.....	24
4.1.4 Porto Alegre/RS	25
4.1.5 Santos/SP	25
4.2 COLETA DE AMOSTRAS.....	26
4.3 MANUTENÇÃO NO INSETÁRIO	28
4.4 INOCULAÇÃO EM MODELO MURINO AG129.....	29
4.5 INFECÇÃO DOS MOSQUITOS COM ARBOVÍRUS.....	29
4.6 COLETA E DISSECAÇÃO	30
4.7 TRANSMISSÃO DO CHIKV DE MOSQUITOS PARA CAMUNDONGOS AG129	30

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA.....	31
4.9 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)	31
4.10 REALIZAÇÃO DE RT-qPCR.....	32
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
5 RESULTADOS	34
5.1 COMPETÊNCIA VETORIAL <i>Aedes aegypti</i> PARA CHIKV	34
5.1.1 Taxa de infecção para CHIKV	34
5.1.2 Eficiência de disseminação para CHIKV	36
5.1.3 Eficiência de transmissão para CHIKV	38
5.2 COMPETÊNCIA VETORIAL <i>Aedes aegypti</i> PARA DENV	39
5.2.1 Taxa de infecção para DENV	39
5.2.2 Eficiência de disseminação para DENV	41
5.2.3 Carga Viral para DENV.....	42
5.3 COMPETÊNCIA VETORIAL ENTRE DENV E CHIKV	43
6. DISCUSSÕES	45
6.1 ESTUDOS DE COMPETÊNCIA VETORIAL DE CULICÍDEOS PARA CHIKV	45
6.2 ESTUDOS DE COMPETÊNCIA VETORIAL DE CULICÍDEOS PARA DENV	46
6.3 COMPETÊNCIA VETORIAL ENTRE DENV E CHIKV	49
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVÍRUS

Arbovírus, acrônimo derivado da expressão inglesa **Arthropod borne viruses**, como dengue, febre amarela, zika e chikungunya, são importantes patógenos humanos transmitidos por mosquitos que impõem um crescente impacto na saúde pública mundial (WHO, 1988). Os arbovírus são vírus que precisam de transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados e artrópodes através de hematofagia. Estes vírus possuem a capacidade de multiplica-se nos tecidos podendo ser passados para outros hospedeiros após um período de incubação (WHO, 1988). A maioria das arboviroses pertencem as famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Shope & Meegan, 1997). Geralmente são mantidos em ambientes silvestres e são transmitidos para humanos pelo contato enzoóticos, de forma acidental (KREUDER *et al.*, 2015), o que pode levar ao surgimento de algumas formas epidêmicas de doenças em centros urbanos (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

A transmissão de arbovírus segue um ciclo que envolve uma pessoa infectada, um mosquito vetor e outra pessoa suscetível à infecção. Os vírus se multiplicam nos tecidos do mosquito após se infectarem ao se alimentar do sangue de um hospedeiro em período de viremia. Embora haja relatos de transmissões verticais de alguns vírus de fêmea para geração F1, isso ocorre em baixíssimas taxas e não é completamente compreendido (Gunther *et al.*, 2007).

O ciclo da transmissão é iniciado quando o mosquito fêmea suga o sangue de uma pessoa infectada. De 1 a 2 dias pós-infecção (dpi), os vírus invadem o intestino médio do mosquito e se replicam, pelo sistema traqueal se disseminam por todo o corpo atingindo o pico máximo de infecção com cerca de 7 a 10 dias atingindo as glândulas salivares com certa de 7dpi. Após esse período, o mosquito infectado transmite o vírus da dengue ao picar outra pessoa suscetível à infecção (Salazar *et al.*, 2007).

A urbanização de um arbovírus depende de vários fatores que são discutidos frequentemente pelos grupos científicos como: mudanças climáticas, desmatamento e o aumento da frequência do tráfego de pessoas através de processos migratórios ou

turismo (Kilpatrick & Randolph, 2012). Devido ao processo de urbanização, esses vírus são considerados sério problema de saúde pública com expressiva morbidade e/ou mortalidade. Exemplo disso são a febre amarela (YFV) e a dengue (DENV) que são endêmicas nas américas (Travassos da Rosa *et al.*, 1997), e os recentes surtos de zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) ocorridos no Brasil nos últimos anos.

No Brasil, as arboviroses apresentam ampla distribuição, porém possuem predominância nas regiões tropicais devidos as condições ambientais favoráveis. (Travassos da Rosa *et al.*, 1989). O DENV é o mais frequentemente encontrado circulando nas cidades brasileiras, porém a cada dia surgem novas epidemias e surtos de arboviroses emergentes e clinicamente semelhantes, como por exemplo o CHIKV que nos últimos anos tem causado um elevado número de surtos (Santos *et al.*, 2023).

1.2 CHIKUNGUNYA

1.2.1 Histórico e epidemiologia

O Chikungunya é um Alfavírus que se espalhou rapidamente pelas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Recentemente, mais de um milhão de casos foram registrados na Índia e no Brasil. O vírus se tornou endêmico nas ilhas do Caribe, América do Sul, América Central e, recentemente, no sudeste dos Estados Unidos. O vírus adaptou-se rapidamente a diferentes ciclos de transmissão mosquito-mamífero, dependendo da região geográfica. Acredita-se que um ciclo urbano entre o vetor do mosquito *Aedes aegypti* e os seres humanos sustente grande parte da recente propagação epidêmica (Santos *et al.*, 2023).

Segundo Santos *et al.* (2023), sua descoberta ocorreu em 1950, durante um surto de dengue na Tanzânia. Desde então, foram identificados dois padrões de transmissão: um silvestre e periurbano na África, através do mosquito *Aedes ssp.*, e outro urbano na Ásia, por meio do *Ae. aegypti*. Três genótipos diferentes foram observados circulando em diferentes partes do mundo: África Central, Sul e Leste (ECSA), África Ocidental (WA) e Ásia.

A expansão da doença no Oceano Índico, Ásia e Europa se deu a partir de 2005, quando foram registradas mutações do vírus na E1 do envelope viral, permitindo que o

vírus se adaptasse melhor ao vetor ao *Ae. albopictus*. Nessa época foram registrados os primeiros casos graves da doença e uma letalidade estimada de 1/1.000 casos (MORRISON, 2014).

Segundo Donalísio e Freitas (2015), no Brasil, como pode ser visto no quadro 1, os primeiros registros ocorreram em 2010 com casos importados e em 2014 já foram registrados os primeiros casos autóctones. Desde então, ocorreram picos epidêmicos principalmente no estado do Ceará e o vírus está em expansão para outros estados do país.

QUADRO 1: Histórico chikungunya no Brasil.

ANO	EVENTO	LOCAL
2010	Primeiros casos importados	Brasil
2014	Primeiros casos autóctones	Oiapoque (AP) e Feira de Santana (BA)
2014	Identificação de casos importados	Brejo Santo, Fortaleza (provável infecção na República Dominicana) e Acopiara (possível infecção em Suriname)
2016	Primeiros casos autóctones confirmados	Ceará, com 17.778 casos em Fortaleza
2016 E 2017	Picos epidêmicos da doença	Ceará, com incidência de 365,5 e 1.174,9 casos por 100 mil habitantes, respectivamente
2018	Diminuição expressiva dos casos	Ceará, com taxa de incidência de 15,6 casos por 100 mil habitantes
2022	Região Nordeste mais afetada e Ceará com maior número de óbitos	Brasil, com 39 mortes (41,3%) registradas no estado do Ceará

Fonte: Donalísio MR, Freitas AR. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge (2015)

1.2.2 Agente etiológico

O vírus chikungunya é um arbovírus pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*, sendo transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* spp. (Donalísio e Freitas, 2015). Ele possui um genoma de RNA de sentido positivo e única cadeia com cerca de 12 mil nucleotídeos. Foi descoberto em 1953, quando houve um grande surto na Tanzânia com sintomas de febre alta e dores articulares intensas. O vírus foi isolado do sangue de uma pessoa com febre.

1.2.3 Manifestações Clínicas

O nome Chikungunya significa "aquele que se curva" em Makonde, língua falada em várias regiões da África Oriental, devido à posição antálgica que os pacientes adotam durante o período da doença. Após a infecção através da picada de um mosquito infectado, o vírus chikungunya causa febre, dor articular intensa e debilitante, cefaleia e mialgia. Como pode ser visto no quadro 2, embora seus sintomas sejam semelhantes aos da dengue, a poliartrite/artralgia simétrica é mais evidente, especialmente nos punhos, tornozelos e cotovelos. Esses sintomas geralmente melhoram após 10 dias, mas podem durar meses após o quadro febril. A proporção de casos crônicos pode variar de 4% a 63%, dependendo da epidemia. Embora casos graves sejam raros, complicações neurológicas, cutâneas bolhosas e miocardite podem ocorrer em bebês e idosos (Beckhan, 2015).

QUADRO 2: Principais sintomas da febre Chikungunya.

SINTOMAS	DESCRIÇÃO
FEBRE	Elevação da temperatura corporal, comumente acima de 38°C.
DOR ARTICULAR	Dor intensa nas articulações, principalmente nos punhos, tornozelos e cotovelos.
CEFALEIA	Dor de cabeça intensa e persistente.
MIALGIA	Dor muscular intensa.
POLIARTRITE/ARTRALGIA	Inflamação das articulações, causando dor, inchaço e rigidez.
ERUPÇÃO CUTÂNEA	Erupção vermelha e pruriginosa na pele.
COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS	Encefalite, meningoencefalite, mielite e síndrome de Guillain-Barré.
CUTÂNEAS BOLHOSAS	Bolhas na pele, geralmente nos pés e nas mãos.
MIOCARDITE	Inflamação do músculo cardíaco, que pode levar a insuficiência cardíaca e arritmias cardíacas.

Fonte: Santos, E.P. *et al* (2023)

1.3 DENGUE

1.3.1 Histórico e epidemiologia

O vírus da dengue causa cerca de 50 milhões de casos humanos anualmente em todo o mundo. E atualmente é possível ver uma expansão que ocorre devido as mudanças climáticas, expandindo tanto em regiões tropicais quanto em regiões subtropicais (Câmara *et al.* 2007). Devido a uma combinação de crescimento populacional, urbanização e aumento da reprodução de *Ae. aegypti* nas cidades tropicais asiáticas e americanas, a dengue está emergindo rapidamente como uma das principais causas de morte de crianças nos trópicos (Valle *et al.* 2015). A doença é endêmica em mais de 100 países, sendo que as regiões mais afetadas são as Américas Central e do Sul, o Sudeste Asiático e o Pacífico Ocidental.

O vírus da dengue tem sido um problema de saúde pública desde 1600, conhecido por desenvolver forte dores musculares e articulares e longo período para recuperação. Em 1953, ocorreu o reconhecimento da dengue hemorrágica (síndrome do choque da dengue) associada à casos graves de hemorragia e choque em crianças e jovens na Filipinas. Em muitos casos os primeiros sintomas eram leves e se tornaram graves, levando cerca de 10% de jovens a morte. A dengue hemorrágica é uma infecção sequencial com diferentes tipos de sorotipos, o que pode levar a pessoa infectada a ter sintomas graves durante o desenvolvimento do quadro infeccioso (Shope & Meegan, 1997).

No Brasil, a transmissão vem ocorrendo de forma continuada desde 1986, intercalando-se com a ocorrência de epidemias. O primeiro registro do isolamento do Vírus da Dengue sorotipo 1 e 4 ocorreu na região amazônica em 1981 e 1982 respectivamente (Lopes *et al.*, 2014). Já em 1986 e 1990, no Rio de Janeiro, ocorreu a circulação de DENV-2 e DENV-1. A introdução do DENV-3 ocorreu em 2000 e foi identificado também no estado do Rio de Janeiro causando uma grande epidemia na região (Cruz & Vasconcelos, 2008).

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, no Brasil, em 2022 ocorreram 1.450.270 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 679,9 casos por 100 mil habitantes). Em 2021 foram registrados nos 534.743 casos prováveis (taxa de

incidência de 250,7 casos por 100 mil hab.) de dengue e em 2020 foram notificados 979.764 casos prováveis (taxa de incidência de 466,2 casos por 100 mil hab.) de dengue no país.

1.3.2 Agente etiológico

O vírus da dengue é um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* transmitido por mosquitos vetores do gênero *Aedes*, majoritariamente pela picada do mosquito vetor *Ae. aegypti* e em menor escala pelo *Ae. albopictus*. O DENV inclui 4 sorotipos causador da dengue e a infecção por um deles dá proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três (Kuhn *et al.* 2002).

Os Flavivirus são um gênero de vírus RNA de cadeia simples e sentido positivo, pertencente à família *Flaviviridae*, que inclui o vírus da febre amarela e dengue, entre outros. Com cerca de 40-60 nanômetros de tamanho, eles apresentam uma envoltura simétrica, nucleocapsídeo icosaédrico e uma única fita positiva de RNA com cerca de 10.000 nucleotídeos. A cadeia de leitura contém 10 genes que codificam uma proteína de 3391 aminoácidos. (Kuhn *et al.* 2002).

1.3.3 Manifestações Clínicas

O vírus da dengue tem como hospedeiro vertebrado o homem e outros primatas, mas somente o primeiro apresenta manifestação clínica da infecção e período de viremia de aproximadamente sete dias. Nos demais primatas, a viremia é baixa e de curta duração (Navarrete-Espinosa & Gómez-Dantés, 2006).

A maioria das infecções é assintomática, mas cerca de 20-25% apresentam sintomas. A síndrome febril aguda autolimitada é um dos efeitos causados pela infecção do vírus da dengue. Os pacientes apresentam febre (com temperatura variando entre 39°C e 40°C), dores de cabeça, fraqueza muscular, dores nas articulações, dores musculares e dor nos olhos. O aparecimento de manchas no corpo com ou sem coceira pode ocorrer após o fim do quadro febril. A apresentação dos sintomas pode variar de

uma forma com poucos sintomas até quadros graves que podem levar ao óbito (Navarrete-Espinosa & Gómez-Dantés, 2006).

Não existe terapia conhecida para a infecção aguda pelo vírus da dengue. Entre outros problemas, o desenvolvimento da dengue hemorrágica com infecção recorrente de novos sorotipos tem dificultado o desenvolvimento de estratégias eficazes de vacinação (Beckhan, 2015).

1.4 MOSQUITO *Aedes aegypti*

1.4.1 Classificação, morfologia e ciclo de vida

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um invertebrado artrópode da família Culicidae, subfamília Culicinae, que pertence à ordem Diptera e subordem Nematocera (Kraemer, 2015). Se alimentam de néctar de frutas na fase adulta, porém as fêmeas precisam de sangue para realizar a maturação dos ovos, sendo que as fêmeas possuem predileção por humanos (Scott *et al.*, 2000). Esse mosquito tem hábitos diurnos, com atividades mais frequentes no amanhecer e no entardecer.

Os *Ae. aegypti* apresentam a cor castanha a preta com cerdas prateadas no abdômen e pernas. No tórax é identificado um desenho em formato de “lira” que facilita a identificação desse mosquito.

O ciclo de desenvolvimento do mosquito passa por quatro estágios: ovo, larva (L1, L2, L3 e L4), pupa e o inseto alado. Esse desenvolvimento depende de diversos fatores, inclusive ambientais, que podem acelerar ou retardar as exúvias. Porém, ocorre em um curto espaço de tempo e geralmente varia entre 10 a 15 dias (Marinho *et al.* 2016).

1.4.2 Distribuição

Os mosquitos *Ae. aegypti* são considerados de grande importância médica devido sua elevada capacidade em transmitir várias arboviroses com grande impacto na saúde pública. Segundo Kraemer *et al.* (2015), o mosquito *Ae. aegypti* é mais comumente

encontrado em regiões tropicais e subtropicais, com áreas de alta concentração no Brasil e sudeste da Ásia, incluindo toda a Índia. Entretanto, na Europa e América do Norte temperada, há poucas áreas de habitat adequado para o mosquito, sendo encontrados com mais frequência na Espanha e Grécia. Na Austrália, por outro lado, o *Ae. aegypti* tem uma distribuição geográfica ampla.

O *Ae. aegypti* é uma espécie de mosquitos que tem uma distribuição geográfica predominantemente urbana e que apresenta uma elevada permissibilidade para a replicação de arbovírus resultando em uma alta eficiência na transmissão destes vírus para os humanos (Liu-Helmersson, 2014). As arboviroses mais comumente associadas ao *Ae. aegypti* no Brasil são a Dengue (DENV), a Zika (ZIKV), a Chikungunya (CHIKV), Febre amarela (YFV) urbana e Mayaro (MAYV) (Borges, 2018).

1.4.3 Infecção e capacidade vetorial

A habilidade e sucesso de uma determinada espécie de mosquito em transmitir arbovírus depende de dois aspectos diferentes, no entanto interligados: competência vetorial e capacidade vetorial. A competência vetorial é a aptidão intrínseca (com bases genéticas) de um vetor se infectar, multiplicar e transmitir o agente infeccioso a um hospedeiro vertebrado (Beerntsen *et al.*, 2000). Qualquer característica intrínseca ao mosquito, como por exemplo a sua preferência pelo hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo ou a suscetibilidade para se infectar por determinado patógeno, que tenha uma base genética, poderá afetar a competência vetorial de determinada espécie.

De um modo geral mais complexa e abrangente, a capacidade vetorial é definida em termos quantitativos e é influenciada por várias variáveis ambientais, comportamentais, celulares e bioquímicas que possam estimular a interação patógeno-vetor bem como a interação vetor-hospedeiro vertebrado, no qual o patógeno vai ser transmitido. Por exemplo, a capacidade vetorial vai depender, entre outras variáveis, da densidade populacional, da longevidade bem como da própria competência vetorial da espécie de mosquito (Beerntsen *et al.*, 2000).

Fatores ambientais e comportamentais podem ter um papel determinante na capacidade vetorial e conseqüentemente para incidência de determinada arbovirose em

humanos. Por exemplo, uma determinada espécie de mosquito pode ser geneticamente, celularmente e bioquimicamente suscetível e capaz para a infecção, multiplicação e transmissão de determinado vírus, mas se esta espécie de mosquito tem uma taxa de coexistência reduzida quer temporalmente, quer geograficamente com o hospedeiro vertebrado que mantém esse vírus, esta espécie de mosquito terá uma reduzida capacidade vetorial para aquele específico arbovírus (Beerntsen *et al.*, 2000).

Devido à grande extensão territorial do país e as diferenças climáticas entre municípios, é possível visualizar diferentes perfis comportamentais, de infestação por período, capacidade vetorial e níveis de resistência a inseticidas. As taxas de transmissão de arboviroses e a quantidade de pessoas expostas previamente a alguns dos vírus citados também varia por localidade resultando na baixa ou alta susceptibilidade da população humana a epidemias causadas por arbovírus (Rahman *et al.*, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

O *Aedes aegypti* é um mosquito reconhecido por ser o vetor primordial de muitos arbovírus patogênicos, incluindo dengue, zika, chikungunya e febre amarela. No Brasil, ele é reconhecido por ter grande competência vetorial para os arbovírus, especialmente para dengue.

A competência vetorial refere-se à capacidade do mosquito de adquirir, manter e transmitir um vírus ou parasita em seu corpo, o que está ligado à sua biologia, ecologia e comportamento. O conhecimento da importância que cada variável tem na competência vetorial, especialmente na competência vetorial intrínseca, de determinada população de *Ae. aegypti* em sua respectiva região geográfica, é crucial, podendo até ser determinante para combater a transmissão de arboviroses.

Estudos sobre a competência vetorial do mosquito *Ae. aegypti* ajudam a compreender como o vírus é adquirido, replicado e transmitido aos hospedeiros. Esses estudos também podem identificar fatores que aumentam a competência vetorial do mosquito e permitir a implementação de medidas preventivas mais direcionadas e eficazes e possibilitando o desenvolvimento de estratégias de controle das doenças transmitidas por esses mosquitos.

Em resumo, com o entendimento de como ocorre a dinâmica vírus/vetor/hospedeiro é possível chegar ao desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e prevenção e é essencial para a saúde pública.

3. OBJETIVO

3.1 GERAL

Analisar a competência vetorial para os vírus da dengue e da chikungunya, que são arbovírus de grande importância médica, em diferentes populações de mosquitos *Aedes aegypti* coletados nos municípios brasileiros de Araraquara/SP, Jaboticatubas/MG, Petrolina/PE, Porto Alegre/RS e Santos/SP.

3.2 ESPECÍFICOS

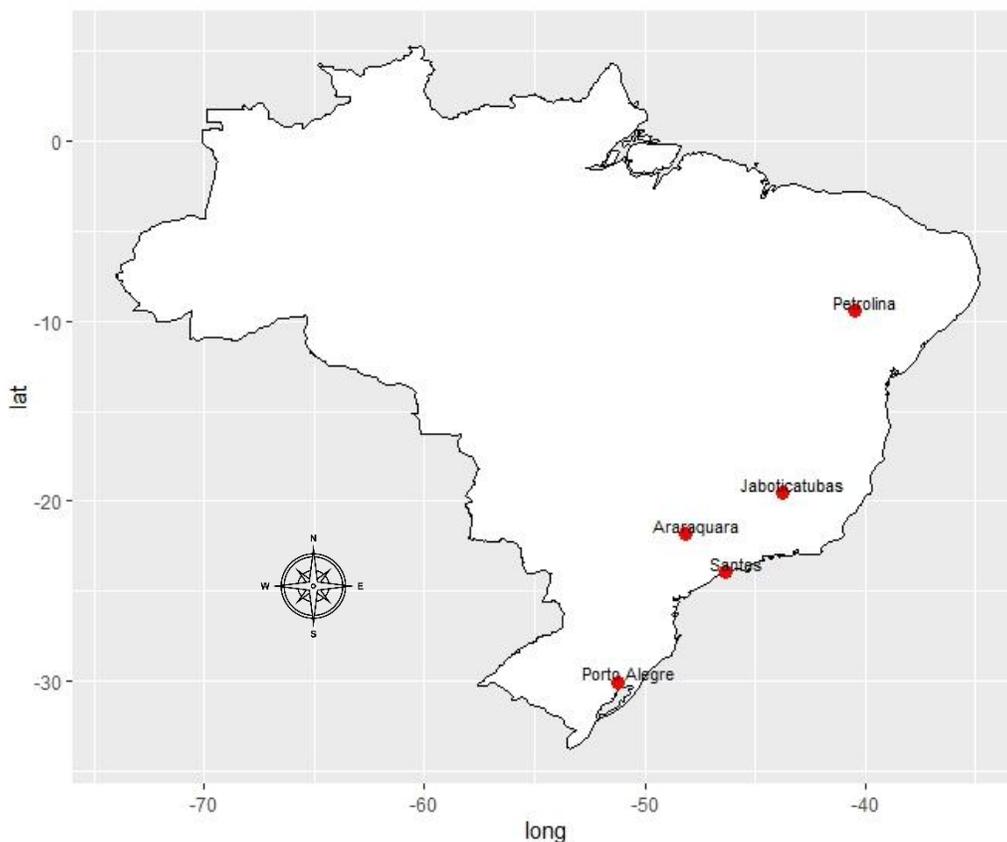
- Avaliar e comparar a taxa de infecção 4 e 8 dias após o repasto sanguíneo em camundongos infectados com CHIKV;
- Avaliar e comparar a eficiência de disseminação 4 e 8 dias após o repasto sanguíneo em camundongos infectados com CHIKV;
- Avaliar e comparar a eficiência de transmissão 8 dias após o repasto sanguíneo em camundongos infectados com CHIKV;
- Avaliar e comparar a taxa de infecção 4 e 8 dias após o repasto sanguíneo em camundongos infectados com dengue;
- Avaliar e comparar a eficiência de disseminação 4 e 8 dias após o repasto sanguíneo em camundongos infectados com dengue.

4. METODOLOGIA

4.1 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA

Foram selecionados municípios de 4 estados do país para comparar as populações de mosquitos encontrados no Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil (Figura 1). Esses municípios foram selecionados devido a suas diferenças nas taxas de incidência de casos humanos ao longo dos últimos anos, principalmente para dengue. Os municípios de Jaboticatubas/MG e Porto Alegre/RS possuem em seu histórico uma baixa incidência de notificação de casos de arboviroses, enquanto os municípios de Araraquara/SP, Petrolina/PE e Santos/SP possuem históricos de surtos e epidemias.

FIGURA 1 – Cidades em que ocorreram coletas de *Aedes aegypti*



4.1.1 Araraquara/SP

Araraquara está localizado no estado de São Paulo é um exemplo de município com elevado grau de prevalência de dengue. Araraquara tem uma população de 240.542 e sua área territorial de 1.003,625 km². Entre os anos de 2007 e 2015, cerca de 15.729 casos de dengue foram confirmados no município (Ferreira *et al.*, 2018).

De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, em 2019 foram registrados 4.540 casos de dengue em Araraquara, sendo que 1.682 foram confirmados. Já em 2020, houve um aumento significativo de casos, com 12.426 notificações e 5.760 casos confirmados.

Além disso, o município também registrou casos de outras doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*, como zika e chikungunya. Em 2019, foram registrados 18 casos de zika e 77 de chikungunya. Já em 2020, foram registrados 51 casos de zika e 19 de chikungunya.

4.1.2 Jaboticatubas/MG

A Região Metropolitana de Belo Horizonte é uma área urbana localizada no estado de Minas Gerais, que abrange 34 municípios e possui uma população estimada em cerca de 6,3 milhões de habitantes. É a terceira maior região metropolitana do país, atrás apenas de São Paulo e do Rio de Janeiro (IBGE, 2023).

Jaboticatubas é um município localizado no estado de Minas Gerais, na região metropolitana de Belo Horizonte que fica localizado a cerca de 60 quilômetros da capital Belo Horizonte. Com uma população estimada em cerca de 22 mil habitantes.

Em Belo Horizonte, nos anos de 2019, 2020 e 2021 foram registrados 21.286, 18.186 e cerca 5.500 casos de dengue, respectivamente, além de 530, 199 e 80 casos de Chikungunya e 426, 83 e 30 casos humanos de Zika nos anos 2019, 2020 e 2021, respectivamente. Já Jaboticatubas registrou em 2019 536 casos de dengue, 4 casos de chikungunya. Em 2020 foram 41 e 3 respectivamente e em 2021 41 e 4. Não há registro de casos notificados de zika no município (Brasil, 2023).

Devido à proximidade entre os municípios é esperado que as populações de *Aedes aegypti* de Belo Horizonte e Jaboticatubas não tenham diferenças significativas na sua capacidade vetorial.

4.1.3 Petrolina/PE

Petrolina é uma cidade localizada no estado de Pernambuco, no nordeste do Brasil. É a maior cidade do sertão pernambucano e está localizada às margens do Rio São Francisco, um importante rio brasileiro que abrange vários estados do país. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população de Petrolina em 2021 é de aproximadamente 348.093 habitantes. O município possui uma área de 4.095,1 km².

Infelizmente, o município de Petrolina, em Pernambuco, tem registrado um aumento significativo nos casos de dengue nos últimos anos. Em 2019, Petrolina, assim como outras cidades do país, também enfrentou um surto de dengue. De acordo com dados da Secretaria de Saúde de Pernambuco, foram notificados 3.021 casos de dengue no município naquele ano, o que representou um aumento significativo em relação aos anos anteriores. De acordo com dados da Secretaria de Saúde de Pernambuco, em 2020 foram notificados 2.356 casos de dengue em Petrolina, com uma taxa de incidência de 682,5 casos por 100 mil habitantes. Já em 2021, até o momento, a cidade já notificou 1.630 casos de dengue, o que representa um aumento de mais de 300% em relação ao mesmo período do ano anterior.

Em 2019, o município de Petrolina, assim como outras cidades do país, enfrentou um aumento no número de casos de chikungunya, uma doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, assim como a dengue e o zika vírus. De acordo com dados da Secretaria de Saúde de Pernambuco, em 2020 foram notificados 118 casos de chikungunya, com uma taxa de incidência de 34,2 casos por 100 mil habitantes. Em comparação com o mesmo período do ano anterior, houve uma redução de cerca de 70% no número de casos notificados. No entanto, em 2021, até o momento, o município já

registrou 293 casos de chikungunya, o que representa um aumento em relação ao mesmo período do ano anterior.

4.1.4 Porto Alegre/RS

Apesar da elevada eficiência de disseminação de dengue ao longo do território brasileiro, existem municípios em que os mosquitos *Ae. aegypti* estão presentes, mas a taxa de incidência de dengue é baixa, como por exemplo o município de Porto Alegre. Porto Alegre teve as primeiras confirmações de casos autóctones de dengue em seu território no ano de 2010.

Porto Alegre é a capital do estado do Rio Grande do Sul, localizada na região Sul do Brasil. De acordo com os dados mais recentes do IBGE, a população estimada do município é de aproximadamente 1.485.941 habitantes (2021). A extensão territorial do município de Porto Alegre, de acordo com dados do IBGE, é de aproximadamente 496,682 km². O município é delimitado pela Lagoa dos Patos ao leste, e faz divisa com os municípios de Viamão ao norte, Alvorada e Gravataí ao nordeste, Cachoeirinha ao leste, Canoas ao sul e Eldorado do Sul ao oeste.

De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), do Ministério da Saúde, Porto Alegre registrou casos de dengue nos últimos anos, sendo que o pico da doença ocorreu em 2016, quando foram registrados mais de 585 casos. Nos anos seguintes, houve uma redução no número de casos, com 33 em 2017, 16 em 2018. Em 2019 ocorreu o segundo maior registros de casos no município com um total de 551 casos prováveis para a doença. Em 2020, de acordo com dados da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, foram registrados 55 casos e 82 casos de dengue em 2021.

4.1.5 Santos/SP

Santos é uma cidade localizada no litoral do estado de São Paulo, com uma população estimada em 434.742 habitantes, de acordo com os dados do IBGE de 2021.

É a maior cidade do litoral paulista em termos de população e possui uma área de 280,7 km².

O município de Santos é um importante porto marítimo para o país, sendo o principal ponto de escoamento da produção do estado de São Paulo e um dos mais importantes do Brasil. A cidade tem uma das maiores atividades portuárias do mundo, movimentando milhões de toneladas de carga por ano.

Os primeiros focos da reintrodução de *Aedes aegypti* no Estado de São Paulo foram detectados em Santos na área portuária em 1980, sendo que as medidas de controle empregadas na época foram suficientes para a eliminação desse vetor. Na década de 90 foram registrados vários focos e o município passou a apresentar infestação domiciliar a partir de 1995 (Pereira, 2001).

Santos foi o primeiro município da região Baixada Santista a registrar a transmissão de dengue em 1997, totalizando 849 casos. Nesta região estão presentes características extremamente favoráveis ao vetor e à doença, tanto no que se refere ao clima como nas questões relacionadas a densidade populacional. Nos anos seguinte, exceto em 2000, houve um incremento significativo no número de casos, fazendo com que a município vivenciasse diversas epidemias da doença (Pereira, 2001).

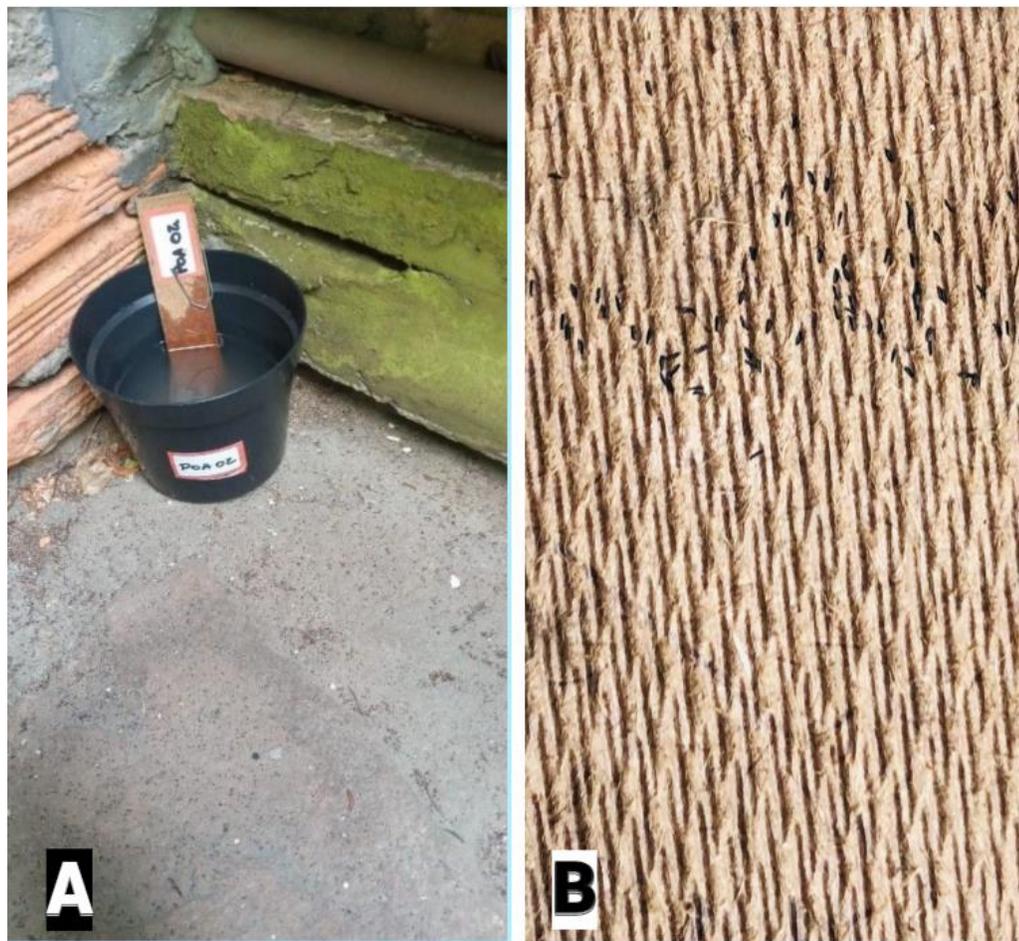
Em Santos, houve um aumento significativo de casos de dengue nas últimas décadas. De acordo com dados da Secretaria Municipal de Saúde, em 2019 foram notificados 12.234 casos de dengue na cidade, com 5 mortes confirmadas. Em 2020, houve uma queda no número de casos, com 933 notificações e 1 morte confirmada. E em 2021 os casos voltaram a crescer com um total de 8.961 notificados.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

Para coleta de ovos foram usadas armadilhas do tipo ovitrampa distribuídas em diversas áreas dos municípios a fim de verificar diferenças entre as populações. Essas armadilhas são compostas por palhetas de eucatex de 17cmx3cm e um recipiente preto de 9 cm de altura por 15 de diâmetro, em que é colocado 300 mL água e 1 mL de solução atraente que possui 0,04% de concentração de levedo de cerveja. A palheta ficou presa na armadilha com um clipe e com a parte áspera voltada para fora do recipiente (FIG. 2).

Cada palheta foi identificada com número, semana de coleta e município. As armadilhas foram instaladas no peridomicílio dos imóveis, a fim de atrair fêmeas do *Ae. aegypti* para oviposição. As vistorias foram realizadas semanalmente entre dezembro de 2021 a maio de 2022 e foram registradas a presença ou ausência de ovos nas armadilhas. Em caso de positividade, a palheta com ovos era substituída e encaminhada para o processo de secagem e envio para laboratório.

FIGURA 2: Armadilha ovitrampa instalada no peridomicílio em Porto Alegre



A: Fotografia de armadilha ovitrampa instalada no peridomicílio de um imóvel em Porto Alegre. B: Fotografia da parte áspera de uma palheta de eucatex contendo ovos de *Aedes* spp. **Fonte:** Produção do próprio autor, 2022

4.3 MANUTENÇÃO NO INSETÁRIO

Todos os mosquitos foram criados em condições controladas no insetário, a 28°C e 70-80% de umidade relativa, em um ciclo de luz/escurecimento de 12/12 horas.

As palhetas com ovos foram colocadas para eclosão em bacias com cerca de 2 litros de água e suplementada com comida de peixe (Tetramin, Tetra), e após a eclosão as larvas foram mantidas em uma densidade de 200 larvas por bandeja. As bacias foram identificadas com o nome da população e a data de eclosão. Após 2 dias, parte da água das bacias foi retirada, misturada e depois repartida entre as populações. Esse processo foi realizado para deixar a microbiota da água semelhante entre os meios. Para assegurar que não ocorresse mistura de larvas entre as populações, foi usado uma peneira para separação e ocorreu higienização com água em fervura entre uma bacia e outra. Esse processo foi repetido diariamente até a fase de pupa.

As pupas foram coletadas e colocadas em potes dentro de gaiolas de insetos com 30 cm x 30 cm x 30 cm (BugDorm) para que os mosquitos adultos pudessem emergir. Os mosquitos adultos foram alimentados com solução sacarose a 10% a vontade e fêmeas e machos foram mantidos juntos para possibilitar a cópula.

Como os ovos foram coletados em campo, foi necessário realizar uma triagem nos mosquitos adultos da geração F0 para separar indivíduos *Ae. aegypti* de *Ae. albopictus*. Essa separação foi feita de forma visual através da identificação do padrão de cerdas apresentado no tórax do mosquito. Os *Ae. albopictus* foram descartados, enquanto os *Ae. aegypti* fizeram o repasto sanguíneo em camundongos *swiss* para a oviposição em potes com papel filtro. Esses ovos foram eclodidos e usados nos experimentos.

A partir da geração F1, os mosquitos adultos com 4 a 7 dias de vida foram separados em 150 fêmeas de cada população e colocadas em gaiolas de insetos usadas para realizar o repasto sanguíneo em camundongos AG129 (IFN $\alpha/\beta/\gamma$ R^{-/-}) previamente inoculados com os vírus dengue ou chikungunya. Para aumentar a eficiência do repasto dos mosquitos selecionados, os potes contendo a solução de sacarose (10%) foram retiradas 12 horas antes da alimentação nos animais infectados.

4.4 INOCULAÇÃO EM MODELO MURINO AG129

Camundongos AG129 (IFN $\alpha/\beta/\gamma$ R^{-/-}) são deficientes para os genes dos receptores de IFN do tipo I e II, devido a isso são susceptíveis e sucumbem à infecção por DENV e CHIKV. Esse modelo é amplamente utilizado para o estudo de infecção por arboviroses (YAUCH *et al.*, 2010). Para o estudo foram utilizados camundongos AG129 de três a quatro semanas de idade que foram obtidos do biotério do Instituto René Rachou (IRR - Fiocruz Minas), Brasil foram usados para inoculação de DENV-1, já para a inoculação de CHIKV foram utilizados animais com oito a nove semanas de idade.

As alíquotas de vírus utilizadas para inoculação são das cepas foram DENV-1 (DENV-1/*H. sapiens*/Brasil/Contagem/MG/BRMV09/2015) isolada a partir de sangue humano em Contagem, MG, Brasil, em 2015. Para o CHIKV, utilizamos o isolado CHIKV/*H. sapiens*/Brasil/NT16/2018, que foi isolado a partir do soro de um paciente na cidade de Niterói, estado do Rio de Janeiro, em 2018. As alíquotas foram obtidas do estoque de vírus do laboratório de Mosquitos Vetores do IRR. Os animais receberam o inóculo de 10⁶ p.f.u de DENV ou de aproximadamente 10⁵ p.f.u de CHIKV pela via subcutânea. Os camundongos foram mantidos em instalações controladas de temperatura e umidade, em um ciclo de luz e escuridão de 12 horas, com água e comida à vontade.

4.5 INFECÇÃO DOS MOSQUITOS COM ARBOVÍRUS

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos AG129 machos. Após 2 dpi para CHIKV e 3 dpi para DENV-1, os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg /kg) + cloridrato de xilazina (8 mg /kg) e colocados em cima da tela de alimentação por cerca de uma hora por gaiola. Para garantir que a taxa de infecção nos camundongos não influenciasse os resultados das taxas de infecção e disseminação dos vírus nos mosquitos, foi utilizado apenas um camundongo por experimento para alimentar as fêmeas separadas das 5 populações.

Logo após a alimentação, as fêmeas que completaram o repasto sanguíneo foram separadas em gaiolas e mantidas no infectório em temperatura 28°C e 70-80% de

umidade relativa com de solução de sacarose a 10% a vontade para alimentação. Após o repasto sanguíneo, os camundongos infectados sofreram eutanásia por deslocamento cervical.

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais, Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz (CEUA), e realizados de acordo com as diretrizes institucionais, número de licença LW-26-20 com validade até 28 de setembro de 2024.

4.6 COLETA E DISSECAÇÃO

Após 4 dias pós-infecção (dpi) e 8 dpi, 22 fêmeas de mosquito *Ae. aegypti* de cada população foram selecionadas para sacrifício e dissecação. No processo de dissecação foram separadas o intestino médio e a carcaça (sendo todos os tecidos exceto o intestino médio). As amostras de intestino médio foram usadas para analisar as taxas de infecção e as de carcaça foram usadas para analisar as taxas de disseminação. Os órgãos foram colocados em tubos de 1,5 µL contendo Trizol com beads de vidro, macerados no bead-beater por 1 minuto e 30 segundos e armazenados no freezer -80°C até o processo de extração de RNA.

4.7 TRANSMISSÃO DO CHIKV DE MOSQUITOS PARA CAMUNDONGOS AG129

Para avaliar a eficiência de transmissão do CHIKV pelas populações de mosquitos, primeiro alimentamos mosquitos fêmeas de cinco a sete dias de idade em camundongos AG129 viremicos. Oito dias após a infecção, permitimos que os mosquitos fêmeas se alimentassem de camundongos AG129 anestesiados, não infectados, com duas a três semanas de idade. Uma mosquita fêmea foi exposta a cada camundongo AG129 por 30 minutos, e após a alimentação de sangue, as fêmeas completamente ingurgitadas foram selecionadas e coletadas individualmente para extração de RNA para quantificação do arbovírus. Três dias após os camundongos AG129 serem expostos aos mosquitos, o sangue foi coletado para a quantificação do arbovírus por RT-qPCR.

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração do RNA foi feita segundo o protocolo indicado pelo fabricante do reagente de TRIzol® (Invitrogen), com adaptações feitas segundo o Procedimento Operacional Padrão de número 18 do laboratório de Mosquitos Vetores do IRR.

As amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Foram adicionados 40µL de clorofórmio e vortexado em velocidade máxima por 15 segundos e incubado por mais 5 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas em 12.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (~100µL) gerado pela separação de fases foi transferido para um tubo novo contendo 2µL de glicogênio e vortexado por 10 segundos a 1.500rpm.

A precipitação do RNA foi realizada transferindo-se 100µL de isopropanol gelado (4°C) e misturando as amostras. As amostras foram então incubadas a overnight a -20°C e em seguida centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4°C, formando o pellet contendo o precipitado de RNA.

Em seguida, o RNA foi lavado removendo o sobrenadante invertendo o tubo e adicionando 1mL de etanol 75% para lavar o pellet (feito com água RNase free). As amostras foram vortexadas por 15 segundos a 1.500rpm e centrifugadas a 7.500g por 5 minutos a 4°C. O tubo foi vertido para remover o sobrenadante e centrifugado a 7.500g por 1 minuto a 4°C.

Por fim, o RNA foi ressuspensão removendo-se todo o líquido com uma ponteira de 200µL sem remover o pellet. O tubo foi deixado aberto de cabeça para baixo em superfície limpa para secagem, até que o pellet obtesse a aparência gelatinosa. O pellet de RNA foi então ressuspensão em 10µL de água RNase free, incubado no gelo por pelo menos 15 minutos e armazenado em freezer -80°C para a síntese de cDNA.

4.9 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A partir do RNA extraído, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando placas de 96 poços. Primeiramente, é preparada a Mix-1, que consiste em 1,0 µL de primers (300 ng/µL) e 7,0 µL de água nuclease-free por amostra. Em seguida, 10

μL da Mix-1 é adicionada em cada poço da placa, seguida por 2,0 μL de RNA total em cada poço. A placa é então incubada a 70°C por 10 minutos em um termociclador e depois colocada em gelo por 10 minutos.

O Mix-2 consiste em 4,0 μL de Buffer T5X, 1,25 μL de mix de dNTPs (10 mM), 2,0 μL de DTT (0,1 mM), 1,0 μL de Transcriptase e 1,75 μL de água nuclease-free. Em seguida, adiciona-se 10 μL da Mix-2 em cada amostra contendo a Mix-1 e RNA total e a placa foi colocado no centrifugador para misturar as soluções.

A placa é incubada a 42°C por 60 minutos para que ocorra a síntese de cDNA. Após esse tempo, ocorre a inativação da Transcriptase Reversa a 70°C por 15 minutos. A placa é então removida do termociclador e o cDNA é diluído em água de injeção na proporção de 1 para 10. Por fim, o cDNA é armazenado a -20°C até o uso posterior.

4.10 REALIZAÇÃO DE RT-qPCR

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata utilizando o sistema QuantStudio 12K Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e as amplificações foram realizadas usando o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems—Life Technologies, Foster City, CA, EUA). O volume final da reação foi de 10 μL . A carga de RNA viral foi expressa em relação ao gene de controle endógeno RPL32, para *Ae. aegypti*.

As condições de ciclagem térmica foram compostas pelas etapas: “Hold stage” (aquecimento rápido a 95 °C, espera por 20 segundos); “PCR stage” (40 ciclos de 95 °C, espera por 15 segundos, aquecimento rápido a 60 °C, espera por 60 segundos) e “Melt stage” (aquecimento rápido a 95 °C, espera por 15 segundos, aquecimento rápido a 60 °C, espera por 1 minuto, aquecimento lento de 0,05 °C/segundos até 95 °C, espera por 15 segundos). A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2\Delta\text{Ct}$, conforme previamente descrito por Olmo *et al.* (2018). A carga de RNA viral foi expressa em relação ao gene de controle endógeno RPL32, para *Ae. aegypti* e RPL32 para camundongos AG129.

Para *Ae. aegypti*, os iniciadores RPL32 foram: Forward: 5' -AGC CGC GTG TTG TAC TCT G-3' e Reverse: 5' -ACTTCT TCG TCC GCT TCT TG-3'. Para camundongo, os

iniciadores para RPL32 foram: Forward: 5' -GCTGCC ATC TGT TTT ACG G-3' e Reverse: 5' -TGA CTG GTG CCT GAT GAA CT-3'. Para CHIKV, os iniciadores foram: Forward: 5' -AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G-3' e Reverse: 50 -CCA AATTGT CCY GGT CTT CCT-3'. Para DENV-1, os iniciadores foram: Forward: 5'-TCG GAA GCT TGC TTA ACG TAG-3' e Reverse: 5'-TCC GTT GGT TGT TCA TCA GA-3'.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R v4.2.3 (www.r-project.org). Foram avaliadas em cada grupo a Taxa de infecção (número de intestino médio positivo/mosquitos testados), a eficiência de disseminação (número de carcaça positiva/mosquitos testados) e a eficiência de transmissão (camundongos infectados/camundongos testados).

Para comparar as taxas de infecção, eficiência de disseminação e transmissão, foram conduzidas análises de regressão logística para avaliar a associação entre a variável preditora (as diferentes populações de *Ae. aegypti*) e a variável de resultado binária (status de infecção). Utilizou-se um modelo de Modelo Linear Generalizado (GLM) com o argumento de família definido como "binomial" e a função de ligação como "logit", seguido de testes de razão de verossimilhança χ^2 .

Para comparar as diferenças nas cargas virais nas amostras de intestino médio e carcaça entre as populações de mosquitos, foi realizado um teste de Kruskal-Wallis, seguido de um teste post-hoc (teste de Dunn) para determinar as diferenças em pares entre os grupos. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 COMPETÊNCIA VETORIAL *Aedes aegypti* PARA CHIKV

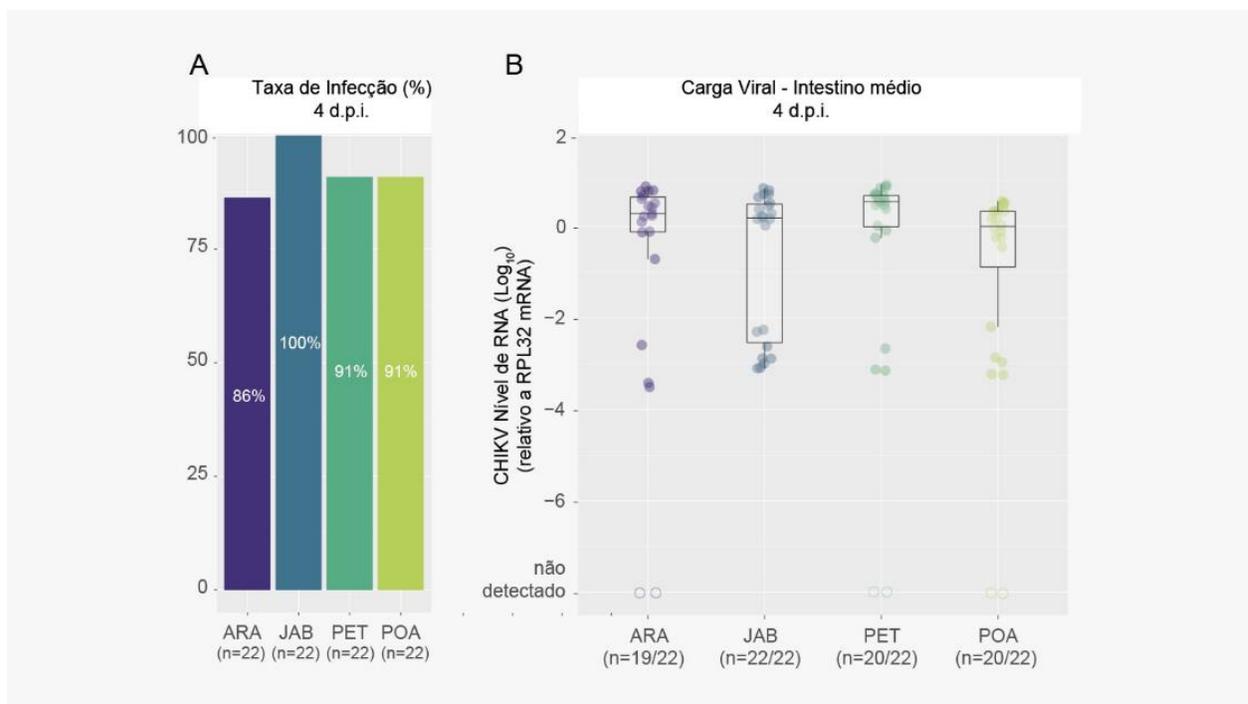
Para realizar o estudo foram utilizadas populações de *Ae. aegypti* de quatro regiões: Araraquara/SP, Jaboticatubas/MG, Petrolina/PE e Porto Alegre/RS. Os mosquitos foram coletados 4 e 8 dias pós-infecção (dpi), dissecados em intestino médio e carcaça. Para avaliar a taxa de infecção foi avaliada a presença de CHKV, por RT-qPCR, no intestino médio de cada mosquito individualmente. Enquanto para avaliar a eficiência de disseminação foi avaliada a presença de CHKV, por RT-qPCR, nas carcaças de cada mosquito individualmente. As taxas de infecção, que foram calculadas como a proporção de fêmeas que testaram positivo para o vírus no intestino médio em relação ao número total de fêmeas ingurgitadas após a exposição a camundongos infectados. Para a eficiência de disseminação dos vírus nos mosquitos, calculamos a proporção de fêmeas que testaram positivo para o vírus na carcaça (corpo excluindo o intestino médio) em relação ao número total de fêmeas ingurgitadas após a exposição a camundongos infectados. Já para avaliar a eficiência de transmissão foi calculada a porcentagem de mosquitos que foram capazes de infectar o camundongo após um segundo repasto sanguíneo em relação ao número total de mosquitos alimentados com sangue.

5.1.1 Taxa de infecção para CHIKV

Nas figuras 3-A e 4-A, é possível avaliar que as amostras analisadas de intestino médio demonstraram uma taxa de infecção com alguma variação para o arbovírus nas populações estudadas tanto em 4 dpi, quanto em 8 dpi. As populações que demonstraram as maiores taxas de infecção foram Jaboticatubas com 100% de infecção em 4 dpi, e Araraquara com 95% de infecção em 8dpi. As amostras das populações de Porto Alegre e Petrolina também demonstraram uma alta taxa de infecção pelo arbovírus com 91% para as duas populações em 4 dpi e 82% e 86%, respectivamente, em 8 dpi. A população com a menor taxa de infecção para o vírus foi Porto Alegre nos dois tempos analisados.

Na figura 3-B, é possível observar que as populações Araraquara, Petrolina e Porto Alegre apresentaram dados “outliers” bem como amostras sem detecção da carga viral. A população de Jaboticatubas possui a maior variabilidade de carga viral comparado as outras populações, seguido por Porto Alegre. As taxas máximas de carga viral foram semelhantes entre as populações, porém a mediana da população de Petrolina foi a mais alta em comparação as outras populações. Porém, é possível perceber que a carga viral entre as populações não é significativamente diferente.

FIGURA 3: Taxa e carga identificadas no intestino em 4dpi - CHIKV

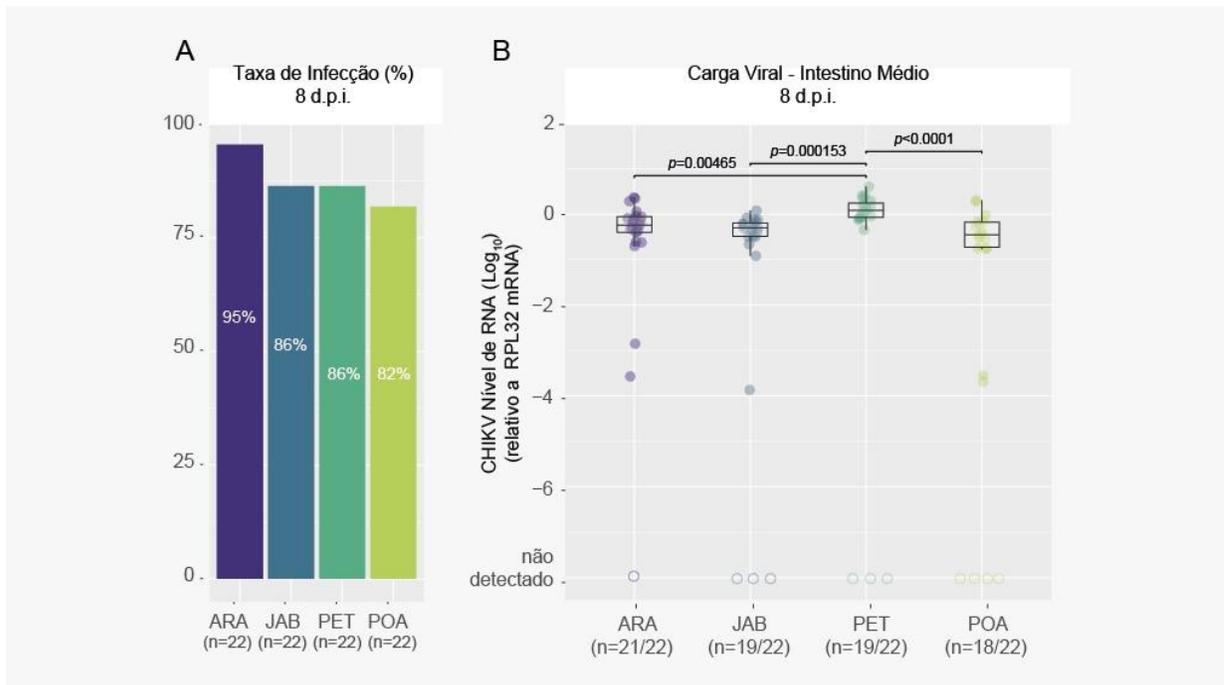


A: Gráfico de colunas demonstrando as diferenças nas taxas de infecção entre as populações para o arbovírus CHIKV em 4dpi. A população de Jaboticatubas demonstrou 100% de taxa de infecção em 4 dias-pós-infecção, além disso as outras populações demonstraram infecção acima de 85%. **B:** Gráfico demonstrando as diferenças entre a carga viral de CHIKV entre as populações em 4 dpi para as amostras de intestino. A população de Jaboticatubas possui a maior variabilidade de carga viral comparado as outras populações, seguido por Porto Alegre. As taxas máximas de carga viral foram semelhantes entre as populações, porém a mediana da população de Petrolina foi a mais alta em comparação as outras populações.

Já na figura 4-B, é possível ver que os dados possuem pouca variabilidade entre elas, mas que existe diferenças significativas entre as populações de Araraquara e

Petrolina ($p=0,00465$), Jaboticatubas e Petrolina ($p=0,000153$) e Petrolina com Porto Alegre ($p=0,001$). Demonstrando que Petrolina possui uma carga viral significativamente maior em relação as outras populações em 8 dpi.

FIGURA 4: Taxa e carga identificadas no intestino em 8dpi - CHIKV



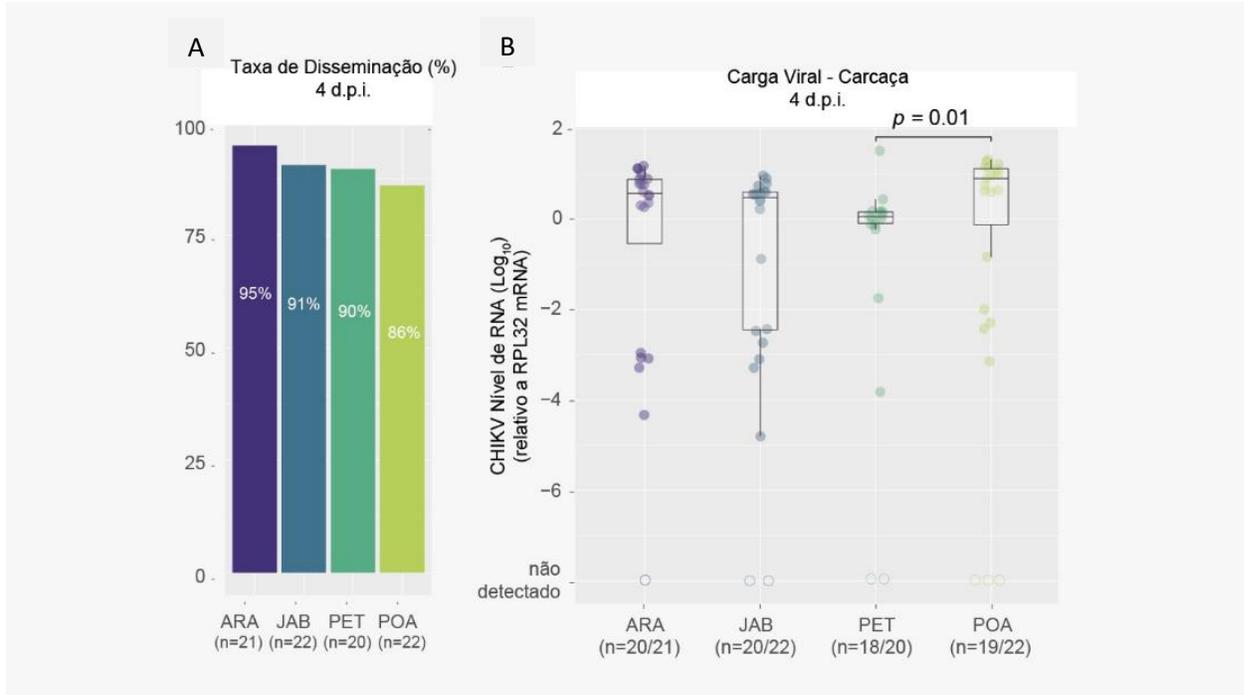
A: Gráfico de colunas demonstrando as diferenças nas taxas de infecção entre as populações para o arbovírus CHIKV em 8dpi. A população de Araraquara apresentou a maior taxa de infecção (95%) enquanto as outras populações tiveram taxas de infecção maiores que 80% em 8 dias pós infecção **B:** Gráfico demonstrando as diferenças entre a carga viral de CHIKV entre as populações em 8 dpi para as amostras de intestino. A população de Petrolina teve diferenças significativas quando comparado a mediana das cargas virais das outras populações, demonstrando uma carga viral maior.

5.1.2 Eficiência de disseminação para CHIKV

Nas figuras 5-A e 6-A, é possível avaliar que as amostras analisadas de carcaça demonstraram uma taxa variada de infecção para o arbovírus nas populações estudadas em 4 dpi, mas mais semelhante em 8 dpi. As populações que demonstraram as maiores taxas de disseminação foi Araraquara com 95% de infecção em 4 dpi. Já em 8 dpi, Araraquara, Jaboticatubas e Petrolina apresentaram a mesma taxa de 91% de

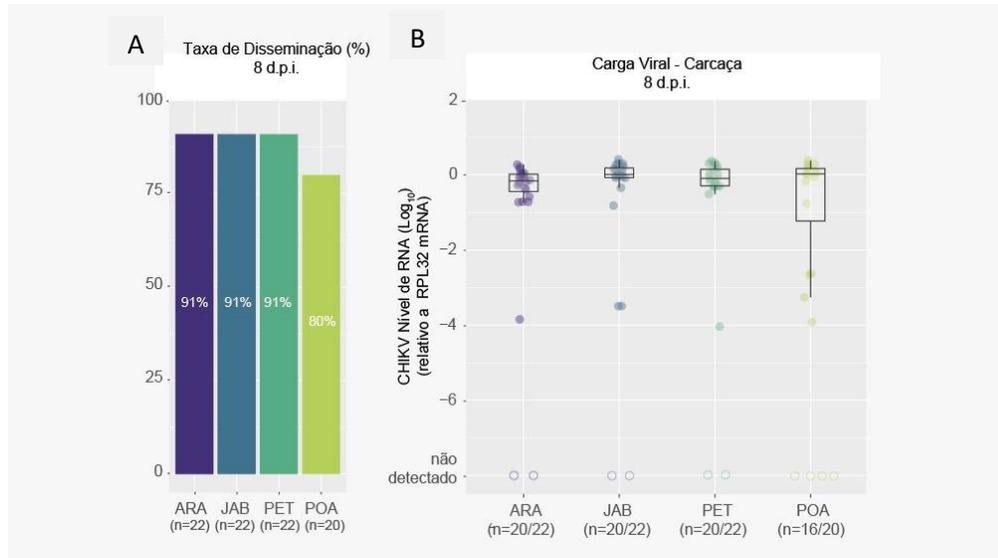
disseminação. As amostras de Porto Alegre demonstraram a menor eficiência de disseminação tanto em 4 dpi, quanto em 8 dpi.

FIGURA 5: Taxa e carga identificadas em carcaça em 4dpi - CHIKV



A: Gráfico de colunas demonstrando as diferenças nas taxas de disseminação entre as populações para o arbovírus CHIKV em 4dpi. A população de Araraquara apresentou disseminação de 95% enquanto as outras populações apresentaram taxas acima de 85%
B: Gráfico demonstrando as diferenças entre a carga viral de CHIKV entre as populações em 4 dpi para as amostras de carcaça. As populações de Petrolina e Porto Alegre apresentaram diferenças significativas na carga viral, sendo que POA possui maior carga viral entre as duas linhagens.

Na figura 5-B é possível observar que todas as populações apresentaram dados outliers bem como amostras sem detecção da carga viral. A população de Jaboticatubas possui a maior variabilidade de carga viral comparado as outras populações, seguido por Araraquara e Porto Alegre. Já Petrolina apresentou a menor variabilidade de carga viral entre as amostras analisadas. As taxas máximas de carga viral foram semelhantes entre as populações, porém foram significativamente diferentes entre Petrolina e Porto Alegre ($p=0,01$).

FIGURA 6: Taxa e carga identificadas em carcaça em 8dpi - CHIKV

A: Gráfico de colunas demonstrando as diferenças nas taxas de disseminação entre as populações para o arbovírus CHIKV em 8dpi. Todas as populações tiveram taxas de infecção acima de 80%, sendo que Porto Alegre foi a linhagem que apresentou menor disseminação **B:** Gráfico demonstrando as diferenças entre a carga viral de CHIKV entre as populações em 8 dpi para as amostras de carcaça. As quatro linhagens apresentaram carga viral semelhantes.

Já na figura 6-B, é possível ver que a maioria das populações possuem pouca variabilidade em relação a carga viral de suas amostras, excetuando Porto Alegre. Além disso, os dados não demonstraram diferenças significativas ao realizar a comparação entre as populações e sua carga viral. Os valores mais altos de carga viral e os valores de mediana foram bem próximos entre as populações.

5.1.3 Eficiência de transmissão para CHIKV

Para avaliar a eficiência na disseminação do CHIKV, um mosquito infectado com o vírus foi colocado para picar um camundongo não infectado. O sangue desse camundongo foi avaliado dois dias pós infecção. As linhagens de Araraquara foi a que apresentou a maior eficiência de transmissão (80%), seguido por Jaboticatubas (75%), Porto Alegre (73%) e Petrolina (67%) (FIG. 7).

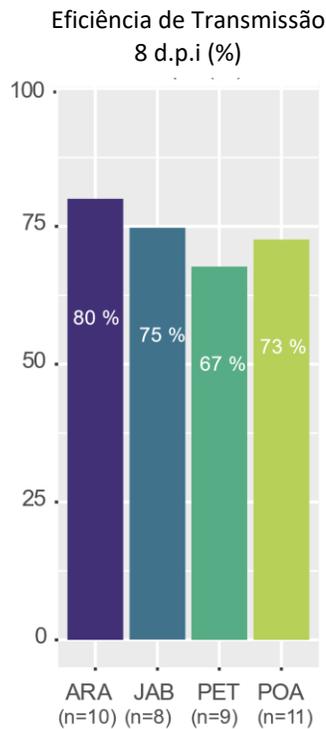
FIGURA 7: Eficiência de transmissão de CHIKV em 8dpi

Gráfico demonstrando as diferenças entre as taxas de transmissão de CHIKV entre as populações em 8 dpi. Todas as populações transmitiram vírus CHIKV para os camundongos, a menor taxa apresentada foi da linhagem de Petrolina (67%) e a maior foi a de Araraquara (80%).

5.2 COMPETÊNCIA VETORIAL *Aedes aegypti* PARA DENV

Para realizar o estudo foram utilizados *Ae. aegypti* de cinco populações: Araraquara/SP, Jaboticatubas/MG, Petrolina/PE, Porto Alegre/RS e Santos/SP. Os mosquitos foram coletados 4 e 8 dias pós-infecção (dpi), dissecados em intestino médio e carcaça. Foram avaliados a taxa de infecção, eficiência de disseminação bem como a carga viral de cada uma das partes dissecadas.

5.2.1 Taxa de infecção para DENV

Na figura 8, referente a infecção em 4 dpi, é possível avaliar que as amostras analisadas de intestino médio demonstraram uma taxa variada de infecção para o arbovírus nas populações estudada. As populações que demonstraram as maiores taxas

de infecção foram Jaboticatubas com 85,71% e Araraquara com 73,33%. As amostras das populações de Porto Alegre (33,33%) e Santos (47,62%) demonstraram a menor taxa de infecção.

Em relação a 8 dpi, como podemos observar na figura 9 houve um aumento na taxa de infecção para a maioria das populações em relação a 4 dpi. Podemos observar que Araraquara atingiu 100% de taxa de infecção em 8dpi e Jaboticatubas apresentou a segunda maior taxa com 87,5% seguido por Porto Alegre (66,7%), Petrolina (63,6%) e Santos (52,4%).

FIGURA 8: Taxa de infecção no intestino em 4dpi

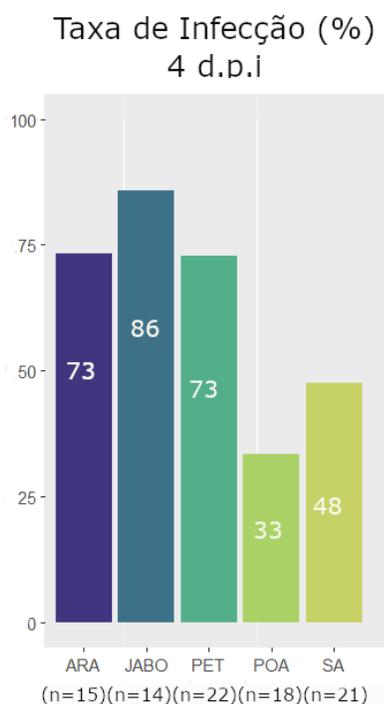
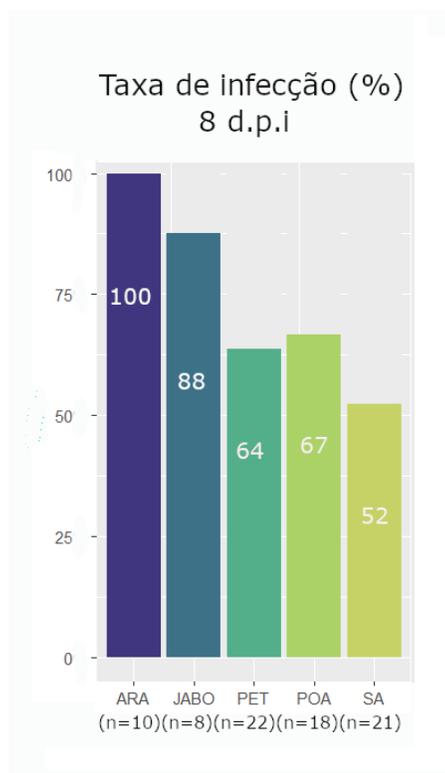


FIGURA 9: Taxa de infecção no intestino em 8dpi



Gráficos demonstrando as diferenças entre as taxas de infecção de DENV entre as populações em 4 e 8 dpi. Na figura 8, Jaboticatubas demonstra a maior taxa de infecção, enquanto Porto Alegre a menor. Já na figura 9, a linhagem Araraquara já apresenta 100% de infecção no intestino enquanto Santos representa a menor taxa de infecção.

5.2.2 Eficiência de disseminação para DENV

Na figura 10, é possível avaliar que as amostras analisadas de carcaça também demonstraram uma taxa variada de infecção para o arbovírus nas populações estudadas em 4 dpi. As populações que demonstraram as maiores taxas de disseminação foram Jaboticatubas com 31,2% e Petrolina com 20%. A população que apresentou a menor eficiência de disseminação em 4dpi foi Porto Alegre (4,8%).

FIGURA 10: Eficiência de disseminação – carcaça - 4dpi

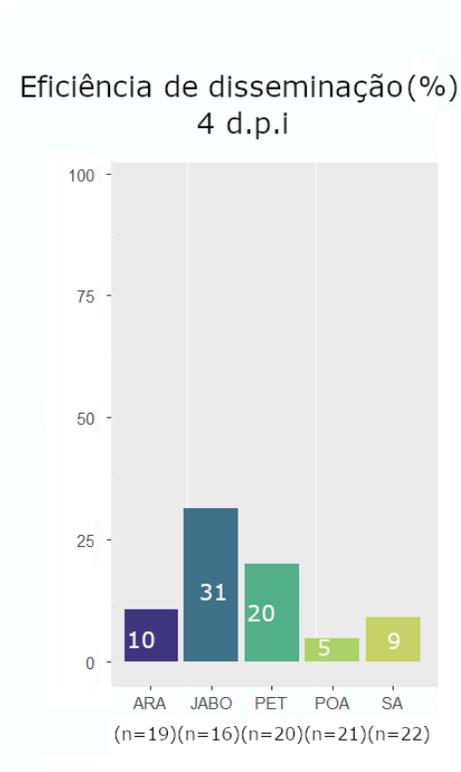
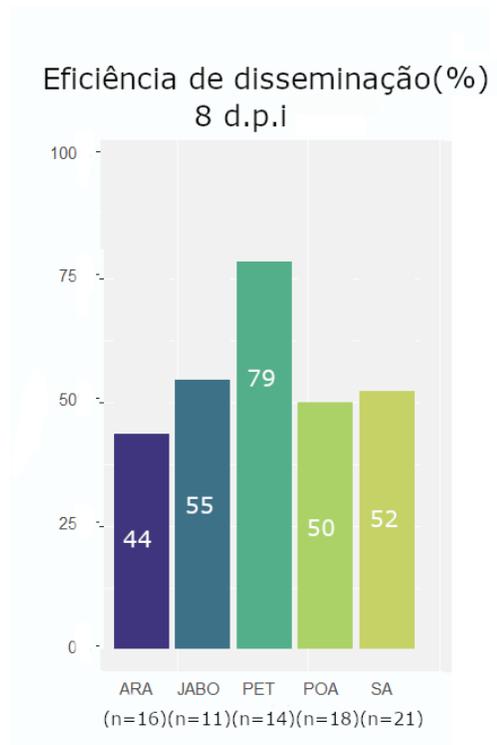


FIGURA 11: Eficiência de disseminação – carcaça – 8 dpi



Gráficos demonstrando as diferenças entre as eficiências de disseminação de DENV entre as populações em 4 e 8 dpi. Na figura 10, Jaboticatubas demonstra a maior eficiência de disseminação, enquanto Porto Alegre a menor. Já na figura 11, a linhagem de Petrolina apresenta 79% de disseminação na carcaça enquanto Porto Alegre representa a menor taxa de infecção com 50%.

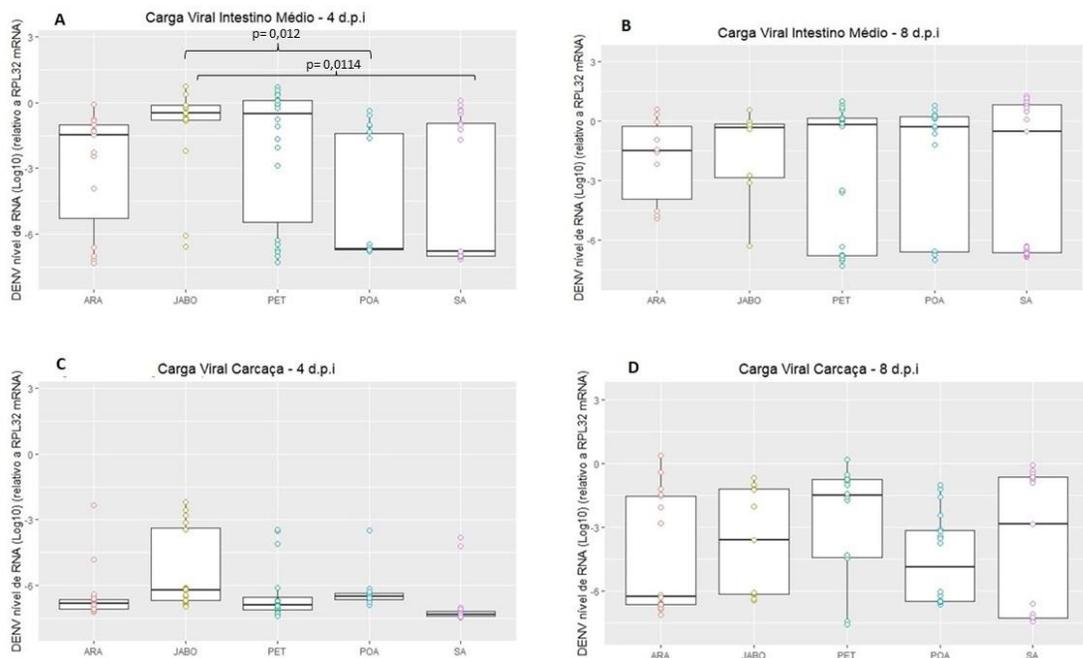
Na figura 11, é possível avaliar que as amostra de carcaça em 8dpi tiveram maior taxa de infecção que as de 4 dpi e que a população de Petrolina foi a que apresentou a maior eficiência de disseminação com 78,6% das amostras positivas. Porto Alegre,

Santos, e Jaboticatubas ficaram com valores próximos a 53% e Araraquara apresentou o menor valor com 43,8%.

5.2.3 Carga Viral para DENV

Na figura 12 é mostrada a carga viral em cada tecido para 4 e 8 dpi. Na figura A, é possível ver que, em 4dpi – no intestino médio, a linhagem Jaboticatubas foi a que apresentou menor variabilidade na carga viral entre as amostras. Em B, Jaboticatubas manteve a menor variabilidade e as medianas entre os municípios foram mais próximas, excetuando Araraquara que apresentou cargas virais menores nas amostras. Em C, a maior parte das amostras não possuiu carga viral para análise, sendo que na maior parte o vírus não foi detectado ($\text{Log}_{10} > -5$). Em D, as amostras de Porto Alegre demonstraram menor variabilidade entre elas, porém todas as populações apresentaram cargas virais diferentes. Nos 4 gráficos é possível ver que a carga viral entre as populações foi bem próxima, e só foi possível identificar valores estatisticamente diferente no intestino médio a 4 dpi nas populações de Jaboticatubas e Porto Alegre ($p=0,012$) e entre Jaboticatubas e Santos ($p=0,0114$).

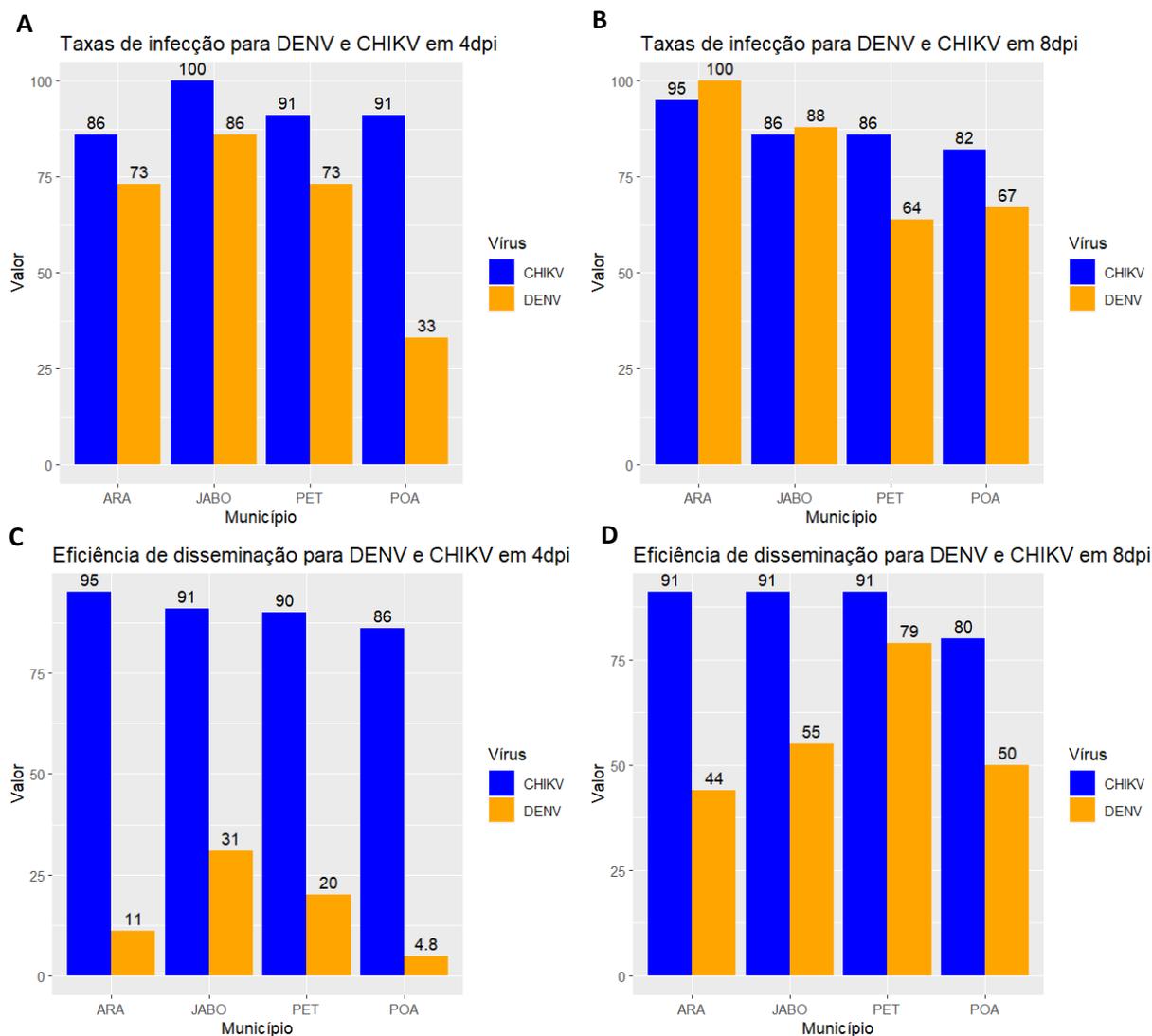
FIGURA 12: Carga Viral DENV



Gráficos demonstrando as diferenças entre as cargas virais de DENV entre as populações em 4 e 8 dpi. **A:** A carga viral no intestino médio em 4 dpi teve diferença significativa entre as populações de Porto Alegre e Santos quanto comparado com as cargas virais de Jaboticatubas, essa apresentou uma taxa maior do que as outras linhagens. **B:** Em 8 dpi, as cargas virais no intestino médio foram semelhantes em todas as linhagens. **C:** Em 4dpi, não foi possível avaliar as diferenças na carga viral das populações devido ao baixo número de amostras infectadas.

5.3 COMPETÊNCIA VETORIAL ENTRE DENV E CHIKV

Ao comparar os resultados encontrados para CHIKV e DENV, é possível observar que tanto as taxas de infecção bem como a eficiência de disseminação em 4 dpi foram maiores para CHIKV. Isso demonstra a capacidade do vírus de entrar e propagar-se no organismo com maior rapidez que as amostras de DENV. Já em 8 dpi, as taxas de infecção foram bem próximas não mostrando diferença significativa entre os vírus. Porém, a eficiência de disseminação do vírus CHIKV foram maiores que de DENV em 8 dpi. Isso demonstra que todas as populações possuem competência vetorial alta para ambos os vírus, mas o CHIKV apresenta uma capacidade de disseminar nos mosquitos mais rapidamente quando comparado com DENV (FIG. 13).

FIGURA 13: Taxas de infecção e disseminação para DENV e CHIKV

A e B: Gráfico de colunas demonstrando as diferenças nas taxas de infecção entre as populações e arbovírus. No gráfico A é possível ver que as taxas de infecção em 4dpi são maiores para o vírus chikungunya em todas as linhagens em B é possível ver que na população de Araraquara e Jaboticatubas em 8dpi a infecção de dengue já é maior. **C e D** Gráfico de colunas demonstrando as diferenças na eficiência de disseminação entre as populações e arbovírus. Tanto em 4 d.p.i, quanto em 8 d.p.i é possível ver uma maior velocidade de disseminação nas populações quando infectadas com vírus chikungunya.

6. DISCUSSÕES

6.1 ESTUDOS DE COMPETÊNCIA VETORIAL DE CULICÍDEOS PARA CHIKV

No Brasil o mosquito *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor de transmissão do arbovírus chikungunya. Porém, em outras partes do mundo diversos outros Culicídeos são estudados como vetores principais ou potências do vírus. Estudos como o de Gloria-Soria *et al.* (2020) realizado no nordeste dos Estados Unidos identificou que os mosquitos *Aedes albopictus* foram altamente susceptíveis à infecção por CHIKV (>70% - 4dpi). Já as taxas de disseminação ficaram maiores ao passar do tempo atingindo mais de 80% após 7 dpi. A partir do 4 dpi foram encontrados vírus na saliva, indicando uma eficiência de transmissão de 0% a 28% durante todo o experimento. *Ae. bromeliae* e *Ae. vittatus* foram estudados no Kenya (Musili, 2021) para verificar a potencial transmissão do vírus em ambiente rural e os dados mostram que o *Ae. vittatus* foi altamente suscetível ao vírus, com taxas de infecção variando de 75% a 90% e taxas moderadas de disseminação e transmissão variando de 35% a 50%. *Ae. bromeliae* apresentou suscetibilidade moderada, com taxas de infecção variando de 26% a 40% e taxas moderadas de disseminação e transmissão variando de 27% a 55%. Já no Brasil, além de pesquisas com o *Ae. aegypti*, foi identificado o vírus CHIKV em *Ae. fluviatilis*, *Ae. albopictus* e *Wyeomyia bourrouli* coletados em campo no município de Natal no Rio Grande do Norte. Porém, esse resultado não é o suficiente para indicar que esses mosquitos possuem a capacidade de replicar e transmitir o vírus (Ximenes *et al.* 2020).

Estudos em diversas partes do mundo demonstram a eficácia do *Ae. aegypti* em se infectar, disseminar e replicar o vírus em seu organismo, além de transmitir o vírus com sucesso. Mosquitos coletados na Austrália demonstraram 92% de taxa de infecção e disseminação e 64% para transmissão, esse resultado mostra o papel importante que esse mosquito teve na transmissão urbana da doença no país (Van Den Hurk *et al.*, 2010).

Na América, um estudo realizado por Vega-Rúa *et al.* (2014) demonstrou que os mosquitos de 10 países (Estados Unidos, México, Panama, Venezuela, Brasil, Peru, Bolívia, Paraguay, Uruguay e Argentina) possuem altas taxas de eficiência na

disseminação para três isolados diferentes de CHIKV, com taxas variando entre 90% a 100%. Nesse mesmo estudo foram estudados 10 municípios brasileiros (Manaus/AM, Santarém/PA, Parnamirim/RN, Campos Belos/GO, Belford Roxo/RJ, Vaz Lobo/RJ, Jurujuba/RJ, Paquetá/RJ, Santos/SP e Campo Grande/MS), todos demonstraram taxas de disseminação acima de 93% em 7 dpi e acima de 96% em 10 dpi e as taxas de transmissão variaram entre 30% a 70%. Apesar desse estudo indicar que as populações brasileiras de *Ae. aegypti* apresentam uma elevada competência vetorial, não foram usados isolados locais de CHIKV.

Apesar de já terem sido identificadas duas linhagens de CHIKV, a linhagem Asiática e a linhagem ECSA (do inglês East-Central-South-African), estudos recentes demonstraram que a linhagem ECSA é a mais prevalente no território brasileiro. Com objetivo de avaliar a competência das populações brasileiras de *Ae. aegypti* para genótipos representativos da situação recente da epidemiologia da Chikungunya no Brasil, neste estudo foi usado um isolado CHIKV de 2018 de um paciente de Niterói pertencente à linhagem ECSA. Nesse sentido, foi possível verificar que o *Ae. aegypti* de populações brasileiras possuem uma grande capacidade de se infectar e disseminar o vírus desta linhagem de chikungunya. As pequenas variações encontradas entre as populações estudadas podem estar relacionadas a bases genéticas intrínsecas a cada população de *Ae. aegypti*, bem como outros fatores como a presença de outros patógenos ou mesmo simbioses. A elevada competência vetorial, incluindo alta eficiência de transmissão para um hospedeiro vertebrado, encontradas no nosso estudo podem explicar como que a linhagem ECSA de CHIKV se espalhou rapidamente pelos territórios brasileiros, bem como entender melhor a epidemiologia deste vírus que vem produzindo epidemias importantes em diversas cidades do país.

6.2 ESTUDOS DE COMPETÊNCIA VETORIAL DE CULICÍDEOS PARA DENV

O dengue vírus é encontrado em diversos países tropicais e subtropicais, e os mosquitos mais comumente associados como vetor desses arbovírus são o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. A diferença na importância de determinado vetor na transmissão dessa doença está associada a distribuição desses mosquitos e a taxa de

infestação na região. Historicamente no Brasil, o mosquito considerado vetor principal da doença é o *Aedes aegypti* devido sua abundância e presença no meio urbano. Porém, em algumas cidades do país é possível encontrar o *Aedes albopictus* em áreas rurais e/ou em fragmentos de matas no ambiente urbano. Em um estudo realizado em uma área urbana no município de Linhares, Rezende *et al.* (2020) encontraram *Aedes albopictus* infectados com Dengue e Zika Vírus durante um surto da doença na região, um dado importante demonstrando que a vigilância a esse mosquito fará grande diferença no futuro das transmissões de arbovírus.

O ciclo complexo de transmissão da dengue é influenciado por vários fatores, e um deles é a capacidade do *Aedes aegypti* em transmitir o vírus da dengue (DENV), também conhecida como competência vetorial. Essa competência vetorial varia entre diferentes populações de mosquitos, o que significa que o nível de susceptibilidade do *Ae. aegypti* ao vírus da dengue é um importante determinante no processo de transmissão da doença (De Carvalho Leandro *et al.*, 2011). Diversos estudos são realizados buscando avaliar a competência vetorial de linhagens do *Ae. aegypti*. Em Bello, na Colômbia, pesquisadores avaliaram duas linhagens da cidade para a infecção do vírus dengue-2. Os resultados demonstraram uma grande similaridade entre as linhagens nas taxas de infecção, disseminação, sobrevivência e fecundidade (Pérez-Restrepo *et al.*, 2019).

Um estudo realizado em Morelos no México (Quiterio, 2021) demonstrou que os mosquitos capturados na região possuem altas taxas de infecção e transmissão do vírus, ou seja, a competência vetorial dessa linhagem é alta para DENV. Demonstrou também que os mosquitos já possuem altas taxas de infecção a partir de 4 dpi. Estudos em Gana, na África Ocidental, as taxas de infecção, disseminação e transmissão foram avaliadas em colônias de ambientes rurais, semi-urbano e urbanos para vírus DENV. Os resultados demonstraram que as colônias urbanas e semi-urbanas eram menos susceptíveis a infecção do vírus DENV-2 (4%) que já circulava no país, mas possuía maior e mais variada susceptibilidade para uma cepa de DENV-1 (~45%) isolada de um paciente no Japão (Amoa-Bosompem *et al.*, 2021). Na África Central, mosquitos de diversas localizações foram avaliados para DENV-2. Este estudo demonstrou que tanto o *Aedes aegypti* quanto o *Aedes albopictus* são susceptíveis a infecção e são ativos vetores de

dengue. Para *Ae. aegypti* a taxa de infecção variou entre 70,83% a 95,83%, porém os resultados não possuíam diferenças estatísticas significantes entre as populações (Kamgang *et al.*, 2019).

No Brasil, diversos estudos foram realizados avaliando a competência vetorial de cepas de *Ae. aegypti* pelo país. Lourenço de Oliveira *et al.*, (2004) demonstrou em um estudo que avaliava a susceptibilidade dos mosquitos de 23 regiões (13 estados) do Brasil aos vírus dengue e febre amarela que em todas os casos existia uma alta susceptibilidade a infecção pelos dois arbovírus. Segundo o estudo, os municípios de Boa Vista e Rio de Janeiro poderiam ser considerados as entradas mais importantes para a disseminação da dengue, devido a facilidade dos mosquitos de infectar e disseminar o vírus.

Um estudo que avaliou a variação das taxas de infecção para Dengue e Zika vírus na cidade de Belo Horizonte (Godoy *et al.*, 2021), demonstrou altas taxas de infecção (90% a 100%), altas taxas de disseminação (88,8% a 100%) e transmissão (80% a 100%) em 14 dpi com DENV. Foi constatado em Manaus que os mosquitos coletados apresentam variações entre populações na resposta a infecções pelos diferentes sorotipos de DENV. Dentre eles, o DENV-2 foi o que apresentou maior suscetibilidade, com todas as populações de *Ae. aegypti* testadas sendo altamente suscetíveis à infecção e as cargas virais mais elevadas em comparação aos outros sorotipos. Em segundo lugar em termos de suscetibilidade do mosquito estão o DENV-1 e o DENV-4, que apresentaram níveis semelhantes de competência vetorial, seguidos pelo DENV-3, que foi o que apresentou a menor competência vetorial e as cargas virais mais baixas entre os quatro sorotipos (Chaves *et al.* 2022).

No nosso estudo foi avaliada a competência vetorial de cinco populações brasileiras de *Ae. aegypti* para uma linhagem do sorotipo de DENV-1 isolada de um paciente em Contagem, MG em 2015. Corroborando os resultados de outros estudos acima discutidos, os nossos resultados demonstram que as populações brasileiras de *Ae. aegypti* de um modo geral apresentam uma elevada taxa de infecção bem como uma relativamente alta eficiência de disseminação de DENV-1. Indicando deste modo que as populações brasileiras de *Ae. aegypti* podem ter um papel importante na transmissão desta linhagem de DENV-1 e a ajudar a explicar a epidemiologia do DENV no Brasil.

6.3 COMPETÊNCIA VETORIAL ENTRE DENV E CHIKV

A competência vetorial está diretamente relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos dos vetores. Diversos fatores como o ambiente (temperatura, umidade), fatores genéticos e epigenéticos (Houé *et al.*, 2019). Segundo Carrington *et al.* (2013), as grandes flutuações de temperatura durante o dia resultaram em uma redução nas taxas de infecção intestinal e no aumento do período de incubação extrínseca de DENV-1 no mosquito *Ae. aegypti*. Em contrapartida, o modelo termodinâmico desenvolvido por Lambrechts *et al.* (2011) prediz que, para temperaturas médias inferiores a 18 °C, as flutuações diárias de temperatura aumentam a competência vetorial, enquanto, para temperaturas médias acima de 18 °C, as maiores variações na temperatura diária diminuem a competência vetorial.

Fatores epigenéticos também estão ligados a eficiência em infectar, disseminar e transmitir o vírus. Um fator muito estudado atualmente é a microbiota que influencia em vários processos fisiológicos que favorecem a adaptação no ambiente e desenvolve proteção antiviral. Um exemplo é a infecção com *Wolbachia* pode induzir estresse oxidativo e ativar vias imunes, inibindo a transmissão do vírus do dengue (Houé *et al.*, 2019). Em um estudo de Olmo e Aguiar *et al.* (2023), foi demonstrado que os vírus específicos de mosquito, HTV e PCLV, estão associados a um aumento significativo nas taxas de infecção de mosquitos para DENV. Esses vírus associados bloqueiam a regulação negativa da histona H4, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro a infecção.

Diversos fatores genéticos, incluindo genes relacionados à suscetibilidade à infecção, à resposta imunológica e à disseminação do vírus estão associadas a competência vetorial dos mosquitos *Ae. aegypti* para arbovírus. Por exemplo, estudos têm demonstrado que variantes genéticas em receptores celulares, como o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), podem influenciar a suscetibilidade do *Aedes aegypti* à infecção por arbovírus, incluindo o vírus da dengue e o vírus zika (Tree *et al.* 2019). Além disso, genes relacionados à resposta imunológica do mosquito, como os genes da via de sinalização Toll e os genes da família de proteínas defensinas, podem afetar a capacidade do mosquito de controlar a infecção por arbovírus por possuírem

efeitos antivirais, limitando a disseminação do vírus no mosquito (Houé *et al.*, 2019)(Sim *et al.* 2014).

Além disso, estudos demonstram como que os vírus do grupo Alphavirus se multiplicam e disseminam mais rapidamente que os Flavivírus (Whitfield *et al.* 1973; Scott *et al.* 1984 e Hernandez *et al.*, 2014). No estudo realizado por Kantor *et al.* (2018) ao avaliar a disseminação do vírus CHIKV em intestino médio de *Ae. aegypti* foi verificado que em 48 horas o ciclo de replicação de CHIKV foi suficiente para ocorrer a disseminação em outros tecidos. Essa observação foi corroborada no nosso estudo, em que foi possível observar que o vírus chikungunya infectou e disseminou em menor tempo nos mosquitos *Ae. aegypti* em todas as linhagens estudadas em comparação com o vírus da dengue. Porém, é importante estudos para compreender melhor a dinâmica desses vírus com o hospedeiro para compreender melhor como que o tempo de replicação no hospedeiro é impactada por questões genéticas e ambientais.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Estudos de competência vetorial de Culicídeos para arbovírus são importantes para avaliar qual é o grau de risco que determinada população humana está susceptível e o quanto que os mosquitos vetores desses vírus são eficazes na infecção, disseminação e transmissão. Entender a competência vetorial do mosquito é crucial por várias razões. Em primeiro lugar, nos ajuda a prever e controlar surtos de arbovírus. Mosquitos altamente competentes para um determinado arbovírus têm maior probabilidade de transmitir o vírus aos humanos, levando a um aumento da incidência de doenças. Ao identificar populações de mosquitos altamente competentes, as autoridades de saúde pública podem priorizar medidas de controle de vetores, como a pulverização de inseticidas e a redução de fontes larvárias, em áreas com maior risco de transmissão de arbovírus.

Em segundo lugar, o estudo da competência vetorial do mosquito pode ajudar a identificar os determinantes genéticos e moleculares da transmissão de arbovírus. Os pesquisadores podem usar abordagens genéticas e transcriptômicas para identificar genes e vias envolvidas na interação entre o mosquito e o vírus. Esse conhecimento pode ser usado para desenvolver estratégias novas de controle de vetores, como mosquitos geneticamente modificados que são resistentes à infecção por arbovírus ou o uso de endossimbiontes como a *Wolbachia* que confere proteção antiviral.

Logo entender a competência vetorial do mosquito pode ajudar a desenvolver vacinas e terapias eficazes para doenças arbovirais. Ao estudar a resposta imune dos mosquitos à infecção por arbovírus, os pesquisadores podem identificar antígenos virais que provocam uma forte resposta imune nos mosquitos. Esses antígenos podem ser usados para desenvolver vacinas que protegem os humanos da infecção por arbovírus. Da mesma forma, ao identificar fatores dos hospedeiros envolvidos na replicação e transmissão de arbovírus, os pesquisadores podem desenvolver novos medicamentos que visam esses fatores e inibem a replicação e transmissão viral.

O *Ae. aegypti* desempenha um papel de vetor de extrema importância tanto no Brasil quanto no resto do mundo. Apesar da competência vetorial deste vetor ser influenciada por uma variedade de fatores, destacasse a necessidade de

compreendermos melhor sua competência vetorial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle.

Os resultados deste estudo revelaram que todas as populações apresentam elevadas taxas de infecção e disseminação dos vírus da dengue e chikungunya e que não existem diferenças significativas entre as populações de mosquitos das várias regiões aqui estudadas. Além disso, foi observado que os mosquitos foram capazes de transmitir o vírus da chikungunya para camundongos saudáveis apenas após oito dias de infecção, e que a capacidade de transmitir o vírus não variou consideravelmente entre as linhagens de *Ae. aegypti* analisadas. Isso sugere que esses vírus são igualmente capazes de se estabelecer na população de mosquitos de diversas áreas, o que representa um desafio considerável para o controle dessas doenças. Os resultados também apontaram para uma alta suscetibilidade dessas linhagens de *Ae. aegypti* ao genótipo DENV-1 de dengue isolado no Brasil.

Em conclusão, a elevada suscetibilidade para os genótipos dos dois vírus aqui estudados pode explicar a rápida expansão e o aumento do número de casos dessas doenças nos últimos anos. Portanto, compreender as interações entre os vírus e o vetor é fundamental para desenvolver estratégias de controle mais eficazes e direcionadas. Diante desse contexto, é crucial investir em pesquisas contínuas para aprofundar o conhecimento sobre o *Ae. aegypti* e sua capacidade de transmitir doenças. Somente por meio de uma abordagem abrangente e integrada, envolvendo medidas de prevenção, controle do vetor e conscientização pública, será possível mitigar o impacto das doenças transmitidas por esse mosquito.

REFERÊNCIAS

AMOA-BOSOMPEM, M.; KOBAYASHI, D.; ITOKAWA, K. *et al.* Determining vector competence of *Aedes aegypti* from Ghana in transmitting dengue virus serotypes 1 and 2. **Parasites Vectors**, v. 14, n. 228, 2021.

BECKHAM, J.D.; TYLER, K.L. Arbovirus Infections. Continuum (Minneapolis, Minn) **Neuroinfectious Disease**: v. 21, n. 6, p. 1599-611, 2015.

BEERNTSEN *et al.* Genetics of Mosquito Vector Competence. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 115–137, 2000.

BORGES, P. F. DA C. Monitoramento e controle de mosquitos vetores: uma proposta para avançar no conhecimento e no controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/34587/2/paula_borges_ioc_dout_2018.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.

BRASIL, Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 50, 2020 - Boletim epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. v. 51, dezembro 2020.

BRASIL, Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 51, 2021 - Boletim epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 52, n. 48, dezembro 2021.

BRASIL, Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 52, 2022 - Boletim epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde v. 52, n. 48, janeiro 2023.

BRASIL, RIO GRANDE DO SUL. Informativo Epidemiológico de Arboviroses. Disponível em <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202104/09124228-informativo-epidemiologico-dengue-chik-zikae-fa-se-13-28-03-a-03-04.pdf> Acesso em: 05 de março de 2023.

CARRINGTON, L. B. *et al.* Fluctuations at a Low Mean Temperature Accelerate Dengue Virus Transmission by *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n.4, abril 2013.

CÂMARA, F.P. *et al.* Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas / Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 40, n. 2, p. 192-196, 2007.

- CHAVES, B.A. *et al.* Dengue Infection Susceptibility of Five *Aedes aegypti* Populations from Manaus (Brazil) after Challenge with Virus Serotypes 1–4. **Viruses**, v. 14, n. 20, 2022.
- CRUZ, C.R.C.; VASCONCELOS, P.F.C. Arbovírus no Brasil. **Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.45-46, 2008.
- DE-CARVALHO-LEANDRO, C.F.J. *et al.* Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2, **Acta Tropica**, v. 124, n. 2, p. 113-119, 2012.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 18 n. 1, p. 283, 2015.
- FERREIRA, A. C.; NETO, F. C.; MONDINI, A. Dengue in Araraquara, state of São Paulo: Epidemiology, climate and *Aedes aegypti* infestation. **Revista de Saude Publica**, v. 52, 2018.
- GLORIA-SORIA, A. *et al.* Vector Competence of *Aedes albopictus* Populations from the Northeastern United States for Chikungunya, Dengue, and Zika Viruses. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 104, n. 3, p. 1123-1130, 2020.
- GODOY, R.S.M *et al.* Dengue and Zika virus infection patterns vary among *Aedes aegypti* field populations from Belo Horizonte, a Brazilian endemic city. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 15, n. 11, 2021.
- GUNTHER, J. *et al.* Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. **Intervirology**, v. 50, p. 347–352, 2007.
- HERNANDEZ, R.; BROWN, D.T.; PAREDES, A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. **Adv. Virol.**, v. 2014, 2014.
- HOUÉ, Vincent *et al.* Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. **Emerging Microbes & Infections** v. 8, n. 1, p. 1265-1279.
- IBGE, Cidades. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/>, acessado em: 05 de março de 2023.
- KAMGANG, B. *et al.* Risk of dengue in Central Africa: Vector competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and dengue 2 virus. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 13, n. 12, 2019.

KANTOR, A. M. *et al.* Ultrastructural Analysis of Chikungunya Virus Dissemination from the Midgut of the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 571, 2018.

KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1946–1955, 2012.

KRAEMER, M. U. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, v. 4, n. e08347, 2015.

KREUDER JOHNSON, C. *et al.* Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. **Sci Rep**, v. 5, n. 14830, 2015.

KUHN, R.J. *et al.*, Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion, **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

LAMBRECHTS, L. *et al.* Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 108, n. 18, p. 5. 2011.

LIU-HELMERSSON, J. *et al.* Vectorial Capacity of *Aedes aegypti*: Effects of Temperature and Implications for Global Dengue Epidemic Potential. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viroses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2004, n. 98, p. 43-54, 2004.

MARINHO, R.A. *et al.* Effects of temperature on the life cycle, expansion, and dispersion of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in three cities in Paraíba, Brazil. **J Vector Ecol.**, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2016.

MORRISON, T.E. Reemergence of chikungunya virus. **J Virol.**, v. 88, n. 20, p. 11644-7, 2014.

MUSILI, F.M. Vector Competence of *Aedes Simpsoni Bromeliae* and *Aedes Vittatus* Populations from Kilifi and West Pokot, Kenya for Chikungunya Virus. MASTER OF SCIENCE (Medical Parasitology and Entomology). Jomo Kenyatta **University of Agriculture and Technology**, 2021.

NAVARRETE-ESPINOSA, J.; GÓMEZ-DANTÉS, H. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc.**, v. 44, n. 4, p. 347-353, 2006.

- OLMO, R.P. *et al.* Control of Dengue Virus in the Midgut of *Aedes aegypti* by Ectopic Expression of the DsRNA-Binding Protein Loqs2. **Nat Microbiol**, v. 3, p. 1385–1393, 2018.
- OLMO, R.P. *et al.* Mosquito Vector Competence for Dengue Is Modulated by Insect-Specific Vi-ruses. **Nat Microbiol**, v. 8, p. 135–149, 2023.
- PEREIRA, M. Produtividade e habitats larvários de *Aedes aegypti* em Santos, estado de São Paulo. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/T.6.2020.tde-13032020-141101>>. Acesso em: 25 dez. 2022.
- PÉREZ-RESTREPO, L.S. *et al.* Vector competence analysis of two *Aedes aegypti* lineages from Bello, Colombia, reveals that they are affected similarly by dengue-2 virus infection. **Arch Virol.**, v. 164, n. 1, p. 149-158, 2019.
- QUITERIO, I.F., Competencia vectorial para transmitir virus dengue y virus Zika en los mosquitos *Aedes aegypti* colectados en Puente de Ixtla, Morelos. Teses. Profesional. Facultad De Ciencias Biológicas, 2021.
- RAHMAN, R. U. *et al.* Insecticide resistance and genetic structure of *Aedes aegypti* populations from Rio de Janeiro state, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. 1–25, 2021.
- REZENDE, R.H. *et al.* First report of *Aedes albopictus* infected by Dengue and Zika virus in a rural outbreak in Brazil. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, 2020.
- SALAZAR, M.I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiol.** p. 7-9, 2007.
- SANTOS, E.P. *et al.* Aspectos Clínicos Epidemiológicos Da Febre De Chikungunya E Sua Dispersão No Brasil. Capítulo 1 Doenças infecciosas e parasitárias no contexto brasileiro. **Editora Ampila**, v. 4, 2023.
- SCOTT, W., *et al.* Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. **J Med Entomol.**, v. 37, n. 1, p. 89-101, 2000.
- SCOTT, T. W.; HILDRETH, S. W.; BEATY, B. J. The distribution and development of eastern equine encephalitis virus in its enzootic mosquito vector, *Culiseta melanura*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 33, n. 2, p. 300–310, 1984.
- SHOPE, R.E.; MEEGAN, J.M. Arboviruses. Viral Infections of Humans **Springer Science+Business Media**, New York, 1997.
- SIM, S; JUPATANAKUL, N; DIMOPOULOS, G. Mosquito immunity against arboviruses. **Viruses**, v.6, n. 11, 2014.

SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação SINAN do Ministério da Saúde, DATASUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/zikamg.def>. Acesso em 05 de março de 2023.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; SHOPE, R.E.; PINHEIRO, F.P.; Arbovirus research in the Brazilian Amazon. In: UREN, M.F.; BLOK, J.; MANDERSON, L.H. (Ed.). Proceedings fifth symposium on arbovirus research in Australia. Brisbane: **University of Queensland Medical School**, p.4-8,1989.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. *et al.* Dengue. In: LEÃO, R.N.Q. (Ed.). Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico. Belém: **CEJUP Press**, p. 227241. 1997.

TREE, M.O. *et al.* Dengue virus reduces expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 to facilitate replication in *Aedes aegypti*. **Sci Rep** **9**, n. 6352, 2019.

VALLE D.; PIMENTA, D.N.; CUNHA, R.V. Orgs. Dengue: Teorias e práticas. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, p. 450. 2015.

VAN DEN HURK, A.F. *et al.* Vector competence of Australian mosquitoes for chikungunya virus. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 10, n. 5, p. 489-495, 2010.

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**, v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.

WHITFIELD, S.G.; MURPHY, F.A.; SUDIA, W.D. St. Louis encephalitis virus: An ultrastructural study of infection in a mosquito vector. **Virology**, v. 56, p. 70–87, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. DHF situation and activities in the W.H.O. South-East Ásia region in 1988. W.H.O. Viral haemorrhagic Fever. Technical report 719, Geneva, p. 126, 1988.

XIMENES, M.F.F.M. *et al.* Arbovirus expansion: New species of culicids infected by the Chikungunya virus in an urban park of Brazil. Brazil., **Acta Tropica**, v. 209, 2020.