

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**ASPECTOS DA ECOLOGIA TRÓFICA E DETECÇÃO DE
FLAVIVIRUS EM MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) EM
REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO**

DÁLETE CÁSSIA VIEIRA ALVES

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ASPECTOS DA ECOLOGIA TRÓFICA E DETECÇÃO DE
FLAVIVIRUS EM MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) EM
REMANESCENTES DE MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO**

DÁLETE CÁSSIA VIEIRA ALVES

Sob a Orientação do Professor
Jeronimo Augusto Fonseca Alencar

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Biologia Animal, Área de
Concentração em Biodiversidade

Seropédica, RJ
Janeiro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474a Alves, Dálete Cássia Vieira, 1997-
Aspectos da ecologia trófica e detecção de
Flavivirus em mosquitos (Diptera: Culicidae) em
remanescentes de Mata Atlântica do estado do Rio de
Janeiro / Dálete Cássia Vieira Alves. - Seropédica,
2025.
95 f.: il.

Orientador: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, 2025.

1. Mosquitos. 2. Fonte Alimentar. 3. Detecção de
Flavivirus. I. Alencar, Jeronimo Augusto Fonseca,
1967-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TERMO Nº 80 / 2025 - PPGBA (12.28.01.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.007180/2025-40

Seropédica-RJ, 14 de fevereiro de 2025.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DASAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DÁLETE CÁSSIA VIEIRA ALVES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre (a) em Ciências**, no Curso de pós-graduação em **BIOLOGIA ANIMAL**, área de concentração em **BIODIVERSIDADE ANIMAL**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/02/2025

(Assinado digitalmente em 16/02/2025 09:43)

ILDEMAR FERREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.45)
Matrícula: 387289

(Assinado digitalmente em 14/02/2025 12:41)

JERONIMO AUGUSTO FONSECA ALENCAR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 005.893.247-05

(Assinado digitalmente em 14/02/2025 10:31)

HELENA KEIKO TOMA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 711.703.919-15

(Assinado digitalmente em 14/02/2025 14:54)

CECILIA FERREIRA DE MELL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 108.944.867-80

(Assinado digitalmente em 14/02/2025 12:51)

NATALY ARAUJO DE SOUZA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 607.160.377-34

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **80**, ano: **2025**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **14/02/2025** e o código de verificação: **7c02351e75**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as matriarcas da família, minhas avós Delci e Maria do Carmo. Duas mulheres lindas, incríveis, fortes e resilientes. Que seus espíritos sejam eternos.

Aos meus pais, Márcia e Emerson, e minha irmã, Giovanna. Sem o apoio, suporte e incentivo de vocês, eu não teria chegado até aqui. Sempre falo e aqui eu reitero, quando eu for rica, pagarei uma viagem pra Cancun para minha mãe, pagarei um nado com tubarões para meu pai e darei um puxão de orelha em minha irmã. Amo vocês!

As minhas cachorras, Arya e Nina, que sempre me animavam quando eu chegava de um dia extremamente cansativo. Passear, brincar e treinar as duas se tornou minha terapia e minha grande paixão.

A minha companheira, Laura, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e me dando forças, mesmo quando eu estava sendo a pessoa mais chata e reclamona do mundo (foram muitas vezes). Anseio pelo nosso futuro juntas, com nossa casinha e pets. Love u!

As amigas de longa data. Kenny e Diego, são 11 anos ao meu lado, compartilhando conversas realistas (e, consequentemente, depressivas), puxões de orelha e conselhos que raramente (nunca) segui, me ajudaram mais do que vocês imaginam. Carol, a melhor roommate que tive na graduação, e que, mesmo nos encontrando apenas uma vez por ano, nada muda: nossas fofocas continuam as mesmas. Caio, uma amizade inesperada e muito bem-vinda. As trocas de músicas, as reclamações do dia a dia e do péssimo final de Jujutsu Kaisen fizeram meus dias mais leves e engraçados. Madu e Duda (Madudas), meu maior passatempo é perturbar vocês. Se eu não conseguir arrancar pelo menos três xingamentos quando nos encontramos, sinto que estou falhando na minha missão.

As amigas que fiz ao longo desses últimos dois anos. Laryssa, nos conhecemos no primeiro dia de aula e logo nos demos bem, sempre reclamando e surtando juntas, mas também nos ajudando e apoiando para que chegássemos até o final. Débora e Igor, meus dias na UFRJ não seriam os mesmos sem vocês. As crises de risos, o tarô no almoço e as conversas sem sentido faziam tudo ficar mais leve após horas de experimento. Gabi e Samara, vocês foram meus presentinhos da Fiocruz. Nossas conversas, zoeiras e saídas para comprar um docinho sempre deixava o dia mais alegre (mesmo que me deixassem mais pobre). Aos demais amigos, agradeço a compreensão do sumiço e da falta de tempo, prometo uma cerveja com cada um de vocês quando tudo acabar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Jeronimo, que me acolheu em um momento crítico e me deu a oportunidade de continuar na pesquisa e, principalmente, acreditou e confiou em mim, algo que foi fundamental para minha trajetória. Agradeço também ao professor Sérgio, meu coorientador não oficial, por todos os ensinamentos ao longo desses dois anos. Sua crença no meu potencial foi essencial, e com você eu aprendi muito (até os mesmos erros nos experimentos) e não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão por tudo que fez por mim.

Não posso deixar de agradecer também a todas as pessoas que contribuíram e tornaram esse trabalho possível. Para as coletas da REGUA, agradeço ao professor Sérgio, por sempre estar animado e disposto a ir para o mato, mesmo quando as muriçocas queriam te almoçar. A Me. Rayane e Nathália, que se esforçaram e participaram de todas as coletas. Ao Me. Paulo, que não vê um dia ruim e está sempre de bom humor, agradeço por estar sempre presente nas coletas. A Letícia e ao Roger, que também se esforçaram e cederam seus dias para participarem. Para as coletas em Silva Jardim, agradeço a Dra. Cecília, uma pessoa extremamente fofa, incrível e gentil que tive o prazer de conhecer, sempre com um sorriso no rosto e sendo um amorzinho com todo mundo, obrigada por todo o carinho e comprometimento com o trabalho. E agradeço ao Jeronimo, por todo o esforço e dedicação. Agradeço também a Dra. Júlia, uma ótima pesquisadora e uma mãe sensacional, obrigada por todas as horas que passava comigo identificando os mosquitos. E a Dra. Shayenne, pela ajuda nas análises estatísticas.

Agradeço também as demais pessoas do laboratório que tive o prazer de conhecer ao longo desses dois anos. A Gláucia e a Me. Daniele, duas mulheres incríveis e que fazem um cafezinho maravilhoso. A professora Helena Keiko, uma mulher extremamente inteligente, dedicada e uma excelente professora, e que se tornou uma grande inspiração para mim.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Dra. Nataly Araújo, Dr. Ildemar Ferreira, Dra. Helena Keiko e Dra. Cecília Ferreira, por gentilmente aceitarem o convite e contribuírem de forma significativa para o aprimoramento do meu trabalho e para o meu crescimento como cientista.

Agradeço ao coordenador e professor Francisco Gerson, pela oportunidade. A Pós-Graduação em Biologia Animal, por todo o conhecimento adquirido. E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida.

Agradeço a Rural, por ser a minha casa há 7 anos. Seus lindos campos verdes, os quilômetros andados de um prédio ao outro e o sol de 40°C transformaram nossa relação em

amor e ódio. Os anos que passei nela foram cruciais para minha formação. E é como diz o ditado “Não permita Deus, que eu morra sem voltar para a Rural”.

Agradeço à Fiocruz e à UFRJ, bem como aos laboratórios de Díptera e de Análises Virais, por me proporcionarem a oportunidade de desenvolver meu projeto em suas instalações.

Por fim, agradeço a mim mesma, por não ter desistido mesmo quando todas as vozes da minha cabeça me diziam para fazê-lo. Afinal, eu não podia decepcionar o Naruto.

“We fear nothing, we fear nothing
Now that we've come so far
Do you still remember our dreams
The need to have it all?
Don't give up, I feel we are almost there

Life long, road blocks
High walls, teardrops
Nothing stands in our way
Blood stained, stock crash
Mistakes, heart breaks
Nothing stands in our way”

Lacuna Coil – Nothing Stands in Our Way

RESUMO

O estudo sobre os padrões alimentares dos mosquitos é fundamental para entender seu papel como vetores de patógenos. A identificação das fontes alimentares não apenas fornece informações sobre os comportamentos de busca dos mosquitos, mas também tem implicações diretas na epidemiologia de patógenos transmitidos por esses insetos, como os vírus da dengue, Zika e febre amarela. Em ecossistemas como a Mata Atlântica, onde a biodiversidade é rica e complexa, compreender esses padrões alimentares se torna ainda mais relevante. Neste contexto, o presente estudo foi realizado em remanescentes de Mata Atlântica da Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA) e no Sítio Recanto Preservar, ambos localizados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. O objetivo foi identificar as fontes alimentares e detectar a circulação de *Flavivirus* nos mosquitos presentes nessas áreas, contribuindo para um melhor entendimento das dinâmicas ecológicas e epidemiológicas. A utilização de técnicas moleculares, como o sequenciamento de DNA do citocromo b (Cytb) baseado em Sanger, permite uma identificação precisa das fontes alimentares, fundamental para delinear estratégias de controle e monitoramento das populações de mosquitos. A detecção da circulação de *Flavivirus* transmitidos por culicídeos foi realizada através da amplificação de fragmentos específicos do genoma viral. Foi realizado a extração do RNA viral, seguida da pesquisa de *Flavivirus* utilizando a reação de amplificação da região NS5 por transcriptase reversa (RT-PCR). Um total de 2077 mosquitos foram capturados, dos quais apenas 145 fêmeas (6,98%) estavam ingurgitadas. Com a análise molecular para pesquisa da fonte alimentar, apenas 55 amostras (37,93%) apresentaram o seu DNA amplificado. Os resultados obtidos revelaram uma clara tendência das espécies de mosquitos capturadas em se alimentarem predominantemente de humanos. Essa observação não apenas sublinha a importância de compreender as interações entre mosquitos e suas fontes de alimentares, mas também levanta questões sobre os riscos associados à transmissão de patógenos para a saúde pública. Outro resultado relevante foi a identificação do vírus Tembusu, um *Flavivirus* encontrado apenas no Sudeste Asiático, levantando questões sobre a sua introdução no Brasil. Em síntese, o estudo evidencia a relevância de investigar as preferências alimentares dos mosquitos, contribuindo para um conhecimento mais aprofundado sobre sua ecologia e epidemiologia, e a importância de implementar estratégias de monitoramento de arbovírus, antecipando possíveis surtos. Além disso, os achados ressaltam a necessidade de aprimoramento contínuo das técnicas utilizadas na identificação das fontes alimentares, visando uma melhor compreensão das interações entre os mosquitos e o meio ambiente. Essa informação é essencial para o desenvolvimento de políticas e estratégias eficazes de controle de patógenos transmitidos por vetores.

Palavras-chaves: Mosquitos; Hábito alimentar, Arbovírus, Flavivírus, Mata Atlântica

ABSTRACT

The study of mosquito feeding patterns is essential for understanding their role as vectors of pathogens. Identifying their food sources provides insights into mosquito foraging behaviors and directly impacts the epidemiology of mosquito-borne pathogens such as dengue, Zika, and yellow fever. Understanding these feeding patterns is particularly relevant in ecosystems like the Atlantic Forest, which is rich in biodiversity and complexity. This study was conducted in remnants of the Atlantic Forest at the Guapiaçu Ecological Reserve (REGUA) and Sítio Recanto Preservar, both located in the state of Rio de Janeiro, Brazil. The objective was to identify the food sources of mosquitoes and detect the circulation of Flavivirus in these areas, contributing to a better understanding of ecological and epidemiological dynamics. Molecular techniques, such as Sanger-based DNA sequencing of cytochrome b (Cytb), allow for precise identification of food sources, which is fundamental for designing control and monitoring strategies for mosquito populations. The detection of Flavivirus circulation transmitted by culicids was performed through the amplification of specific fragments of the viral genome. The genetic material was obtained by extracting viral RNA, followed by the detection of Flavivirus using the NS5 region amplification reaction by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). A total of 2,077 mosquitoes were captured, of which only 145 females (6.98%) were engorged. Of these, only 55 samples (37.93%) had their DNA successfully amplified. The results revealed a clear tendency for the captured mosquito species to feed predominantly on humans. This finding underscores the importance of understanding the interactions between mosquitoes and their food sources and raises concerns about the associated risks of pathogen transmission to public health. Another significant result was the identification of the Tembusu virus, a Flavivirus typically found only in Southeast Asia, raising questions about its introduction to Brazil. Our study highlights the importance of investigating mosquito feeding preferences, contributing to a deeper understanding of their ecology and epidemiology, and emphasizes the need for implementing monitoring strategies for arboviruses to anticipate potential outbreaks. Additionally, we stress the necessity of continuously improving techniques to identify food sources to better understand the interactions between mosquitoes and their environment. This information is crucial for developing effective policies and strategies to control vector-borne pathogens.

Keywords: Mosquitoes; Feeding habits, Arbovirus, Flavivirus, Atlantic Forest

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Arbovírus transmitidos por mosquitos clinicamente importantes que causam doenças aos seres humanos.	13
Tabela 2. Sequências dos dois pares de primers e o tamanho de seus amplicons utilizados para a identificação das fontes alimentares.	39
Tabela 3. Sequências do par de primers e o tamanho de seus amplicons utilizados para a identificação de Flavivirus.....	40
Tabela 4. Quantidade total de mosquitos coletados nos pontos amostrais do Sítio Recanto Preservar e da REGUA, localizados no estado do Rio de Janeiro, Brasil	43
Tabela 5. Espécies capturadas no ponto amostral Sítio Recanto Preservar no município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade total de fêmeas e machos.....	43
Tabela 6. Espécies capturadas no ponto amostral da Trilha Amarela na Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade total de fêmeas e machos.	44
Tabela 7. Espécies capturadas no ponto amostral da Trilha Verde na Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade total de fêmeas e machos.	45
Tabela 8. Espécies ingurgitadas capturadas no ponto amostral Sítio Recanto Preservar no município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade de fonte alimentar das respectivas espécies.	46
Tabela 9. Espécies ingurgitadas nos pontos amostrais na área da Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade de fonte alimentar das respectivas espécies.....	47
Tabela 10. Identificação das fontes alimentares ingeridas por fêmeas de mosquitos de áreas da REGUA e no Sítio Recanto Preservar capturadas em armadilha luminosa CDC, estado do Rio de Janeiro, Brasil.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do sistema digestório de adultos de <i>Aedes aegypti</i> : (DD) divertículos, (FG) intestino anterior, (HG) intestino posterior, (MG) intestino médio, (MT) Túbulos de Malpighi, (Es) esôfago, (Pr) probóscide, (SG) glândula salivar e (VD) ventrículo ventral. Fonte: Gusmão (2007).	5
Figura 2. Processos que ocorre durante o contato mosquito-humano: 1) picada e liberação da saliva e 2) sucção de sangue. Duas direções separadas e distintas para a transmissão de patógenos (a). Se o mosquito estiver infectado, o patógeno é transmitido ao humano por meio da saliva (b). Se o humano estiver infectado, o patógeno é transferido ao mosquito durante a ingestão de sangue (c). Fonte: Thongsripong et al. (2021).	11
Figura 3. Representação esquemática da infecção bem sucedida por vírions nas barreiras teciduais de um mosquito. Os vírions são representados por hexágonos azuis. Fonte: Franz et al. (2015).	11
Figura 4. Localização dos pontos de amostragem nos Municípios de Cachoeiras de Macacu e Silva Jardim no estado do Rio de Janeiro, Brasil.	29
Figura 5. Ponto amostral Sítio Recanto Preservar, localizado no município de Silva Jardim. Fonte: Cecília Mello.	30
Figura 6. Ponto amostral Sítio Recanto Preservar, localizado no município de Silva Jardim. Fonte: Cecília Mello.	30
Figura 7. Animais em risco de extinção. Fonte: Shutterstock (mico-leão-dourado), Henrique Nogueira, 2014 (preguiça de coleira) e Adriano Gambarini, 2008 (onça-parda).	32
Figura 8. Fauna que ocorre na APA da Bacia do Rio São João. Fonte: Gilvan Moreira, 2016 (garça-vaqueira), Claudio Lopes, 2012 (gavião-de-rabo-branco), Luiz Bravo, 2015 (urubu-de-cabeça-preta), Rum Bucolic Ape (sagui-de-tufo-branco, sagui-de-tufo-preto), Wikimedia Commons (lobo-guará).	33
Figura 9. Fauna presente na REGUA. Fonte: iNaturalist (jacaré de papo amarelo), SEMIL (muriqui).	35
Figura 10. Ponto amostral Trilha Amarela na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA). Fonte: Dálete Alves.	36
Figura 11. Ponto amostral Trilha Verde na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA). Fonte: Dálete Alves	37

Figura 12. Armadilha luminosa de CDC utilizada na captura dos mosquitos. Fonte: Sérgio Machado.	38
Figura 13. Fluxograma resumindo o passo a passo da investigação molecular para fonte alimentar de mosquitos. Fonte: Adaptado de Sérgio Machado.	42
Figura 14. Fluxograma resumindo o passo a passo da investigação molecular de arbovírus. Fonte: Adaptado de Sérgio Machado.	42
Figura 15. Dendrograma de similaridade baseado no índice de Morisita entre as espécies de culicídeos baseado nas suas fontes alimentares.....	50
Figura 16. Gel de agarose corado com brometo de etídio demonstrando a amplificação que demonstra a amplificação da amostra 286 na qual o que foi identificada o vírus Tembusu foi identificado. Zkv - cDNA do vírus Zika, FA100 - cDNA da febre amarela, 50pb – DNA Ladder.	51

LISTA DE ABREVIACÕES

APA	Área de Proteção Ambiental
BOLD	Barcode of Life Data System
°C	Graus Celsius
CHIKV	Vírus Chikungunya
CO ₂	Dióxido de Carbono
COI	Citocromo c Oxidase Subunidade 1
CV	Competência Vetorial
Cytb	Citocromo b
DENV	Vírus Dengue
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IAAP	Influenza Aviária de Alta Patogenicidade
INAATs	Amplificação Isotérmica de Ácido Nucleico
ICMBio	Instituto Chico Mendes da Biodiversidade e Conservação
LAV	Laboratório de Análise Viral
MAYV	Vírus Mayaro
mtDNA	DNA mitocondrial
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OROV	Vírus Oropouche
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PNOC	Prepronociceptina
REGUA	Reserva Ecológica de Guapiaçu
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
rRNA	RNA Ribossomal
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
RVFV	Vírus da Febre do Vale do Rift
SISBIO	Sistema de Informação e Autorização de Biodiversidade
TMUV	Vírus Tembusu

UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UC	Unidade de Conservação
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Família Culicidae	1
1.1.1 Evolução da Hematofagia dos Culicidae	3
1.1.2 Associação dos Culicidae com os Vertebrados.....	6
1.1.3 Causas e consequências da hematofagia	10
1.2 Arbovírus	13
1.2.1 Família Flaviviridae	15
1.2.1.1 Vírus da Dengue (DENV)	16
1.2.1.2 Febre Amarela (YFV).....	16
1.2.1.3 Vírus Zika (ZIKV).....	17
1.2.2 Família Togovaridae	17
1.2.2.1 Vírus Chikungunya (CHIKV)	18
1.2.2.2 Vírus Mayaro (MAYV)	18
1.2.3 Família Bunyaviridae	19
1.2.3.1 Vírus Oropouche (OROV)	19
1.2.3.2 Vírus da Febre do Vale do Rift (RVFV)	19
1.3 Identificação da Fonte Alimentar	19
1.3.1 A PCR e Seus Desafios na Detecção da Fonte Alimentar	23
1.4 Detecção de Arbovírus.....	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Declaração de Ética.....	28
4.2 Área de Estudo.....	28
4.2.1 Município de Silva Jardim	29
4.2.2 Município de Cachoeira de Macacu.....	33
4.3 Captura dos espécimes, armazenamento e identificação das fêmeas ingurgitadas.....	37
4.4 Avaliação do hábito alimentar através da análise molecular	38
4.5 Investigação de <i>Flavivirus</i>	40

4.6 Análise das Sequências	41
4.7 Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS	43
4.1 Identificação das Fontes Alimentares	46
4.1.1 Ponto amostral sítio Recanto Preservar, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro.....	46
4.1.2 Ponto amostral Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro.	47
4.2 Identificação de <i>Flavivirus</i> em mosquitos	50
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIA	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Família Culicidae

Os culicídeos, também conhecidos como mosquitos e pernilongos, pertencem à família Culicidae e à ordem Diptera. A família é subdividida em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae. A subfamília Anophelinae envolve três gêneros: *Anopheles*, *Chagasia* e *Bironella*; e a subfamília Culicinae contém 110 gêneros em 11 tribos, das quais as mais diversas são Aedini e Sabethini (HARBACH; KITCHING, 1998; WILKERSON *et al.*, 2015). Dessa forma, estima-se a existência de aproximadamente 3618 espécies de mosquitos, distribuídas em 113 gêneros (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info>).

Os mosquitos ocorrem em praticamente todos os continentes, com exceção da Antártida, e abrangem diversas regiões, como tundra ártica, altas montanhas, desertos e florestas tropicais (FOSTER; WALKER, 2019). No entanto, é a Região Neotropical que detém o maior nível de endemidade, uma vez que 31% das espécies, são restritas a essa região biogeográfica (FOLEY; RUEDA; WILKERSON, 2007). Dada essa larga e persistente distribuição, juntamente com o hábito hematófago e os diversos patógenos que podem transmitir, como a Dengue, Chikungunya, Febre Amarela e Malária, eles são caracterizados como insetos de maior importância médica e veterinária para a Saúde Pública (FORATTINI, 2002).

Esses insetos são holometábolos e seu ciclo biológico envolve as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto. As fases imaturas (ovo, larva e pupa) são aquáticas e seu desenvolvimento, desde a oviposição até a formação dos adultos, ocorre em criadouros, classificados em naturais (occos de árvores, internódios de bambus, bromélias, banhado permanente e transitório, poças d'água) ou artificiais (pneus, garrafas e caixas d'água) (FORATTINI, 2002). Esses criadouros podem ser de dois tipos: temporários, como poças de chuvas ou águas de inundação; e permanentes, como riachos, pântanos e lagoas (CHASE; KNIGHT, 2003). Assim, pode-se assumir que todas as fases imaturas ocupam o mesmo ecótopo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A oviposição dos mosquitos oscila entre 50 e 500 ovos, na qual a fêmea os deposita obrigatoriamente próximos à água ou diretamente em sua superfície, variando de acordo com o gênero (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As fêmeas da tribo Aedini, por exemplo, costumam colocar seus ovos individualmente em substratos que posteriormente serão inundados, enquanto as subfamílias de Anophelinae e algumas de Culicinae, disseminam seus ovos diretamente sobre a superfície da água (FOSTER; WALKER, 2019). A deposição dos ovos pode ser feita de forma isolada ou aglomerada, sendo que em ambos os casos, os locais devem oferecer

proteção à fêmea, visto que ela deverá pousar e permanecer em uma superfície até o fim da postura. Em relação a conformação, os ovos podem ser alongados, ovóides, esféricos ou rombóides (FORATTINI, 2002).

A fase larval dos mosquitos apresenta quatro instares (LI-L4), de modo que, enquanto as larvas de L1 são essencialmente filtradoras e se alimentam de microorganismos, as larvas dos demais estágios são predominantemente detritívoras e podem se alimentar tanto de detritos quanto de insetos mortos presentes na água, a depender do gênero (WIEGMANN *et al.*, 2009; GOUVEIA DE ALMEIDA, 2012). As larvas apresentam vida livre e grande mobilidade, e quando em condições normais, seu período de desenvolvimento varia entre 8 e 10 dias (FORATTINI, 2002). Quanto à morfologia, elas são ápodas, a cabeça possui um par de olhos compostos por aglomerados de ocelos laterais, abdome semi-cilíndrico, ausência de pernas e aparelho bucal mastigador-raspador (HARBACH, 2007).

As pupas, quando em condições normais, dura em torno de dois dias, sendo marcada pela transição do meio aquático para o terrestre e pelas mudanças internas que procederá um mosquito adulto, com a eliminação de órgãos larvais e a formação de novos da fase adulta. Morfologicamente, as pupas são ápodas, possui o corpo em forma de vírgula, com a cabeça e o tórax fundido formando um cefalotórax e com abdome enrolado abaixo dele, que permite que flutuem na superfície da água. As pupas não se alimentam e usam para sobreviver, a reserva energética adquirida durante os estádios larvais. Além disso, acumulam ar no interior do corpo, evento que antecede a emergência do mosquito adulto (HARBACH, 2007; GOUVEIA DE ALMEIDA, 2012).

As principais funções dos espécimes adultos dos mosquitos são a reprodução e a dispersão. Assim, após a saída do revestimento pupal, demora apenas algumas horas para que os adultos estejam prontos para realizar a cópula, que normalmente ocorre durante o voo. Diferente das fases imaturas, os adultos são terrestres e são bem reconhecidos, visto que esses insetos apresentam um par de asas membranosas, um corpo tubular delgado, três pares de longas pernas, probóscide longa, escamas na parte dorsal do corpo e aparelho bucal do tipo picador ou sugador alongado (FORATTINI, 2002). Os machos e as fêmeas são morfologicamente diferentes em relação às antenas, peças bucais e genitálias. Enquanto as fêmeas possuem antenas pilosas e estruturas de perfuração em sua probóscide, os machos apresentam antenas plumosas e nenhuma estrutura de perfuração em suas peças bucais. Cabe ressaltar que, as fêmeas geralmente apresentam uma maior envergadura que os machos (HARBACH, 2007).

1.1.1 Evolução da Hematofagia dos Culicidae

O metabolismo dos mosquitos requer a ingestão de açúcares como fonte de energia, que serão usados para o voo e acasalamento. Esses açúcares são geralmente retirados de seivas, frutos e flores, caracterizando esses mosquitos como fitófagos. Os espécimes machos são exclusivamente fitófagos e necessitam de uma frequente ingestão para sobreviver, tolerando por até quatro dias após a eclosão a privação da ingestão de açúcares. As fêmeas também os utilizam durante os primeiros dias, no entanto, em algumas espécies, adquiriram um hábito hematófago, passando a se alimentar também de todas as classes de vertebrados, como aves, répteis, mamíferos, anfíbios e até mesmo peixes (GOUAGNA *et al.*, 2014; PEACH; GRIES, 2020).

A origem evolutiva da hematofagia nos artrópodes é incerta, porém acredita-se que tenha surgido de forma independente cerca de 145-60 milhões de anos atrás, no período Jurássico e Cretáceo (BALASHOV, 1984). Nos insetos, é possível que a hematofagia tenha evoluído por meio de duas rotas principais: a partir de associações prolongadas entre os insetos e os vertebrados e a partir de linhagens de insetos ancestrais que foram morfologicamente pré-adaptados para superfícies perfuráveis (LEHANE, 2005).

Segundo WAAGE (1979), as associações prolongadas entre os vertebrados e os insetos podem ter acontecido de forma acidental ou atrativa, de modo que os insetos eram atraídos até os ninhos ou tocas de vertebrados devido ao ambiente úmido e quente, assim como a odores compartilhados entre eles e as plantas, como o CO₂. Outra possibilidade envolvendo essas associações eram encontros com vertebrados longe de seus ninhos, onde os insetos eram atraídos pelos seus esterco, que eram utilizados como habitat larval. Dessa forma, com tantas proximidades, esses eventos podem ter levado insetos ancestrais a se alimentarem de secreções corporais e feridas abertas (WAAGE, 1979; GILLIES, 1980; LEHANE, 2005).

A segunda rota da evolução da hematofagia pode estar relacionada com insetos entomófagos ou fitófagos. A hipótese é que insetos entomófagos eram atraídos aos ninhos ou a outros habitats devido ao acúmulo de insetos presentes que rodeavam os vertebrados. Com isso, esses insetos que teriam aparelhos bucais perfurantes, poderiam ter feito contatos repetidos e prolongados com os vertebrados, pré-adaptando a morfologia do aparelho bucal e facilitando a mudança para a hematofagia. Da mesma maneira, insetos ancestrais fitófagos que apresentavam aparelhos bucais perfurantes e sugadores também poderiam dar origem a hematofagia, exigindo apenas associações com os vertebrados (LEHANE, 2005).

Existe uma escassez de registros fósseis de mosquitos ancestrais, que por sua vez, mitiga as informações sobre os processos evolutivos desses insetos. O exemplar mais antigo conhecido é de uma fêmea hematófaga em âmbar de meados do Cretáceo (90-100 milhões de anos) na Birmânia (BORKENT; GRIMALDI, 2004). Outro espécime exemplar do Cretáceo (72-83 milhões de anos) é um macho em âmbar em Alberta, Canadá (POINAR *et al.*, 2000). E apesar da raridade, somente um único fóssil de mosquito fêmea ingurgitada de sangue foi encontrado em Montana, datado do Eoceno Médio (46 milhões de anos) (GREENWALT *et al.*, 2013).

Nos mosquitos, a entomofagia e a fitofagia também podem ser consideradas como uma possível dieta da qual a hematofagia evoluiu. A entomofagia observada em laboratório, revelou fêmeas de *Culex tarsalis* Coquillett, 1896 e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) se alimentando de larvas de lepidópteros, e apresentando efeitos no desenvolvimento de seus ovos (HARRIS; RIORDAN; COOK, 1969). Já em um ensaio com olfatômetro, fêmeas de *Anopheles stephensi* Liston, 1901 foram atraídas por larvas de insetos, provavelmente devido ao CO₂ respiratório larval (GEORGE *et al.*, 2014).

Os mosquitos fitófagos ancestrais apresentavam peças bucais alongadas e sugadoras, que podem ter surgido primeiro como um meio de alcançar a base dos nectários florais (FOSTER, 1995). Evidências da radiação na diversidade de mosquitos e o aparecimento e a radiação das angiospermas (REIDENBACH *et al.*, 2009), em conjunto com fósseis encontrados de visitação floral por mosquitos no Cretáceo Médio (HARTKOPF-FRODER *et al.*, 2012), sugerem que os mosquitos eram antigos polinizadores de angiospermas primitivas. Como o odor do CO₂ é compartilhado entre as plantas e os vertebrados, pode ter ocorrido uma sobreposição do forrageamento dos mosquitos e contribuído para a mudança da fitofagia para hematofagia (PEACH *et al.*, 2019). Dessa forma, a evolução alimentar dos mosquitos foi o resultado de uma série de múltiplas transições entre a entomofagia, fitofagia e hematofagia (PEACH; GRIES, 2020).

Com a alimentação sanguínea sendo progressivamente explorada pelos mosquitos, adaptações fisiológicas e comportamentais diminuíram o risco da digestão sanguínea e potencializaram sua ingestão (LEHANE, 2005), como secreções salivares com substâncias anticoagulantes, antiplaquetárias e vasodilatadoras (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003), pré-diurese durante ou após o repasto sanguíneo, para eliminar o excesso de água do sangue ingerido, concentrar nutrientes e manter o equilíbrio hídrico (BRIEGEL; REZZONICO, 1985), resfriamento evaporativo, retendo uma gota de fluido no final do abdome para evitar o estresse térmico durante a alimentação (LAHONDÈRE; LAZZARI, 2012), intestino médio com a

capacidade de neutralizar ou resistir as respostas imunológicas causadas pelo sangue e otimizar a digestão dos componentes sanguíneos (SIMPSON, 2012), entre outras (Figura 1).

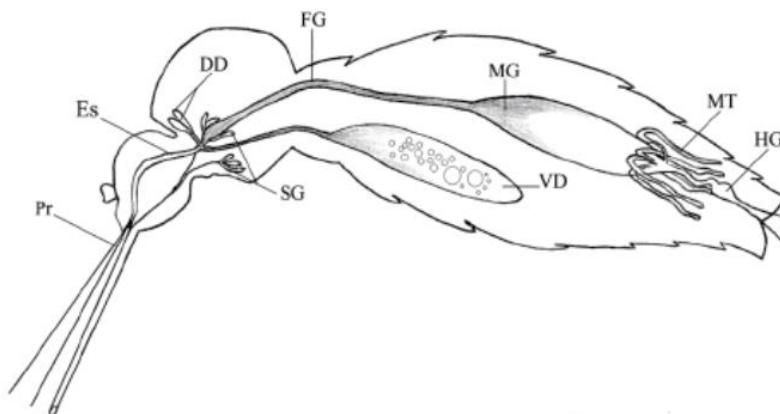


Figura 1. Ilustração do sistema digestório de adultos de *Aedes aegypti*: (DD) divertículos, (FG) intestino anterior, (HG) intestino posterior, (MG) intestino médio, (MT) Túbulos de Malpighi, (Es) esôfago, (Pr) probóscide, (SG) glândula salivar e (VD) ventrículo ventral. Fonte: Gusmão (2007).

Desse modo, ao longo de milhares de anos, todas as diversas adaptações que surgiram permitiram com que as fêmeas realizem o repasto sanguíneo por até quatro vezes o seu peso corporal (MELGAREJO-COLMENARES; CARDO; VEZZANI, 2022). Cada repasto absorve cerca de 30μL de sangue do hospedeiro, onde cerca de 20% dos componentes sanguíneos é retido na fêmea (proteína, lipídeos e açúcares), 10% vai para os ovos (proteínas e lipídeos), e o restante é excretado como resíduo (SCARAFFIA, 2016). Por essa razão, a hematofagia das fêmeas proporciona uma alta fonte de energia metabólica e uma alta concentração de proteínas para o desenvolvimento dos ovários, reprodução e a postura dos ovos (MELGAREJO-COLMENARES; CARDO; VEZZANI, 2022).

Dado a simultaneidade da obtenção de néctar floral e sangue de animais, é possível que uma radiação adaptativa tenha ocorrido nos mosquitos ancestrais, os induzindo a tomarem duas rotas evolutivas, uma para a exclusiva dependência de açúcares e outra para o sangue (FOSTER, 1995). Isso pode ser explicado devido a existência de fêmeas hematófagas, que podem ser classificadas como autógenas ou anautógenas, variando de acordo com a dependência dos

nutrientes do sangue para a produção dos ovos. Para as fêmeas autógenas, logo após a emergência no estágio adulto, a sua primeira oviposição pode acontecer sem que ela realize o repasto sanguíneo, no entanto, para as posteriores, a refeição de sangue será imprescindível. Já as fêmeas anautógenas não são capazes de realizar nenhuma oviposição sem que aconteça o repasto sanguíneo antes (TOWNSON, 1993). Da mesma maneira, existem grupos cujas fêmeas adultas não desenvolveram a hematofagia, como os Toxorhynchitinae (FORATTINI, 2002).

1.1.2 Associação dos Culicidae com os Vertebrados

O ciclo gonotrófico dos mosquitos geralmente envolve três etapas: 1. a fêmea emerge, procura por um vertebrado e realiza o repasto sanguíneo; 2. após a alimentação, ela busca por um local para descansar, digerir o sangue e desenvolver os ovos. Nessa fase, o comportamento pela procura de novos vertebrados pode ser pausado; 3. ela realiza a postura dos ovos e recomeça a procurar novas fontes alimentares, reiniciando o ciclo (KLOWDEN; BRIEGEL, 1994; DUVALL, 2019). Em média, esse ciclo pode durar entre 2 e 4 dias, e sua duração é usada para determinar a taxa de alimentação sanguínea do mosquito (DUVALL, 2019).

De acordo com a literatura, existem algumas terminologias quanto ao comportamento alimentar dos mosquitos. Aqueles considerados generalistas se alimentam de uma alta diversidade de animais, ocorrendo provavelmente com o primeiro que for encontrado (FIKRIG; HARRINGTON, 2021). Esse é o caso da espécie *Aedes albopictus* (Skuse, 1895), na qual as fêmeas se alimentam de uma variedade de mamíferos e aves, como coelhos, veados, pombos e codornas (SAVAGE *et al.*, 1993). Os mosquitos que apresentam tendência em se alimentar de uma determinada espécie ou classe de animais são considerados especialistas, como por exemplo a espécie *Culiseta melanura* (Coquillett, 1902), que possui uma preferência de 90% por hospedeiros aviários, como o tordo-americano (MOLAEI; ANDREADIS, 2006; WOLFF; RIFFELL, 2018).

A preferência alimentar dos culicídeos classifica-se ainda em duas categorias: espécies zoofílicas e antropofílicas. A primeira diz respeito a espécies que possuem como primeira escolha animais não humanos, e buscam seus alimentos em ambientes silvestres, rurais ou urbanos, e que, quando fora dos domicílios, são chamadas de exofílicas. Em contrapartida, as espécies antropofílicas são aquelas que preferem se alimentar dos humanos, e que, ao buscarem nas residências, são conhecidas como endofílicas (FIKRIG; HARRINGTON, 2021).

A capacidade de localizar um vertebrado para a realização do repasto sanguíneo está em constante pressão seletiva em termos de confiabilidade, gasto energético e discrição para evitar

os predadores, pois é somente a base dessa alimentação que a fêmea do mosquito conseguirá concluir a postura dos ovos (CARDÉ; GIBSON, 2010). Esses insetos usam sinais químicos e físicos, como visão, olfato, calor e umidade para se orientarem em direção aos vertebrados (COUTINHO-ABREU; RIFFELL; AKBARI, 2022) e as etapas comportamentais que envolvem essa busca são ativação, atração de longo alcance mediada por odor, pairar e pousar (CARDÉ, 2015).

O dióxido de carbono (CO₂) liberado pela respiração dos vertebrados é o sinal químico responsável por desencadear a etapa de ativação, tirando os mosquitos do estado de repouso (HINZE *et al.*, 2021). Ao levantarem voo, os receptores olfativos localizados nas antenas, palpos maxilares e labelo detectam nuvens de CO₂ acima dos níveis ambientais, impulsionando a atração em longas distâncias e orientando o mosquito contra o vento em direção a fonte alimentar (LEAL, 2013; CARDÉ, 2015).

Após a detecção de CO₂, estímulos visuais entram em ação agindo de forma constante e eficaz em qualquer ângulo possível, de forma que auxiliam o olfato na orientação até o vertebrado (VAN BREUGEL *et al.*, 2015). No caso de uma fonte humana, sua visibilidade para o mosquito está a uma distância entre 5m e 15m, dependendo da iluminação (BIDLINGMAYER; HEM, 1980; VAN BREUGEL *et al.*, 2015). Muitas espécies, como o *Ae. aegypti*, são atraídas para objetos escuros, mesmo quando na ausência de estimulação de CO₂ (KENNEDY, 1940).

Uma vez próximo ao hospedeiro, outros odores se tornam os novos atrativos do mosquito, que conduz uma análise final e decide se irá pousar ou não para realizar a alimentação (EIRAS; JEPSON, 1991; LACEY; RAY; CARDÉ, 2014). O CO₂ por si só não diferencia os vertebrados, de forma que odores produzidos por glândulas da pele e presentes no suor, ajudam a distinguir a fonte alimentar para os mosquitos mais especialistas (SMALLEGANGE; VERHULST; TAKKEN, 2011).

Esses odores estão presentes em diferentes proporções na pele dos vertebrados e envolvem componentes como o ácido láctico (DEKKER *et al.*, 2002), a amônia (GEIER, 1999) e ácidos carboxílicos de cadeia curta (BOSCH; GEIER; BOECKH, 2000). Ao se tratar do hospedeiro humano, foi visto que a espécie *Anopheles gambiae* Giles, 1902 prefere o suor antigo ao suor novo, pois os níveis de amônia, produzidos após o consumo de ácido láctico, são mais elevados (BRAKS; TAKKEN, 1999). Além disso, pelo fato dos ácidos carboxílicos de cadeia curta estarem em grande abundância na pele humana, ele torna a amônia, o ácido láctico e o CO₂ mais atrativos (SMALLEGANGE *et al.*, 2009).

Quando o alvo do mosquito é um animal de sangue quente, a temperatura e a umidade também se tornam atrativos quando o mosquito está mais próximo. O mosquito segue um gradiente crescente de temperatura gerado por correntes de convecção, que são formadas pela diferença entre a temperatura corporal do animal com a temperatura ambiental (CARDÉ; GIBSON, 2010). O calor emitido combina com o odor do vertebrado, aumentando significativamente a atração do mosquito (KLINEI; LEMIRE, 1995). Quando a umidade aumenta, a atração por um objeto aquecido é ainda maior (EIRAS; JEPSON, 1994).

A associação desses múltiplos sinais do hospedeiro, causam um efeito sinérgico em relação a sua localização, portanto, cada um desses componentes é fundamental para o sucesso da alimentação do mosquito (COUTINHO-ABREU; RIFFELL; AKBARI, 2022). No entanto, fatores extrínsecos e intrínsecos podem interferir no encontro ou na escolha preferida da fonte alimentar, desde a fase de ativação até o contato com o animal (TAKKEN; VERHULST, 2013).

São caracterizados como fatores extrínsecos os fatores ambientais e os fatores relacionados ao vertebrado e como fatores intrínsecos a genética da fêmea, fisiologia da fêmea.

a) Fatores Ambientais

A temperatura, precipitação, umidade relativa do ar, iluminação e o vento são os principais fatores abióticos que podem afetar o encontro com o hospedeiro vertebrado (REITER, 2001). O vento, por exemplo, quando em altas velocidades, apresenta uma severa influência na busca do hospedeiro, reduzindo drasticamente o voo dos mosquitos e dificultando o seu encontro. Além disso, podem influenciar as taxas olfativas dos vertebrados, impactando as taxas de hematofagias (HOFFMANN; MILLER, 2002). Freire *et al.* (2016) demonstraram que a combinação de todas essas variáveis, quando em condições favoráveis (velocidade do vento inferior a 20 km/h, temperatura ambiente superior a 26°C, grau de insolação inferior a 40% e umidade relativa superior a 50%), proporcionaram uma boa atividade da busca e na alimentação do hospedeiro vertebrado (FREIRE *et al.*, 2016). Já a iluminação pode estar relacionada com o ritmo circadiano desses insetos (MURILLO; ASTAIZA; FAJARDO, 1988).

Por serem insetos poiquilotérmicos, a temperatura dos mosquitos varia de acordo com a do ambiente, de forma que, a busca pelo vertebrado e a frequência do repasto sanguíneo geralmente aumentam quando a temperatura está mais elevada, pois ela acelera o metabolismo dos mosquitos, aumentando sua atividade, taxa de desenvolvimento larval e reprodutiva (WALTON; REISEN, 2013). Por fim, estudos apontam que em um ambiente de baixa umidade e à mercê da desidratação, algumas espécies aumentaram sua atividade e repasto sanguíneo (HAGAN *et al.*, 2018). Porém, cada uma dessas variáveis vai influenciar de forma distinta as

espécies de mosquito, de acordo com o seu habitat e o período de atividade (diurno ou noturno) (BIDLINGMAYER, 1985).

b) Fatores Relacionados ao Vertebrado

A disponibilidade e distribuição dos animais no ambiente influenciam quanto tempo os mosquitos usam procurando pelas fontes para se alimentarem. Uma busca prolongada pode ter consequência na quantidade de energia que os mosquitos gastam, em sua capacidade de sobreviver e na probabilidade de serem capturados por predadores enquanto estão à procura de alimento (LYIMO; FERGUSON, 2009). A disponibilidade dos animais pode ser afetada por suas migrações sazonais e consequentemente, pode variar a preferência alimentar dos mosquitos nesses períodos. Na América do Norte, por exemplo, *Culex nigripalpus* Theobald, 1901 e *Cx. tarsalis* realizam repasto sanguíneo em aves na primavera e início do verão, mas trocam para mamíferos no final do verão e outono (KILPATRICK *et al.*, 2006).

O contato entre o hospedeiro e o mosquito é um processo bidirecional, pois para o mosquito conseguir picar, o animal precisa permitir que ele pouse e inicie a picada. Desta maneira, a defesa do vertebrado também influencia no grau de sucesso da alimentação do mosquito (THONGSRIPONG *et al.*, 2021). Day; Ebert; Edman, (1983) relataram no estudo que camundongos saudáveis foram picados com menos frequência que camundongos infectados com malária, provando que o comportamento defensivo dos vertebrados diminui seu padrão de alimentação.

Outros fatores também podem afetar a escolha pelo hospedeiro, como o tamanho corporal do vertebrado e a qualidade e quantidade do sangue ingerido pelo mosquito. Uma vez que o animal apresente uma maior massa corporal, maior será sua exalação de CO₂ e maior será a área para pousar, e consequentemente maior será a atração do mosquito (GILLIES; WILKES, 1972). Contudo, as propriedades físicas e químicas do sangue das diferentes espécies de vertebrados influenciam o sucesso reprodutivo dos mosquitos, de forma que gera uma seleção preferencial na escolha da fonte alimentar (LYIMO; FERGUSON, 2009).

c) Genética da Fêmea

A preferência alimentar dos culicídeos é uma característica inata, de origem genética. Logo, quando as fêmeas emergem, a tendência do mosquito de se alimentar de determinados vertebrados já está expressa (TAKKEN; VERHULST, 2013). Estudos sugerem que a base genética dessa preferência pode estar relacionada com inversões polimórficas específicas, influenciando a escolha do vertebrado (MAIN *et al.*, 2016). Gillies (1964) em um estudo pioneiro, investigou experimentalmente o potencial da herdabilidade no comportamento de

escolha da fonte alimentar em *An. gambiae*, e demonstrou que durante 6-7 gerações, a espécie aumentou significativamente a preferência por bovinos em relação aos humanos (GILLIES, 1964).

d) Fisiologia da Fêmea

O estado da fêmea pode influenciar sua preferência pelo vertebrado, pois seu principal objetivo é a postura dos ovos. Nesse sentido, as fêmeas mais velhas ou em estado reprodutivo tendem a mudar sua preferência e se alimentar de outras fontes (TAKKEN; VERHULST, 2013). Além disso, alguns mosquitos requerem mais de um repasto sanguíneo, envolvendo geralmente diferentes espécies de vertebrados, para que seja viável realizar a postura dos ovos. Esse comportamento é conhecido como múltiplas alimentações sanguíneas (THONGSRIPONG *et al.*, 2021). *An. gambiae*, por exemplo, precisa fazer pelo menos duas refeições para completar seu primeiro ciclo gonotrófico (SCOTT; TAKKEN, 2012). Da mesma forma, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* exibem graus variados de múltiplas refeições (SCOTT *et al.*, 1993; DELATTE *et al.*, 2010).

1.1.3 Causas e consequências da hematofagia

O comportamento seletivo dos mosquitos ocorre entre diferentes espécies, dentro de populações de uma mesma espécie ou dentro de uma população específica. Isso significa que diferentes grupos de mosquitos de uma mesma espécie podem apresentar preferências distintas ao selecionar vertebrados para realizar o repasto sanguíneo. Este comportamento exerce um papel crucial na transmissão de doenças, pois pode influenciar quais animais são mais frequentemente picados, afetando assim a disseminação de agentes patogênicos (LYIMO; FERGUSON, 2009).

Para os patógenos transmitidos por vetores, o contato vetor-hospedeiro é determinante para o risco de doença, onde a picada do vetor é crítica para a transmissão (GAO *et al.*, 2016). Entre o contato mosquito-humano, durante a fase de sondagem, o mosquito procura por vasos sanguíneos para penetrar a pele do hospedeiro. Ao realizar a picada, libera sua saliva contendo imunomoduladores e anticoagulantes (CHOUMET *et al.*, 2012). Caso o mosquito esteja infectado, é nessa etapa que ocorre a transmissão do vírus presente em sua saliva para o ser humano (CHAMBERLAIN; SUDIA, 1961). O repasto sanguíneo é realizado logo após a liberação da saliva, ou seja, a transmissão já aconteceu (THONGSRIPONG *et al.*, 2021). Mas em caso do ser humano estar infectado, o patógeno é transmitido pelo seu sangue para o mosquito (CARRINGTON; SIMMONS, 2014) (Figura 2).

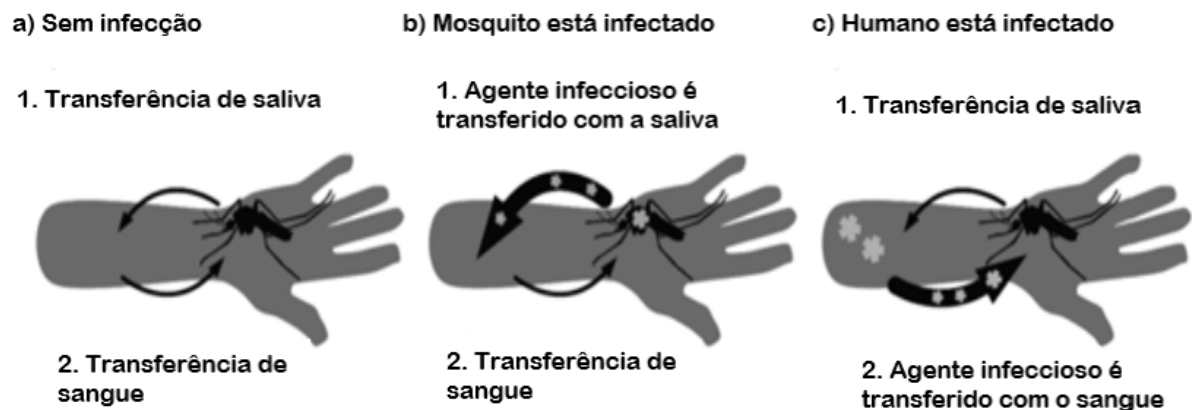


Figura 2. Processos que ocorre durante o contato mosquito-humano: 1) picada e liberação da saliva e 2) sucção de sangue. Duas direções separadas e distintas para a transmissão de patógenos (a). Se o mosquito estiver infectado, o patógeno é transmitido ao humano por meio da saliva (b). Se o humano estiver infectado, o patógeno é transferido ao mosquito durante a ingestão de sangue (c). Fonte: Thongsripong *et al.* (2021).

O sangue ingerido é estocado e digerido no intestino médio do mosquito (GAIO *et al.*, 2011; VEGA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Nessa fase, os patógenos presentes no sangue atravessam o epitélio intestinal do intestino médio, se disseminam do intestino médio para os tecidos secundários, se estabelecendo no organismo do mosquito. Os vírus são transportados pela hemocele até as glândulas salivares (para a transmissão horizontal), onde permanecem até infectarem um novo hospedeiro na próxima picada, e as vezes são transportados para os tecidos reprodutivos (para transmissão vertical) (GAIO *et al.*, 2011) (Figura 3).

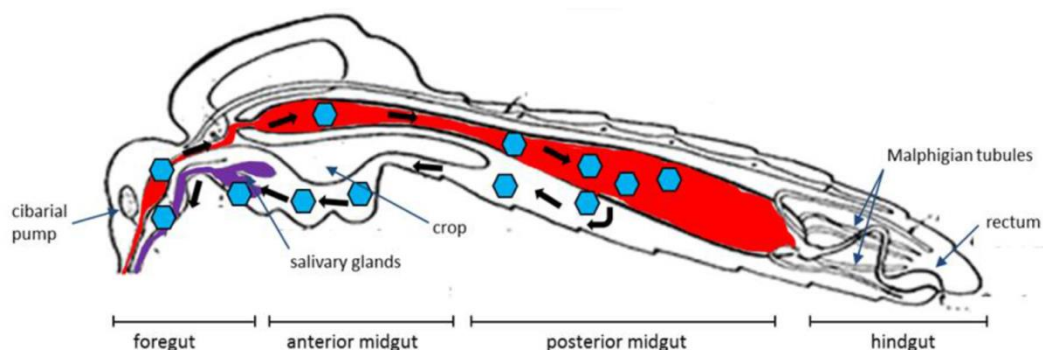


Figura 3. Representação esquemática da infecção bem sucedida por vírus nas barreiras teciduais de um mosquito. Os vírus são representados por hexágonos azuis. Fonte: Franz *et al.* (2015).

As doenças transmitidas por vetores são uma ameaça crescente à população mundial, onde mais de 700.000 pessoas morrem anualmente devido a elas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Em 2022, 249 milhões de casos da malária foram registrados, causando 608.000 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Foram relatados 5,9 milhões de casos de dengue em 2019 e estimou-se que cerca de 3 bilhões de pessoas estavam em risco de infecção (GANGULA *et al.*, 2023). Outros arboviroses como Zika, Chikungunya, Febre Amarela e Febre do Nilo Ocidental também crescem drasticamente e impactam a saúde pública (WEAVER; REISEN, 2010).

Apesar do estado emergencial sobre as arboviroses, são as ações antropogênicas no meio ambiente as principais impulsionadores do surgimento e da distribuição de diversas doenças transmitidas por vetores (KEESING *et al.*, 2010). Tais perturbações, que incluem desmatamento e o uso do solo para urbanização e agricultura, levam a uma cascata de eventos que intensificam o surgimento dessas doenças, como por exemplo a fragmentação florestal. Ambientes desmatados e fragmentados podem resultar na perda de hospedeiros, predadores e habitats de mosquitos, afetando sua dinâmica populacional, abundância, oviposição e os comportamentos de busca de hospedeiros (ORTIZ *et al.*, 2021). Além de diminuir o habitat natural disponível para as espécies selvagens, as mudanças ambientais levam os vetores a procurar novas fontes de alimentação sanguínea e habitats alternativos para reprodução, promovem o encontro entre a vida selvagem e os humanos e a interação entre patógenos, vetores e populações humanas suscetíveis (PATZ *et al.*, 2004).

Diversas espécies de mosquitos que são potenciais vetores de múltiplos patógenos que assolam os seres humanos se beneficiam com o desmatamento, como *Anopheles darlingi* Root, 1926, *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (ORTIZ *et al.*, 2021). Além disso, estudos mostraram que a diversidade de mosquitos atinge o seu pico em habitats florestais intocados, como florestas antigas, enquanto que a abundância de mosquitos em áreas altamente perturbadas aumentam significativamente (LOAIZA *et al.*, 2017, 2019). Casos de febre amarela silvestre no Brasil, por exemplo, aumentaram em áreas epizooticas ou de transição e foram associados ao desmatamento e a fragmentação florestal em larga escala em ambientes urbanizados (ILACQUA *et al.*, 2021).

Essas alterações ambientais também aumentaram o potencial na transmissão de malária nas Américas, principalmente em comunidades onde *An. darlingi* está presente (MACDONALD; MORDECAI, 2019; SALLUM *et al.*, 2019; LAPORTA *et al.*, 2021). Além disso, estudos revelaram uma associação negativa entre a cobertura vegetal e a dengue, de forma

que o risco de dengue diminui em 9% com o aumento de 1% na cobertura vegetal (HUSNINA; CLEMENTS; WANGDI, 2019). Por fim, pesquisas identificaram que regiões pós desmatadas para construções e agricultura apresentam um alto e moderado risco de dengue, respectivamente, em comparação com áreas florestais (NAKHAPAKORN; TRIPATHI, 2005).

1.2 Arbovírus

Arbovírus é o termo utilizado para vírus que são transmitidos por vetores artrópodes, incluindo os mosquitos, carrapatos e flebotomíneos (BECKHAM; TYLER, 2015). Existem mais de 500 arbovírus distribuídos mundialmente, que são classificados em diferentes famílias e gêneros. A classificação ocorre com base em sua morfologia (tamanho, forma, simetria do capsídeo, presença ou ausência de um envelope), propriedades físicas (estruturas do genoma e antígenos), e propriedades biológicas (modo de replicação e transmissão, alcance do hospedeiro e patogenicidade) (DAVIS; BECKHAM; TYLER, 2008). A maioria dos arbovírus clinicamente importantes que causam consequências a saúde dos seres humanos pertencem as famílias Flaviviridae (gênero *Flavivirus*), Togaviridae (gênero *Alphavirus*) e Bunyaviridae (principalmente o gênero *Orthobunyavirus*) e são transmitidos por mosquitos (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000) (Tabela 1).

Tabela 1. Arbovírus transmitidos por mosquitos clinicamente importantes que causam doenças aos seres humanos.

Família	Vírus	Vetor	Hospedeiro Vertebrado	Distribuição
Flaviviridae	Dengue	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	Humanos e primatas não humanos	Ásia, África e Américas
	Febre Amarela	<i>Aedes</i> spp., <i>Haemagogus</i> spp.	Humanos e primatas não humanos	África Subsariana e América do Sul
	Zika	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	Humanos e primatas não humanos	Ásia, África e Américas
	Febre do Oeste do Nilo	<i>Culex</i> spp.	Aves	América do Norte e Sul, Ásia, Europa Oriental e Oceania
	Encefalite de Saint Louis	<i>Culex</i> spp.	Aves, primatas não humanos e marsupiais	Américas
	Rocio	<i>Psorophora ferox</i> , <i>Aedes scapularis</i>	Aves	América do Sul
Togoviridae	Chikungunya	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	Primatas não humanos, Humanos	Ásia, África e Américas
	Mayaro	<i>Haemagogus</i> spp.	Aves, humanos e primatas não humanos	América do Sul

	Encefalite Equina Venezuelana	<i>Aedes</i> sp., <i>Culex</i> spp.	Roedores, aves	Américas
	Encefalite Equina Oriental	<i>Culex</i> spp.	Aves	Américas
	Encefalite Equina Ocidental	<i>Culex</i> spp.	Aves, coelhos, equinos	Américas
Bunyaviridae	Oropouche	<i>Aedes serratus</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i>	Humanos, preguiças, primatas não humanos e pássaros	América do Sul e Central
	Febre do Vale do Rift	<i>Aedes</i> spp., <i>Culex</i> spp., <i>Mansonia</i> spp., <i>Anopheles</i> spp.	Gado, ovelhas, cabras	África e Oriente Médio

Fonte: Adaptada de Gubler (2001).

Sendo isolados pela primeira vez na África e na América do Sul, os arbovírus necessitam de pelo menos dois hospedeiros para a manutenção do vírus, um vertebrado primário e um vetor artrópode primário. Além disso, eles apresentam uma distribuição geográfica limitada aos parâmetros ecológicos que comandam o seu ciclo de transmissão, como a temperatura, precipitação e padrões de vegetação. Esses fatores influenciam a área de distribuição de seus vetores e dos reservatórios naturais (GUBLER, 2001).

O principal reservatório natural para os arbovírus são espécies de pequenos mamíferos e pássaros, que compartilham a característica de serem capazes de desenvolver e sustentar a viremia para transmitir de volta aos artrópodes quando picados. Para os humanos infectados, o nível de viremia raramente é alto o suficiente para transmitir a infecção de volta aos mosquitos ou carrapatos, sendo assim, os seres humanos geralmente não estão envolvidos no ciclo enzoótico dos arbovírus. Alguns vírus como a dengue, Chikungunya, Zika e a encefalite equina venezuelana são exceções a essa regra, pois podem apresentar um alto título de viremia em humanos (DAVIS; BECKHAM; TYLER, 2008).

Desta maneira, existem dois ciclos de transmissão dos arbovírus: silvestre ou enzoótico, no qual o patógeno é amplificado em hospedeiros vertebrados silvestres ou domesticados, e os humanos podem ser infectados como um hospedeiro sem saída. E ciclo urbano ou epidêmico, onde os patógenos são transmitidos entre os humanos sem a necessidade de amplificação em animais, sendo considerado uma rota indireta de transmissão de humano para humano (MARTINA *et al.*, 2017). As epidemias e epizootias em humanos e animais domésticos, respectivamente, geralmente só ocorrem quando o vírus é introduzido no ambiente peridoméstico, por meio de vetores secundários para hospedeiros reservatórios secundários (GUBLER, 2001).

A competência vetorial (CV) para um arbovírus é afetada por fatores genéticos do mosquito, como a imunidade inata e barreiras teciduais, que controlam a capacidade do mosquito de adquirir, manter e transmitir o vírus. Como os fatores genéticos podem variar entre linhagens, populações e espécie de mosquito, e somente alguns arbovírus são adaptados para superá-los, é possível presumir que os arbovírus e os mosquitos vetores estão frequentemente coevoluindo (FRANZ *et al.*, 2015). Durante o inverno, por exemplo, os mosquitos infectados que não morrem com o frio ficam dormentes, e tornam-se ativos novamente quando o tempo fica mais quente, restabelecendo o ciclo de transmissão (NASCI *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas das arboviroses nos seres humanos podem variar entre síndrome hemorrágica, síndrome neurológica, doença febril, erupções cutâneas e artralgia (CLETON *et al.*, 2012). No Brasil, os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica em virtude de o país estar situado em uma área predominantemente tropical, com região de pântano (Pantanal) no centro-oeste, região de savana (Cerrado) na área do planalto central, região seca (Caatinga) no interior do nordeste e extensas florestas na Região Amazônica e Mata Atlântica no leste, sudeste e litoral sul do país. Essas regiões apresentam condições ecológicas favoráveis para a presença e ampliação dos arbovírus (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Descrevemos abaixo as características de alguns arbovírus que tem os seres humanos como hospedeiros

1.2.1 Família Flaviviridae

A família Flaviviridae é dividida em três gêneros, mas apenas o gênero *Flavivirus* apresenta arbovírus clinicamente importantes no mundo, como dengue, febre amarela e Zika. A maioria dos *Flavivirus* são zoonóticos e dependem de vetores e animais não humanos para sua sobrevivência, replicação e dispersão, com suas principais rotas de transmissão sendo mosquitos e carrapatos (CLETON *et al.*, 2012). Aqueles transmitidos por mosquitos são divididos em dois grupos: um compreende vírus associados aos *Aedes*, os quais causam vazamento vascular e doenças hemorrágicas; e outro compreende vírus transmitidos predominantemente por *Culex*, que cruzam a barreira hematoencefálica para infectar neurônios e outras células cerebrais, causando doenças encefálicas (GOULD *et al.*, 2017). Embora os *Flavivirus* apresentem preferência por células de órgãos específicos, levando o organismo a uma determinada doença ou síndrome, eles podem também ser encontrados em outras células, como células inflamatórias, mononucleares e dendríticas (GUARNER; HALE, 2019).

A urbanização, o desmatamento e os movimentos populacionais contribuíram para a expansão dos *Flavivirus* em áreas anteriormente não endêmicas. Além disso, as viagens realizadas para as áreas endêmicas e o aumento da temperatura global devido às mudanças climáticas permitiram que alguns *Flavivirus* como a dengue se expandissem para outros territórios. Dado a distribuição global dos *Flavivirus* e o impacto que apresentam na saúde pública, conhecer a epidemiologia dos vírus é essencial para prevenir e reduzir a propagação viral (DAEP; MUÑOZ-JORDÁN; EUGENIN, 2014).

1.2.1.1 Vírus da Dengue (DENV)

Ao que parece, o vírus da dengue teve sua origem na África Ocidental e pode ter sido transportado para as Américas por meio de navios negreiros junto com o mosquito africano *Ae. aegypti* (HOLMES; TWIDDY, 2003). Sendo descrito pela primeira vez no Japão em 1943 e no Havaí em 1945, a dengue era originalmente um vírus de primatas não humanos. Atualmente, ela apresenta quatro sorotipos (DENV1-DENV4), que provavelmente evoluíram de origens silvestres de forma independente ao longo de 1000 anos (BRAACK *et al.*, 2018).

Ao atingir regiões predominantemente tropicais (Américas, África, Ásia, Oceania e Austrália), a DENV se adaptou aos seres humanos e ao ambiente doméstico, de forma que o ciclo silvestre não é mais necessário para a sua manutenção, sendo os seres humanos e mosquitos o suficiente para a transmissão do vírus. O principal vetor *Ae. aegypti*, mas *Ae. albopictus* e *Aedes polynesiensis* Marks, 1951 são incluídos como vetores secundários (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). No Brasil, possíveis surtos da DENV podem ter ocorrido em 1846, no estado do Rio de Janeiro. No século XIX, ocorreram surtos no nordeste, sudeste e sul do país. Durante a década de 1980, o vírus foi reintroduzido no Brasil e desde então surtos de todos os sorotipos tem ocorrido (FIGUEIREDO, 2000).

1.2.1.2 Febre Amarela (YFV)

Assim como o vírus da dengue, a febre amarela se originou na África e se espalhou pelo Novo Mundo por meio do tráfico de escravizados entre o século XV ao início do século XX. Após chegar nas Américas, o YFV iniciou um ciclo silvestre envolvendo primatas não humanos e mosquitos *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 e *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924). No ciclo urbano, o vetor da doença é a espécie *Ae. aegypti*. Estudos epidemiológicos moleculares indicaram que a linhagem ancestral do vírus se originou na África

entre 2000 a 4000 anos atrás, e se diversificou do vírus sul-americano há aproximadamente 200-400 anos (GOULD *et al.*, 2017).

No Brasil, os surtos são descritos desde o século XVII. Uma epidemia começou em Salvador em 1849 e chegou no Rio de Janeiro com marinheiros doentes. Entre 1850 e 1902, no Rio de Janeiro, ocorreram em média 58000 mortes causadas por febre amarela. Em 1928 a YFV reapareceu no Rio de Janeiro e em 1937 foi desenvolvida e testada a primeira vacina (FIGUEIREDO, 2000).

1.2.1.3 Vírus Zika (ZIKV)

O vírus Zika, assim como o DENV e o YFV, é originário da África, e foi descrito pela primeira vez a partir de um macaco *Rhesus* na Floresta Zika, em Uganda em 1947, tendo como vetor o *Aedes africanus* (Theobald, 1901) (DICK, 1952). A partir da África Oriental, o vírus se espalhou para a África Ocidental e Ásia, onde permaneceu endêmico por décadas, até que a linhagem asiática causou uma epidemia na Ilha Yap, na Micronésia, em 2007 (HADDOW *et al.*, 2012). A partir daí, o ZIKV se espalhou para a Polinésia Francesa no final de 2013 (JOUANNIC *et al.*, 2016), se propagando para diversas ilhas do Pacífico entre 2014 e 2016 (PETERSEN *et al.*, 2016) e chegando no Brasil no início de 2015 (ZINSZER *et al.*, 2017).

Na África, o vírus foi mantido em um ciclo silvestre envolvendo primatas não humanos e mosquitos *Aedes*, com humanos como hospedeiros acidentais. Entretanto, em diversos lugares não há mais a existência do ciclo silvestre, de forma que a transmissão ocorre em um ciclo urbano envolvendo humano-mosquito-humano, com *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* como vetores primários. As infecções de Zika foram associadas a síndrome de Guillain-Barré, e a microcefalias em bebês quando as mulheres grávidas são infectadas (PETERSEN *et al.*, 2016).

1.2.2 Família Togovaridae

O gênero *Alphavirus*, um grupo de vírus que pertencem à família Togaviridae, apresentam uma ampla distribuição ao redor do mundo, sugerindo uma origem em ambientes aquáticos. Acredita-se que esses vírus tenham emergido em habitats aquáticos ancestrais, possivelmente em zonas costeiras ou estuários, onde interações entre mosquitos e vertebrados eram comuns. A disseminação dos *Alphavirus* provavelmente ocorreu quando esses vírus passaram a infectar mosquitos, que então migraram para diferentes regiões, incluindo o Novo Mundo (Américas) e o Velho Mundo (Europa, Ásia e África). Essa transição dos oceanos para

ambientes terrestres permitiu que os *Alphavirus* invadissem uma variedade de hospedeiros terrestres, incluindo mamíferos e aves. Os mosquitos, especialmente dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, desempenham um papel crucial na transmissão desses vírus para humanos e outros animais, tornando-se vetores de importância médica. O controle dessas populações de mosquitos é essencial para prevenir surtos de doenças associadas aos *Alphavirus*, como a febre de Ross River e a encefalite equina. Assim, a compreensão da ecologia e da evolução dos *Alphavirus* é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e prevenção (FORRESTER *et al.*, 2012).

1.2.2.1 Vírus Chikungunya (CHIKV)

A Chikungunya se originou na África Oriental, com o primeiro caso diagnosticado com precisão pela primeira vez na Tanzânia, em 1952. Em 1953 ocorreram surtos na África e no Sudeste Asiático. Em 2005, linhagens do vírus se espalharam para ilhas do Oceano Índico e em 2006 ocorreu uma epidemia na Índia. Até 2013, o vírus não era reconhecido nas Américas, até que ocorreram relatos de infecção no Caribe. Em 2014, se espalhou por 43 países americanos, incluindo o Brasil, com o primeiro caso sendo relatado no Amapá (WEAVER; FORRESTER, 2015).

O ciclo silvestre envolve mosquitos do gênero *Aedes* arbóreos, como o *Ae. africanus*, entre primatas não humanos com transmissão ocasional nos humanos, e o ciclo urbano é transmitido por mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (CHEN *et al.*, 2016).

1.2.2.2 Vírus Mayaro (MAYV)

O principal vetor do vírus Mayaro são os mosquitos do gênero *Haemagogus*, que habitam as florestas, com mamíferos sendo os hospedeiros primários. No entanto, *Ae. aegypti* e aves podem ser considerados vetores e hospedeiros secundários. Os seres humanos são infectados de forma acidental ao adentrar nas florestas tropicais úmidas. O vírus foi identificado pela primeira vez em Trinidad, em 1954 e posteriormente foram relatados diversos casos em países da América do Sul, como Peru, Bolívia e Venezuela. No Brasil, foi encontrado pela primeira vez na área do Rio Guamá, do Estado do Pará, e posteriormente na cidade de Manaus (FIGUEIREDO, 2007).

1.2.3 Família Bunyaviridae

A família Bunyaviridae é composta por cinco gêneros, mas a maioria dos vírus transmitidos por mosquitos de importância médica ocorre dentro do gênero *Orthobunyavirus*, com exceção do vírus da febre do Vale do Rift, que ocorre no gênero *Phlebovirus*. Mosquitos *Culex* são os principais vetores, seguido por *Aedes* e por fim *Anopheles* em menor extensão (HORNE; VANLANDINGHAM, 2014).

1.2.3.1 Vírus Oropouche (OROV)

O vírus Oropouche faz parte do gênero *Orthobunyavirus* e é restrito às áreas tropicais da América Central e América do Sul, apresentando três sorotipos (I-III). No ciclo silvestre, o vírus é transmitido pelos mosquitos *Aedes serratus* (Theobald, 1901) e *Cx. quinquefasciatus*, e apresenta como reservatório preguiças, marsupiais, primatas e aves. O ciclo urbano envolve o homem e o mosquito *Culicoides paraensis* (Goeldi, 1905), como principal vetor (MOURÃO *et al.*, 2009).

O OROV foi isolado pela primeira vez em 1950, em Trinidad, e no Brasil foi relatado no Estado do Pará em 1980. Posteriormente, de 1980 a 2004 o vírus se espalhou para o norte do país, envolvendo Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia e Tocantins; e a região do nordeste, no Maranhão (NUNES *et al.*, 2005).

1.2.3.2 Vírus da Febre do Vale do Rift (RVFV)

O vírus da febre do vale do Rift pertence ao gênero *Phlebovirus*, e foi descrito pela primeira vez no Quênia, em 1931. Sendo transmitido por mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* e *Eretmapodites*, a circulação do vírus atualmente é restrita à África e ao Oriente Médio. O ciclo silvestre envolve ovelhas, cabras e gado, e os humanos são infectados durante os surtos em animais por meio de aerossol ou contato com os animais infectados (FLICK; BOULOY, 2005).

1.3 Identificação da Fonte Alimentar

A heterogeneidade de hospedeiros vertebrados pode ter um maior efeito na transmissão de patógenos por vetores, visto que muitos hospedeiros podem ser capazes de transmitir somente um patógeno (MARM KILPATRICK *et al.*, 2006). No entanto, de acordo com a

diversidade de animais, é possível que alguns patógenos se adaptem a hospedeiros específicos (KENNEY; BRAULT, 2014). Esse conjunto de fatores demonstra a complexidade e a importância de identificar as espécies de animais que são hospedeiros reservatórios de diversas patologias (HAYDON *et al.*, 2002).

A identificação da fonte alimentar dos mosquitos permite investigar seus padrões de alimentação e preferências de animais, ajudando na compreensão sobre sua história de vida, além dos fatores que podem interferir na busca e escolha do vertebrado e na influência que esses hábitos possuem em sua sobrevivência e no sucesso reprodutivo (LYIMO; FERGUSON, 2009; TAKKEN; VERHULST, 2013).

De acordo com Borland and Kading (2021), é estimado que cerca de 25% das epidemias que afetaram os humanos no século XX tenham sido causadas devido a dispersão promovida por vetores artrópodes hematófagos, demonstrando a importância de estudos para a vigilância epidemiológica e ecológica de vetores (BORLAND; KADING, 2021). Ou seja, conhecer o hábito alimentar de mosquitos hematófagos é essencial para determinar seu papel como vetor na manutenção e transmissão de patógenos entre os vertebrados (FARAJI *et al.*, 2014), assim como obter uma melhor compreensão de suas interações e seu processo co-evolutivo (KENT, 2009).

Os métodos de identificação de repasto sanguíneo realizado por artrópodes ingurgitados evoluíram ao longo dos anos (BORLAND; KADING, 2021). Os primeiros estudos dependiam da observação direta no campo, armadilhas de isca, características citológicas do sangue e de técnicas sorológicas. Com o tempo, os três primeiros métodos deixaram de ser usados após a comprovação da sua baixa eficácia (TEMPELIS, 1975).

Estudos posteriores passaram a ser realizados de forma massiva apenas por técnicas sorológicas, como o ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (BEIER *et al.*, 1988) e o teste de precipitina (WASHINO; TEMPELIS, 1983). Entretanto, técnicas como a inibição da hemaglutinação passiva (TEMPELIS, 1975) e a imunofluorescência (MCKINNEY; SPILLANE; HOLDEN, 1972) surgiram e também foram usadas com o mesmo objetivo, mas que, devido a sua complexidade, se tornaram quase que inviáveis para o uso (WASHINO; TEMPELIS, 1983).

O teste de precipitina foi desenvolvido no início do século XX e foi o método mais usado para detectar a fonte alimentar de artrópodes hematófagos (DAVIS; PHILIP, 1931; NIEBYLSKI; SAVAGE, 1994; SAMUEL *et al.*, 2004; SWAMI; SRIVASTAVA, 2012; ALENCAR *et al.*, 2015b). O método é considerado um teste de fácil execução e interpretação,

no qual requer poucos equipamentos e um simples preparo de reagentes. Seu preparo envolve a suspensão do repasto sanguíneo em um diluente e sua reação direta com o antisoro, permitindo obter informações gerais da alimentação do mosquito (TEMPELIS, 1975). Porém, ele é categoricamente limitado pois possui uma baixa sensibilidade e especificidade para espécies, limitando a identificação dos vertebrados em ordem, família ou gênero. Os resultados dos testes somente se tornam mais específicos ao utilizar antisoros para espécies que já haviam sido testadas (WASHINO; TEMPELIS, 1983).

Subsequentemente, o ensaio imunoenzimático ELISA se tornou popular na década de 80 e apresentou uma maior sensibilidade na reação em comparação com o teste de precipitina, com o qual se tornou possível alcançar melhores resultados com pouca quantidade de sangue ingurgitado (GOMES *et al.*, 2001). O método consiste em realizar uma ligação entre o conjugado enzimático e o antígeno ou anticorpo do possível vertebrado e os componentes sorológicos do repasto sanguíneo realizado pelo mosquito. A reação específica é detectada a partir da mudança de sua coloração, obtendo-se assim, o resultado do teste (BEIER *et al.*, 1988). Apesar dessa técnica não superar a especificidade e facilidade que o teste de precipitina possui (GOMES *et al.*, 2001), muitos estudos a utilizaram para detectar a fonte alimentar dos culicídeos, buscando inclusive, a associação com os patógenos que esses insetos transmitem (EDRISSIAN; HAFIZI, 1982; BARBAZAN *et al.*, 2009; VALERIO *et al.*, 2010; ADUGNA; YEWHELEW; GETU, 2021).

Foi a partir da década de 90, com o advento de ferramentas moleculares e com uma crescente riqueza de sequências de DNA disponíveis publicamente, que os pesquisadores conseguiram romper as barreiras que o teste de precipitina e o ensaio imunoenzimático possuíam, passando a identificar a fonte alimentar dos mosquitos a nível de gênero e espécie (BORLAND; KADING, 2021). A Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*” - PCR) seguida do sequenciamento do DNA do produto da PCR está entre as técnicas mais diretas e específicas atualmente existentes, no entanto, seu elevado custo pode dificultar o processamento de um grande número de amostras (MELGAREJO-COLMENARES; CARDO; VEZZANI, 2022).

O procedimento utilizando essas ferramentas, em geral, baseia-se na extração do DNA do sangue ingurgitado pelo artrópode, amplificação por PCR de um fragmento homólogo à hospedeiros específicos e posterior sequenciamento baseado no método de Sanger do produto da PCR. A partir da análise e dados do sequenciamento, se realiza uma busca em banco de dados públicos por sequências idênticas ou semelhantes ao repasto sanguíneo (REEVES *et al.*,

2016). Nesse contexto, como a PCR consiste em amplificar fragmentos pequenos e direcionados de DNA para produzir milhares de cópias de um fragmento de um gene específico (RAJALAKSHMI, 2017), os primers utilizados para essa amplificação precisam ser de regiões conservadas homólogas a potenciais fontes alimentares, com o objetivo de que amplifique somente o DNA dos hospedeiros, mas não o DNA dos artrópodes (KENT, 2009).

Ao longo dos anos, diferentes marcadores genéticos passaram a ser usados visando identificar o repasto sanguíneo de artrópodes hematófagos, como os genes nucleares e elementos repetitivos e o DNA mitocondrial. Coulson *et al.* (1990) foram os primeiros a analisarem DNAs de hospedeiros humanos utilizando sequências de DNA repetitivo (microssatélites). Devido à alta taxa de mutação, essas sequências permitem analisar a variação intraespecífica, dentro e entre populações, pois são baixas as chances de dois indivíduos não relacionados terem o mesmo padrão (COULSON *et al.*, 1990; KEVEN; WALKER; VENTA, 2019). Assim como os microssatélites, o RNA Ribossomal (rRNA) também se apresenta de forma repetitiva, com um elevado número de cópias e estrutura e função conservadas. Devido a isso, também pode ser utilizado na identificação do repasto sanguíneo, no entanto, é mais comumente presente em estudos sobre carrapatos (PICHON *et al.*, 2005).

Os Elementos Transponíveis Alu e a Prepronociceptina (PNOC) são outros genes nucleares que também podem ser utilizados com o mesmo objetivo (BATZER; DEININGER, 2002; SLAMA *et al.*, 2015). Apesar desses genes estarem presentes como marcadores nesses trabalhos, eles apresentam certa limitação: sua sensibilidade não é tão alta, faltam sequências comparativas nos bancos de dados públicos e alguns genes precisam ser direcionados para um vertebrado em específico (Alu existem apenas em primatas) (BATZER; DEININGER, 2002; HADJ-HENNI *et al.*, 2015).

Em comparação aos genes nucleares, o DNA mitocondrial (mtDNA) é o marcador genético alvo de sequenciamento mais popular e vantajoso para a identificação das fontes alimentares de insetos hematófagos (KENT, 2009). As mitocôndrias são organelas herdadas pela mãe, presentes em todos os eucariotos e contém genomas independentes de 16,5 kb, existindo em grandes números (centenas a milhares por célula). Devido a esse alto número de cópias, são facilmente amplificadas por PCR, sendo preferível sua utilização em relação ao DNA nuclear (TAANMAN, 1999). A organização do mtDNA, a raridade de inserções e deleções, a falta de íntrons devido à sua origem procariótica e a capacidade de evoluir de cinco a dez vezes mais rápido que os genes nucleares, permite com que ele seja utilizado para descobrir grupos taxonômicos mais amplos, como ordens e famílias, e para distinguir

subpopulações dentro de um grupo específico (BORLAND; KADING, 2021; MELGAREJO-COLMENARES; CARDO; VEZZANI, 2022).

Dentre os genes mitocondriais mais usados para identificação de fonte alimentar de mosquitos, se destacam o Citocromo c Oxidase Subunidade 1 (COI) e o Citocromo b (Cytb). Em 2003, Herbert *et al.* (2003) propôs que o COI apresentava um fragmento de 650pb em sua extremidade 5' e o chamou de código de barras do DNA (do inglês “*barcoding*”). Esse código de barras representa uma sequência específica de DNA associada a um táxon específico, e foi provado que perfis únicos de COI poderiam ser usados para identificar organismos a nível de espécie (HEBERT *et al.*, 2003). Em comparação ao rRNA, o COI possui alguma vantagem pois sua taxa de mutação chega a ser três vezes maior (KNOWLTON; WEIGT, 1998), e seu uso é facilitado, visto que as sequências de animais conhecidos estão depositadas em bancos de dados públicos, como o *Barcode of Life Data System* (BOLD – www.barcodingoflife.org) e o *Genbank* (construído e distribuído pelo *National Center for Biotechnology Information* – NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov) (BENSON, 2006; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

Mesmo o COI encontrando-se amplamente presente na literatura, é o Cytb o gene mitocondrial mais utilizado para identificar a fonte alimentar de artrópodes hematófagos (KENT, 2009). Inicialmente ele foi delimitado para resolver questões evolutivas dos vertebrados e para fins forenses (KOCHER *et al.*, 1989), mas logo passou a estar presente em diversos trabalhos para determinar a fonte do repasto sanguíneo de mosquitos (NGO; KRAMER, 2003; MOLAEI *et al.*, 2008; FLIES *et al.*, 2016; GYAWALI *et al.*, 2019). Sua eficiência foi comprovada devido ao elevado número de cópias como gene mitocondrial e uma variação genética suficiente entre os vertebrados para uma identificação confiável (NORRIS; KENT, 2005). Quando comparado ao COI, o Cytb apresenta uma variação intraespecífica semelhante, no entanto, ele possui uma maior variação nos pares de bases em uma sequência mais curta, uma taxa de falso positivo inferior a metade da do COI e um maior valor preditor positivo (TOBE; KITCHENER; LINACRE, 2010). Além disso, assim como o COI, o Cytb apresenta uma gama de sequências de vertebrados disponíveis no banco de dados do *Genbank*, proporcionando uma maior precisão na identificação da fonte alimentar (BENSON, 2006).

1.3.1 A PCR e Seus Desafios na Detecção da Fonte Alimentar

Para a identificação da alimentação sanguínea baseada em PCR ser bem sucedida, os fragmentos do DNA do hospedeiro vertebrado não podem estar degradados, pois irão servir como modelo para a amplificação (REEVES *et al.*, 2016). Alguns fatores podem afetar a

integridade desse DNA, como a extensão da digestão (MUKABANA *et al.*, 2002) e a degradação do DNA durante o período de conservação antes da extração (KING *et al.*, 2008).

Logo após a ingestão, o sangue é gradualmente digerido por enzimas digestivas (como a tripsina e aminopeptidase) e o DNA do hospedeiro é degradado ao longo do tempo. O processo de degradação varia de acordo com a espécie hematófaga, nos mosquitos, por exemplo, a maioria das fêmeas digere o repasto sanguíneo, oviposita e começa a procurar a próxima alimentação dentro de 48h a 72h, com a digestão ocorrendo rapidamente (NGO; KRAMER, 2003; OSHAGHI *et al.*, 2006). O período de maior pico da digestão é em torno de 30h após a refeição (BILLINGSLEY; HECKER, 1991), de forma que, interrompê-la em até 32h, após o sangue ser ingerido, se torna o limiar para o sucesso da amplificação do DNA. É comumente aceito que após 36h-72h o DNA do hospedeiro se torna indetectável (NGO; KRAMER, 2003; OSHAGHI *et al.*, 2006), todavia, estudos recentes mostraram o repasto sanguíneo em humanos sendo identificado em até 84h-120h (TALEBZADEH *et al.*, 2023).

Além da digestão, a preservação eficaz implementada imediatamente após a coleta, assim como o transporte e o armazenamento subsequente, também irão influenciar integralmente as estruturas da molécula de DNA do hospedeiro (MUKABANA; TAKKEN; KNOLS, 2002), uma vez que a preservação imediata interrompe os processos digestivos, aumentando a probabilidade de amplificação por PCR (SEUTIN; WHITE; BOAG, 1991). O método ideal de armazenamento imediato das amostras pós coletadas é em ultra-freezers -80°C, visto que o DNA consegue permanecer estável por tempo indeterminado até que a extração aconteça (MTAMBO *et al.*, 2006). Entretanto, as restrições logísticas que englobam o campo raramente permitem que essa preservação consiga ser feita, dessa forma, diversos estudos demonstraram alternativas que mitigaram a fragmentação do DNA.

Santos *et al.* (2019) apresentaram sucesso na amplificação do DNA em todas as fêmeas de mosquitos ingurgitados que foram testadas e armazenadas em freezer a -20°C por 180 dias, obtendo o mesmo resultado quando comparado com o armazenamento em um ultrafreezer de -80°C (SANTOS *et al.*, 2019). Posteriormente, Bellekom *et al.* (2023) compararam o armazenamento das amostras em etanol a 95% em um freezer a -20°C com o armazenamento em etanol a 95% em temperatura ambiente. Para ambos os métodos, os DNAs dos hospedeiros permaneceram amplificáveis por até nove meses (BELLEKOM *et al.*, 2023). Outros dois procedimentos que também são utilizados, porém de forma reduzida, para prolongar a integridade do DNA são: (1) a dessecação das espécimes de artrópodes (VALINSKY *et al.*, 2014); (2) transferência do repasto sanguíneo em papel de filtro para transporte e

armazenamento, por meio da técnica *Dried Blood Sample* (DBS) (ORSBORNE *et al.*, 2019). Invariavelmente, qualquer que seja a metodologia possível alcançada em grupos de estudos, garantir uma preservação eficiente está integralmente relacionado ao maior sucesso de amplificação e detecção da fonte alimentar de mosquitos hematófagos.

Há outros fatores não menos importantes que também podem influenciar na eficácia da identificação do hospedeiro, como o procedimento de extração do DNA, que apresentou uma melhora de 17% quando usado kits comerciais da Qiagen® (MARTÍNEZ-DE LA PUENTE *et al.*, 2013). O tamanho do amplicon de PCR e o número de cópias do gene são determinantes ainda mais importantes, visto que sequências maiores se decompõe mais rápido durante a digestão do que sequências curtas, por esse motivo que o DNA de múltiplas cópias e de pequenos fragmentos, como o Cytb, são melhores para essa identificação (TALEBZADEH *et al.*, 2023).

1.4 Detecção de Arbovírus

A detecção e a previsão da atividade de um vírus em populações de vetores e o diagnóstico preciso de infecção em um hospedeiro vertebrado, são fatores fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e tratamento de arbovirose. No entanto, em algumas regiões, não é dada a devida atenção a possíveis casos de doenças infecciosas, de modo que alguns vírus são ignorados a níveis populacionais até que se espalhem ou ressurgam e se tornem epidêmicos em outras áreas (CARROLL *et al.*, 2015).

Dessa forma, uma possível estratégia de vigilância seria investigar a presença de diversos tipos virais em um grande número de pessoas e animais, para que fosse possível detectar o vírus antes de sua disseminação. A vigilância de animais sentinelas, por exemplo, é uma abordagem de monitoramento para arbovírus zoonóticos, na qual animais domésticos como gado, porcos e galinhas são monitorados e fornecem um alerta precoce da transmissão viral em uma determinada região (HALL *et al.*, 2012). No entanto, a coleta de sangue ou *swabs* de inúmeros indivíduos é desafiadora, e a solução para superar esse obstáculo é investigar diretamente o vetor da doença.

Os métodos sorológicos, como os testes imunoenzimáticos ELISA, são amplamente aplicados para o diagnóstico de diversas patologias, incluindo Zika, dengue, Chikungunya e febre amarela. Esses testes podem ser classificados como diretos, quando detectam o próprio vírus, ou indiretos, quando os alvos são os anticorpos produzidos em resposta a infecção. Embora sejam rápidos e baratos, esses testes apresentam algumas limitações, como a

possibilidade de reatividade cruzada entre vírus relacionados, que pode resultar em falso-positivo. Além disso, o período de janela imunológica, entre 3-5 dias após a infecção, antes que os anticorpos possam ser detectados, aumentam as chances de resultados falsos-negativos (VARGHESE; DE SILVA; MILLAR, 2023).

A identificação de um vírus em vetores apresenta algumas semelhanças quanto a identificação de fonte alimentar, como a coleta, o armazenamento dos espécimes, amplificação do material viral e o sequenciamento. O armazenamento correto é de suma importância para o sucesso do estudo, envolvendo uso de gelo seco, nitrogênio líquido, etanol ou tampão estabilizador de RNA, com o objetivo de preservar o RNA viral e inativar os patógenos ao mesmo tempo (BRINKMANN; NITSCHKE; KOHL, 2016). Atualmente, os métodos de detecção viral em vetores se beneficiam de tecnologias mais rápidas, sensíveis e específicas, como os protocolos de PCR e sequenciamento. Além da detecção em vetores, técnicas moleculares e sorológicas são frequentemente utilizadas para o diagnóstico viral em hospedeiros vertebrados humanos e não humanos (HALL *et al.*, 2012).

A PCR transcriptase reversa (RT-PCR) é a técnica molecular mais utilizada para diagnósticos de infecção por arbovírus, bem como na detecção de sequências virais em *pools* de vetores. O método apresenta uma amplificação direcionada de ácidos nucleicos e um alto nível de sensibilidade e especificidade, permitindo a identificação viral em pequenas amostras. O uso de pares de *primers* para amostras virais geralmente são projetados para vírus ou famílias de vírus específicos, capazes de amplificar amplicons pequenos, contíguos ou sobrepostos do genoma viral de interesse (QUICK *et al.*, 2017). No entanto, a principal limitação da técnica é a necessidade de um termociclador convencional ou termociclador de tempo real, este último precisa ser equipado com filtros ópticos para detecção da fluorescência gerada durante a reação de amplificação (VARGHESE; DE SILVA; MILLAR, 2023).

A escolha de uma técnica para vigilância de arbovírus depende dos equipamentos de laboratório, recursos e experiência em bioinformática. O Sequenciamento baseado na metodologia de Sanger é amplamente utilizado dado sua taxa de precisão (99,99%), o baixo custo e a montagem das sequências serem personalizadas e fáceis de aprender. Sua desvantagem é a capacidade de sequenciar apenas um único e curto fragmento de DNA/RNA por vez (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018). O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) é uma ferramenta poderosa para investigação de arbovirose em artrópodes vetores. Nos últimos anos, o NGS tem sido cada vez mais utilizado para o monitoramento da presença de vírus em amostras clínicas e ambientais, como no caso dos vírus do Nilo Ocidental (WILSON *et al.*, 2017), Zika

e Chikungunya (SARDI *et al.*, 2016). Além disso, o NGS possui a capacidade de sequenciar genomas de indivíduos de uma mesma espécie ou espécies diferentes simultaneamente, para organismos cultivados ou diretamente de vetores. No entanto, embora ele seja mais sensível, o NGS demanda maior tempo, é mais caro e exige equipamentos avançados, além de uma equipe altamente qualificada (PATIÑO *et al.*, 2024).

Com o avanço da biologia molecular, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas, como os métodos de amplificação isotérmica de ácido nucleico (INAATs), que permitem a amplificação de ácidos nucleicos a uma temperatura constante, sem a necessidade de termocicladores. Embora a técnica seja rápida e de baixo custo, ela apresenta como desvantagem a possibilidade de amplificações inespecíficas (VARGHESE; DE SILVA; MILLAR, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

A realização deste estudo justifica-se pela necessidade de aprofundar o conhecimento acerca de potenciais vetores de arboviroses em áreas de alta biodiversidade, como a Mata Atlântica. Este bioma, que sofre com intenso desmatamento e fragmentação, é um dos mais ameaçados do Brasil, e tais eventos acarretam alterações nos padrões ecológicos das espécies, incluindo insetos vetores.

Identificar as fontes alimentares dos mosquitos permite compreender suas interações com diferentes grupos de vertebrados, entendendo melhor o papel que desempenham na transmissão de patógenos. Com isso, o estudo contribui para a vigilância epidemiológica e auxilia no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças transmitidas por esses insetos.

Além disso, a investigação de *Flavivirus* em populações de mosquitos é fundamental para o monitoramento da circulação viral em ambientes silvestres. A presença desses vírus em vetores silvestres pode indicar a existência de ciclos enzoóticos da doença, com potencial de expansão para áreas urbanas, aumentando o risco de surtos epidêmicos. Com isso, compreender a dinâmica de transmissão possibilita criar estratégias de vigilância epidemiológica mais eficientes, reduzindo os riscos de surtos e epidemias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade, o hábito alimentar e detectar a presença de *Flavivirus* nos mosquitos capturados em remanescente de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, avaliando sua importância sob o aspecto epidemiológico.

3.2 Objetivos Específicos

1. Agrupar as espécies de mosquitos de importância médica em relação ao hábito alimentar;
2. Analisar as fontes alimentares ingeridas por fêmeas de mosquitos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das áreas amostrais da REGUA e Sítio Recanto Preservar capturadas em armadilha luminosa CDC, estado do Rio de Janeiro, Brasil;
3. Identificar se há associação entre as espécies de mosquitos e as fontes alimentares;
4. Detectar a circulação de *Flavivirus* em populações de mosquitos em dois remanescentes de Mata Atlântica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Declaração de Ética

Toda a pesquisa foi realizada de acordo com a licença científica número 44333 fornecida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Chico Mendes de Biodiversidade Conservação (ICMBio), Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO). Os mosquitos foram coletados com o consentimento e cooperação de proprietários, moradores, e autoridades locais. Todos os membros da equipe de coleta foram vacinados contra a Febre Amarela e cientes dos riscos potenciais nas áreas em estudo.

4.2 Área de Estudo

O estudo foi desenvolvido em duas áreas de fragmento da Mata Atlântica presentes nos municípios de Silva Jardim e Cachoeira de Macacu, ambos do estado do Rio de Janeiro (Figura 4).

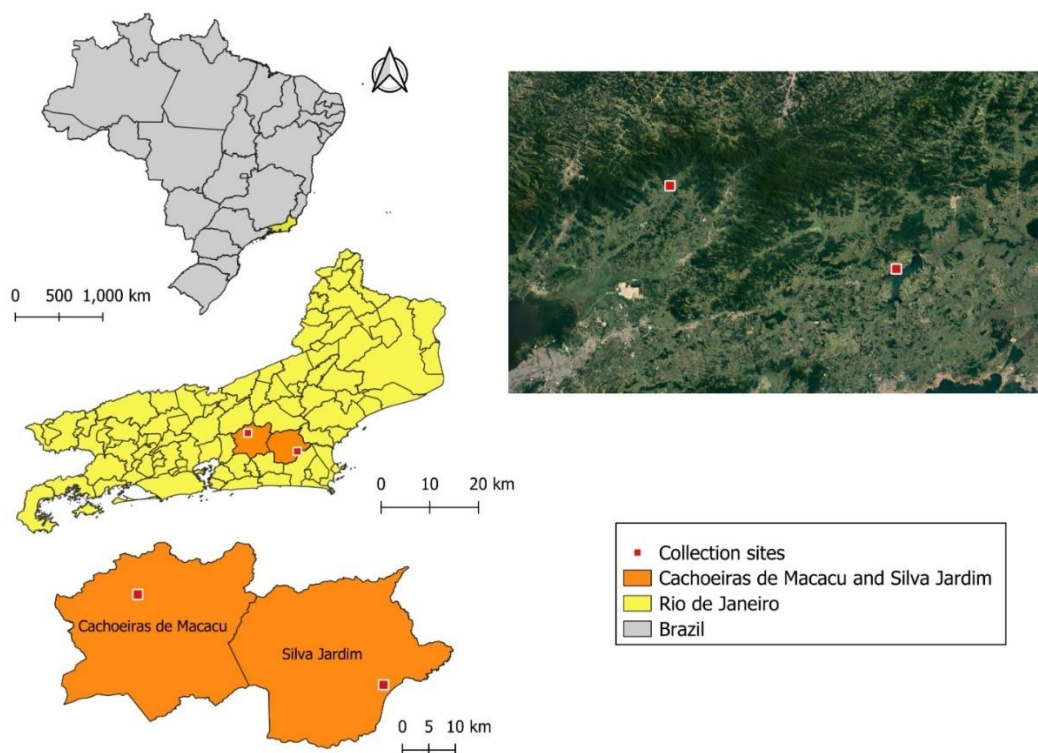


Figura 4. Localização dos pontos de amostragem nos Municípios de Cachoeiras de Macacu e Silva Jardim no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

4.2.1 Município de Silva Jardim

As amostragens no município de Silva Jardim foram realizadas no sítio Recanto Preservar, no estado do Rio de Janeiro (figuras 5 e 6). Esse ponto amostral está inserido na Área de Proteção Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio São João (APA Bacia Hidrográfica do Rio São João), cujas coordenadas são: 22°37'10.7"S 42°18'59.5"W.



Figura 5. Ponto amostral Sítio Recanto Preservar, localizado no município de Silva Jardim.
Fonte: Cecília Mello.



Figura 6. Ponto amostral Sítio Recanto Preservar, localizado no município de Silva Jardim.
Fonte: Cecília Mello.

A Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado foi criada em 2002 com o objetivo de proteger e conservar os remanescentes de Floresta Atlântica e o patrimônio ambiental e cultural da região, regular os recursos hídricos e o

parcelamento do solo e garantir o uso racional dos recursos naturais. Essa Unidade de Conservação (UC) abrange o estado do Rio de Janeiro, nos municípios de Araruama, Cabo Frio, Cachoeiras de Macacu, Casimiro de Abreu, Rio Bonito, Rio das Ostras e Silva Jardim (ICMBIO, 2008).

A região da APA apresenta uma alta precipitação nos meses de novembro a abril (correspondendo cerca de 70% do total anual), com uma média anual no Município de Silva Jardim de 2.400mm. A época seca abrange os períodos de maio a setembro (TAKIZAWA, 1995). Ela está inserida na Região Ecológica da Floresta Ombrófila Densa, tendo áreas montana e submontana, e as Florestas de Terras Baixas (IBGE, 2012). A Floresta Montana ocorre em altitudes de 500 a 1500 metros, nas encostas da Serra. A Floresta Submontana ocorre em ambientes de encosta de até 500 metros de altitude, entre baixadas e a Floresta Montana. E as Florestas de Terras Baixas ocorrem nas baixadas aluvionares, sendo uma das paisagens mais ameaçadas da Mata Atlântica devido a fragmentação. Ecossistemas associados da Mata Atlântica também estão presentes na região, como os manguezais e as restingas (FERNANDES, 2005).

A Mata Atlântica de Baixada foi drasticamente modificada devido a diversas ações antrópicas como a implementação de cultivos e pastagens, e a urbanização. Como consequência, ocorreu a perda e a redução do habitat de várias espécies, que por conseguinte desapareceram ou tiveram sua população reduzida, como ocorreu com o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), que deu o nome da APA (CASTRO, 2002). Além deste, também se encontram na lista de extinção a preguiça de coleira (*Bradypus torquatus*) e a onça-parda (*Puma concolor capricornensis*) (ICMBIO, 2008) (figura 7).

Das populações de animais presentes, a avifauna abrange cerca de 275 espécies, incluindo a garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*), gavião-de-rabo-branco (*Buteo albicaudatus*) e o urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*). Para os mamíferos, estão presentes espécies exóticas, como o sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (figura 8). Além disso, segundo a coleção herpetológica abrange cerca de 42 anfíbios e 20 répteis (ICMBIO, 2008).

Mico-Leão-Dourado



Preguiça de Coleira



Onça-Parda

Figura 7. Animais em risco de extinção. Fonte: Shutterstock (mico-leão-dourado), Henrique Nogueira, 2014 (preguiça de coleira) e Adriano Gambarini, 2008 (onça-parda).

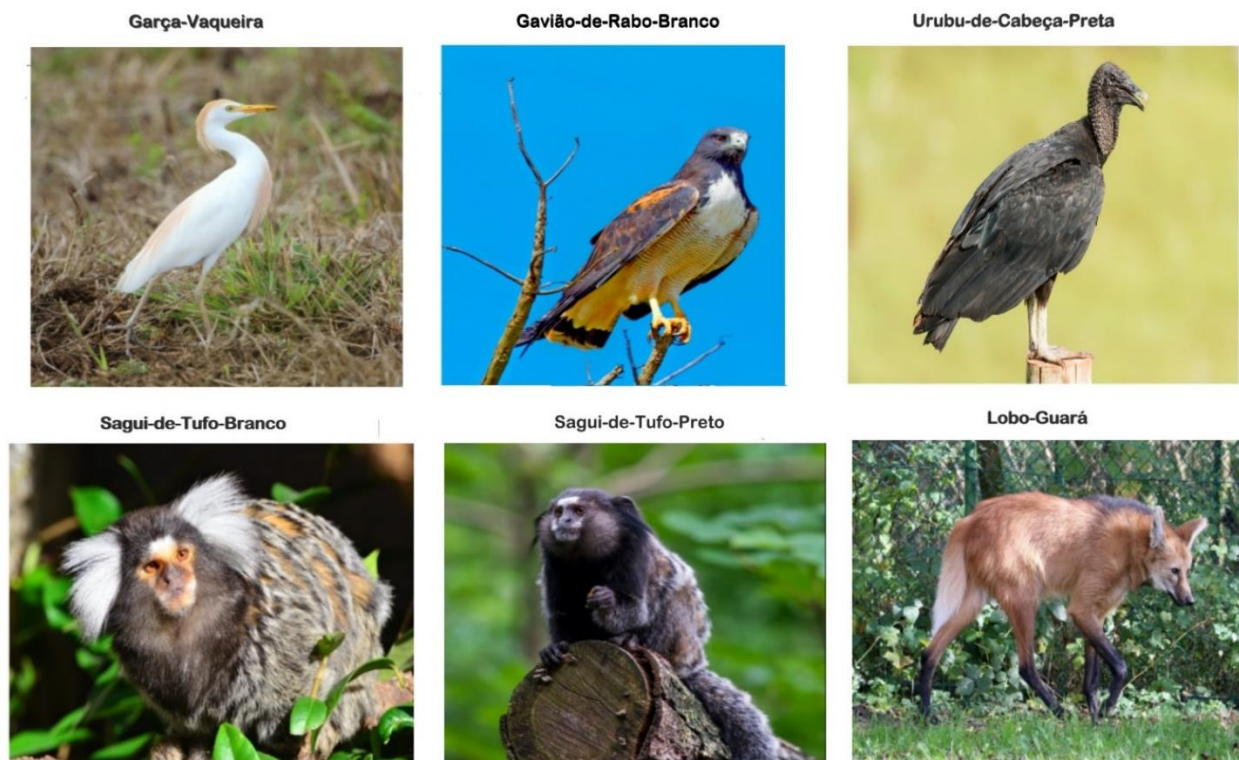


Figura 8. Fauna que ocorre na APA da Bacia do Rio São João. Fonte: Gilvan Moreira, 2016 (garça-vaqueira), Claudio Lopes, 2012 (gavião-de-rabo-branco), Luiz Bravo, 2015 (urubu-de-cabeça-preta), Rum Bucolic Ape (sagui-de-tufo-branco, sagui-de-tufo-preto), Wikimedia Commons (lobo-guará).

4.2.2 Município de Cachoeira de Macacu

As amostragens em Cachoeira de Macacu foram realizadas na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) criada em 1996, que está localizada na sub-bacia da Baía de Guanabara, no município de Cachoeira de Macacu, no estado do Rio de Janeiro, cujas coordenadas são: S: 22° 27' 10.309" e W: 42° 46' 13.011". Parte da área da REGUA está inserida no Parque Estadual dos Três Picos, que juntamente com o Parque Nacional da Serra dos Órgãos e com a Estação Ecológica Estadual do Paraíso, protegem uma enorme área contínua de Mata Atlântica, cobrindo grande parte da região da Serra dos Órgãos, responsável por ser uma das áreas de maior biodiversidade do estado (ALMEIDA-GOMES *et al.*, 2014).

Em suas áreas mais baixas, a REGUA apresenta uma grande variedade de espécies pioneiras e periféricas, culminando em comunidades mais próximas do clímax à medida que se aproxima de sua parte mais alta. A altitude varia entre 30 a 2.000 metros acima do nível do mar, sendo que acima dos 700m, a reserva é coberta por florestas em grande parte não modificadas que abrigam uma enorme diversidade de plantas e animais (ALENCAR *et al.*, 2015a).

A reserva apresenta uma área de 7400 hectares, uma cobertura vegetal do tipo Floresta Ombrófila Densa, que é caracterizada por apresentar em abundância fanerófitos, lianas e epífitas e por possuir um clima tipicamente tropical de elevadas temperaturas (média de 25°C) e de alta precipitação durante o ano (somente de 0 a 60 dias secos) (IBGE, 2012). A vegetação é composta por três subtipos: floresta pluvial aluvial densa na parte inferior, com relevo plano e pastagens que estão em reflorestamento; Floresta tropical densa de várzea, localizada nas áreas de planície costeira, cobrindo encostas suaves e em reflorestamento; Floresta submontana, localizada na porção mais alta, contemplando as áreas montanhosas acidentadas e considerada uma área controle para estudos de reflorestamento (VELOSO; RANGEL FILHO; LIMA, 1991).

Desta forma, a reserva é composta quase que integralmente por áreas florestais (94,78%), compreendendo diferentes níveis de conservação, indo desde de florestas secundárias em estágios iniciais de sucessão, até florestas maduras e intocadas (ROCHA *et al.*, 2007). O clima da região detém verões chuvosos e quentes (outubro a março) e invernos frios e secos (abril a setembro), com temperatura média anual de 23°C, com máximas em janeiro e fevereiro e mínimas em junho. Já a precipitação média anual fica em torno de 2.560mm, com destaque para dezembro e janeiro e junho e julho, sendo os meses mais e menos chuvosos, respectivamente (KURTZ; DE ARAUJO, 2000; ALVARES *et al.*, 2013).

A fauna é constituída por uma alta diversidade, envolvendo cerca de 67 espécies de anfíbios, 455 espécies de aves, 45 espécies de répteis (tendo como destaque o jacaré de papo amarelo - *Caiman latiroistes*) e 61 espécies de mamíferos (tendo como destaque o muriqui - (*Brachyteles arachnoides*) (figura 9). A ictiofauna é pouca conhecida na região, mas espécies endêmicas da Serra do Mar já foram encontradas como: *Homodiaetus sp.*, *Characidium vidali* e *Bryconamericus ornaticeps* (GUAPIAÇU GRANDE VIDA, 2016).



Figura 9. Fauna presente na REGUA. Fonte: iNaturalist (jacaré de papo amarelo), SEMIL (muriqui).

Para o presente estudo foram estabelecidos dois pontos amostrais:

Ponto 1 - Trilha Amarela: A Trilha Amarela está localizada próxima a sede da reserva, apresentando uma altitude de 35 a 50 metros, um terreno plano coberto por pastagens e florestas secundárias restauradas. Apresenta baixíssima altimetria e circunda toda a extensão do lago e a vegetação apresenta uma mistura de espécies nativas que foram reintroduzidas. Com propósito de evitar homogeneidade espacial na comunidade, foram plantadas espécies nativas pioneiras, secundárias iniciais e tardias e clímax de forma aleatória, de forma que as espécies pioneiras possuísem maior proporção. Além disso, também foram plantadas espécies frutíferas exóticas para atrair aves frugívoras (Figura 10).



Figura 10. Ponto amostral Trilha Amarela na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA).
Fonte: Dálete Alves.

Ponto 2 - Trilha Verde: A Trilha Verde é localizada na parte mais alta, na zona submontana, em uma altitude de 170 a 600 metros. Apresenta floresta densa e diversificada, submontana e montana, com terreno de floresta secundária restaurada. Detém três estratos: árvores emergentes (atingindo cerca de 45m de altura), copa principal (5-10m de altura) e vegetação de sub-bosque (Figura 11).



Figura 11. Ponto amostral Trilha Verde na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA). Fonte: Dálete Alves

3.3 Captura dos espécimes, armazenamento e identificação das fêmeas ingurgitadas

As capturas de mosquitos foram realizadas durante dois dias consecutivos em cada período de amostragem, utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, instaladas a 2 metros de altura e distribuídas de forma aleatória (Figura 12). As armadilhas foram expostas no período das 18:00h às 8:00h do dia seguinte. No ponto amostral sítio Recanto Preservar, as amostragens foram realizadas nos meses de fevereiro, março, abril, agosto, setembro e outubro de 2023. Na REGUA, as capturas ocorreram uma vez por mês, de março de 2023 a fevereiro de 2024. A disposição das armadilhas em todos os pontos amostrais foi de 200m, 400m, 600m, 800m e 1000m, representando a distância entre cada armadilha.

Os espécimes capturados foram acondicionados em gaiolas de polietileno, rotuladas segundo a procedência, e armazenados em caixas térmicas, sendo transportados vivos ao laboratório de apoio de campo. Posteriormente, os mosquitos foram anestesiados pela exposição de vapor de clorofórmio e mantidos em uma geladeira (4°C) para interrupção do processo digestivo. Em seguida, os exemplares foram transportados até o Laboratório de

Diptera, na Fiocruz e postos em um freezer -20°C, onde permaneceram por no máximo 10 dias até serem devidamente identificados.

Os espécimes machos e fêmeas foram separados, e a identificação foi realizada em uma mesa refrigerada para a preservação do DNA do vertebrado alimentado. Toda identificação ocorreu a partir da observação direta dos caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio óptico consultando as descrições respectivas das espécies, utilizando chaves dicotômicas elaboradas por Lane (1953a, b), Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), Forattini (2002) e Marcondes & Alencar (2010).

Após as devidas identificações, as fêmeas foram transportadas para o Laboratório de Análises Virais (LAV), na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e acondicionadas em um ultra-freezer a -80°C, aguardando a etapa de análise molecular.



Figura 12. Armadilha luminosa de CDC utilizada na captura dos mosquitos. Fonte: Sérgio Machado.

4.4 Avaliação do hábito alimentar através da análise molecular

Na etapa de extração do DNA, cada mosquito teve seu abdome e cabeça separados por um bisturi, onde o conteúdo intestinal foi macerado individualmente em microtubo de 1,5mL contendo 20μL de 1,0x tampão TE (Trizma, EDTA) e 20μL de 20ng/mL proteinase K. Para realizar a extração do DNA, foi utilizado o kit da TransGen Biotech: EasyPure Viral DNA/RNA (code#ER201-02), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 300μL

de tampão BB5 ao conteúdo macerado, posteriormente o conteúdo foi agitado em um vortex (vortexados) e incubado a 56°C por 20 min. Após a incubação, 300µL de etanol foi adicionado e a mistura foi transferida para uma coluna e centrifugada a 12000x g por 1 minuto. Foi acrescentado 500µL do tampão WB5 na coluna e centrifugado novamente. O DNA foi eluído em 50µL de água tipo 1 com solução de preservação fornecida pelo kit. Após extração, foi realizada a quantificação e verificação da qualidade do material em um espectrofotômetro Denovix DS-11 FX (Denovix Inc. Wilmington, US) para micro volumes no comprimento de onda de 260nm, e só seguiram para a etapa seguinte as amostras que apresentavam boa qualidade. Por fim, o DNA foi armazenado novamente no ultrafreezer -80 °C.

A identificação das fontes alimentares dos mosquitos foi investigada utilizando dois pares de iniciadores que amplificam um fragmento de DNA mitocondrial (mtDNA) do gene citocromo b (CytB) (tabela 2). Esses *primers* são considerados universais para os vertebrados e possuem a vantagem de não amplificar o DNA dos mosquitos, amplificando somente o repasto sanguíneo realizado por eles (MALMQVIST *et al.*, 2004).

Tabela 2. Sequências dos dois pares de *primers* e o tamanho de seus amplicons utilizados para a identificação das fontes alimentares.

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Fontes bibliográficas
L14841	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	305	(KOCHER <i>et al.</i> , 1989)
H15149	AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	305	(KOCHER <i>et al.</i> , 1989)
VF	GAGGMCAAATATCATTCTGAGG	457	(TOWNZEN; BROWER; JUDD, 2008)
VR	TAGGGCVAGGACTCCTCCTAGT	457	(TOWNZEN; BROWER; JUDD, 2008)

Abreviações: VF: vertebrado forward; VR: vertebrado reverse

O protocolo utilizado para os *primers* L14841 / H15149 foi adaptado de Dias *et al.* (2010). A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, contendo: 2mM de MgCl₂; 2mM de dNTP; 1,0µM de cada *primer*; 1,0x de tampão 10x; 0,4U de Taq DNA Polimerase; 5µL de DNA e água ultrapura para completar a solução final. Para a amplificação, foi realizada uma ciclagem de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e a extensão final a 72°C por 5 minutos.

O protocolo utilizado para os *primers* VF/VR foi adaptado de Gyawali *et al.* (2019). A reação de PCR também foi realizada em volume final de 25µL, contendo: 0,5µM para ambos os *primers*, 1,5mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 1,0x de tampão 10x, 0,4U de Taq DNA Polimerase, 5µL de DNA da amostra e água ultrapura para completar o volume final. Para a

amplificação, foi realizada uma ciclagem de 95°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos, e a extensão final por 72°C por 10 minutos.

Após a PCR, 5µL do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Em seguida, os géis foram colocados em um recipiente contendo solução de brometo de etídio 0,05% por 5 a 10 minutos para a visualização das bandas em transluminador UV a 260nm.

4.5 Investigação de *Flavivirus*

A investigação para detectar a presença de *Flavivirus* foi realizada de forma individual para todos os espécimes coletados, incluindo as fêmeas ingurgitadas usadas para a identificação de fonte alimentar. Como o kit usado para a extração se presta para extrair DNA e RNA, o material usado foi o mesmo oriundo da extração de DNA.

Após a extração, foi montado o cDNA com o kit Platus Transcriber RNase H-cDNA First Strand kit (Sinapse Inc. #S1402), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, com o cDNA já obtido, foram realizadas as reações de PCR usando um par de *primers*, para a região NS5 do genoma viral dos *flavivirus*. Estes *primers* foram modificados a partir do protocolo descrito por Patel, *et al.* (2013), e abrangem todos os *Flavivirus* de importância médica (tabela 3).

Tabela 3. Sequências do pare de *primers* e o tamanho de seus amplicons utilizados para a identificação de *Flavivirus*.

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Fontes bibliográficas
Flavi All S	TAC AAC ATG ATG GGG AAR CGW GAR AA	240-320	(PATEL et al., 2013)
Flavi All AS 2	GTG TCC CAG CCN GCK GTR TCR TC	240-320	(PATEL et al., 2013)

Abreviações: S: sense orientation; VR: antisense orientation

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, contendo: 0,5µM para ambos os *primers*, 1,5mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 1,0x de tampão 10x, 0,2U de Taq DNA Polimerase, 2,0µL de cDNA da amostra e água ultrapura para completar o volume final. Para a amplificação, foi realizada uma ciclagem de 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C

por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e a extensão final por 72°C por 5 minutos.

Após a PCR, se seguiu o mesmo protocolo feito anteriormente em gel de agarose. Por fim, foi realizada a purificação dos produtos de PCR para todos os materiais que amplificaram, usando o protocolo estabelecido no PCR Purification Kit (Cellco Biotec do Brasil Ltda. cat#DPK-106L). Após a purificação, as amostras amplificadas foram enviadas para o sequenciamento baseado na metodologia de Sanger, que foi realizado na Plataforma de Sequenciamento RPT-01A do Instituto Oswaldo Cruz -RJ (FIOCRUZ).

4.6 Análise das Sequências

As sequências obtidas do sequenciamento foram tratadas através do software GENEIOUS PRIME (versão 2024.0). A identificação da fonte alimentar consistiu em realizar um alinhamento, a partir do algoritmo MUSCLE, dos dados resultantes do sequenciamento com sequências depositadas na base de dados do GenBank (NCBI: *National Center for Biotechnology Information* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando a ferramenta BLAST. Foi considerado um vertebrado como fonte alimentar quando as sequências apresentaram uma similaridade de >95%. Da mesma maneira ocorreu para a identificação das arboviroses, os *contigs* foram alinhados e comparados com as sequências de referências que estão depositadas no BLAST e foram considerados similares >95%.

Após realizadas as análises das sequências, aquelas que atingiram os requisitos necessários foram encaminhadas ao banco de dados do GenBank para depósito. Nas figuras 13 e 14 pode-se observar os dois fluxogramas resumindo todo o processo de análise molecular realizado para investigação da fonte alimentar e de arbovírus respectivamente.

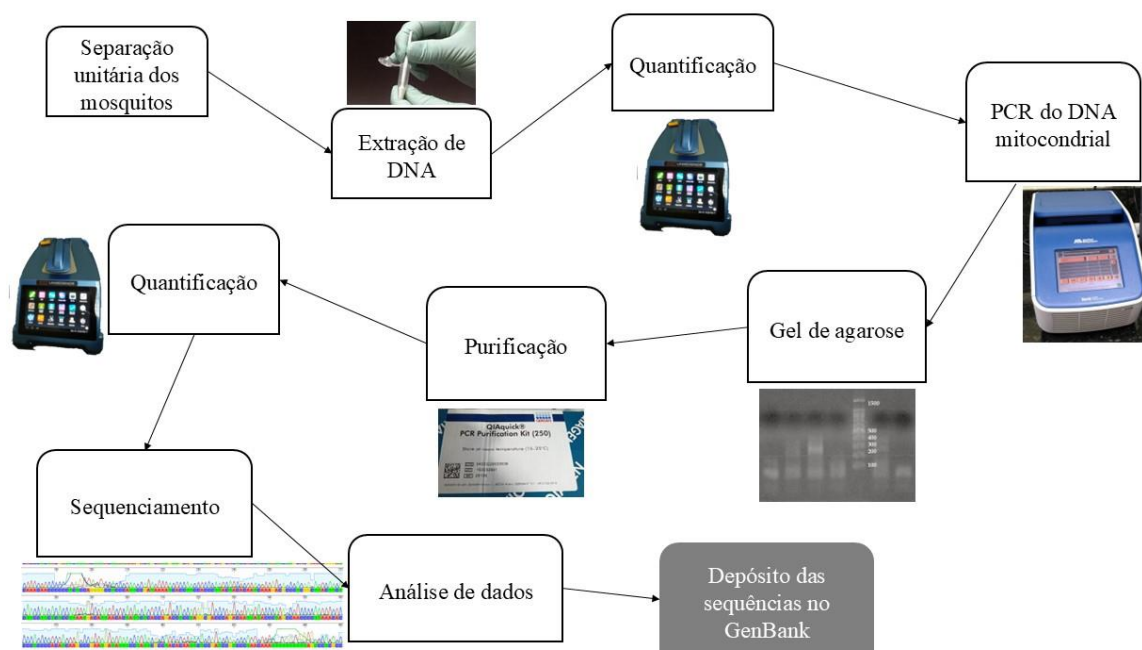


Figura 13. Fluxograma resumindo o passo a passo da investigação molecular para fonte alimentar de mosquitos. Fonte: Adaptado de Sérgio Machado.

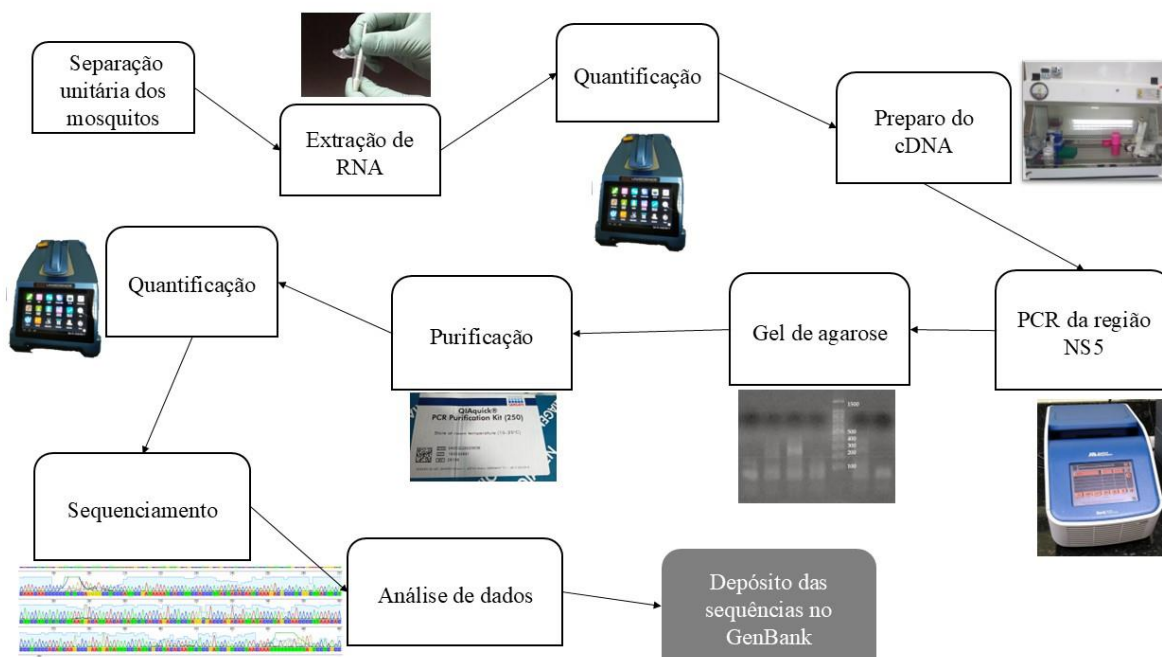


Figura 14. Fluxograma resumindo o passo a passo da investigação molecular de arbovírus. Fonte: Adaptado de Sérgio Machado.

4.7 Análise Estatística

Foi utilizado o índice de Morisita para investigar a similaridade nas fontes alimentares entre diferentes espécies de culicídeos, com o objetivo de compreender como essas espécies se sobrepõem ou se diferenciam em suas dietas. O dendrograma de similaridade, baseado no índice de Morisita, ajuda a identificar se as espécies compartilham fontes alimentares similares (indicando sobreposição de nicho) ou se possuem dietas distintas, o que poderia sugerir preferências alimentares específicas ou um comportamento mais oportunista.

5. RESULTADOS

As amostragens realizadas na Reserva Ecológica de Guapiáçu (REGUA) e no sítio Recanto Preservar compreenderam um total de 1714 mosquitos capturados (tabela 4). No sítio Recanto Preservar, foram capturados 653 espécimes, compreendendo 21 espécies, sendo todas fêmeas (tabela 5). Na REGUA, 1061 mosquitos foram capturados, distribuídos em 980 para o ponto amostral da Trilha Amarela, compreendendo 31 espécies (tabela 6); e 81 para o ponto amostral da Trilha Verde, compreendendo 17 espécies (tabela 7). Na Trilha Amarela, foram 25 espécimes machos e 955 fêmeas e na Trilha Verde foram 80 fêmeas e 1 macho.

Tabela 4. Quantidade total de mosquitos coletados nos pontos amostrais do Sítio Recanto Preservar e da REGUA, localizados no estado do Rio de Janeiro, Brasil

Localidade	N
Sítio Recanto Preservar	653
REGUA	1061
Total	1714

Tabela 5. Espécies capturadas no ponto amostral Sítio Recanto Preservar no município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade total de fêmeas e machos.

Espécies	Fêmeas	Machos	N
<i>Aedes (Och.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	184	0	184
<i>Ae. (Och.) serratus</i> (s.l.) (Theobald, 1901)	12	0	12
<i>Ae. (Stg.) albopictus</i> (Skuse, 1895)	6	0	6
<i>Anopheles (Nys.) albitarsis</i> Lynch-Arribáizaga, 1878	1	0	1

<i>Anopheles</i> sp.	2	0	2
<i>An. (Nys.) evansae</i> (Brèthes, 1926)	12	0	12
<i>Coquillettidia (Coq.) chrysosoma</i> (Edwards, 1915)	1	0	1
<i>Cq. (Rhy.) chrysonotum</i> (Peryassú, 1908)	6	0	6
<i>Cq. (Rhy.) fasciolata</i> (Lynch-Arribálzaga, 1891)	49	0	49
<i>Cq. (Rhy.) shannoni</i> (Lane & Antunes, 1937)	6	0	6
<i>Culex (Cux.)</i> spp.	19	0	19
<i>Culex (Mel.)</i> spp.	22	0	22
<i>Haemagogus (Hag.) leucocelaenus</i> (Dyar & Shannon, 1924)	4	0	4
<i>Limatus durhamii</i> Theobald, 1901	1	0	1
<i>Mansonia (Man.) humeralis</i> Dyar & Knab, 1916	1	0	1
<i>Mansonia (Man.) titillans</i> (Walker, 1848)	29	0	29
<i>Psorophora (Jan.) albipes</i> (Theobald, 1907)	121	0	121
<i>Psorophora (Jan.) ferox</i> (Humboldt, 1819)	169	0	169
<i>Sabethes (Pey.) identicus</i> Dyar & Knab, 1907	2	0	2
<i>Sabethes</i> sp.	2	0	2
<i>Uranotaenia (Ura.) pulcherrima</i> Lynch-Arribálzaga, 1891	4	0	4
Total	653	0	653

Tabela 6. Espécies capturadas no ponto amostral da Trilha Amarela na Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade total de fêmeas e machos.

Espécies	Fêmeas	Machos	N
<i>Aedeomyia (Ady.) squamipennis</i> (Lynch Arribálzaga, 1878)	4	0	4
<i>Aedes (Och.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	6	0	6
<i>Ae. (Och.) serratus (s.l.)</i> (Theobald, 1901)	3	0	3
<i>Ae. (Stg.) albopictus</i> (Skuse, 1895)	2	0	2
<i>Anopheles (Nys.) albitarsis</i> Lynch-Arribálzaga, 1878	51	0	51
<i>An. (Nys.) deaneorum</i> Rosa-Freitas, 1989	2	0	2
<i>An. (Ano.) evandroi</i> Costa Lima, 1937	1	0	1
<i>An. (Nys.) evansae</i> (Brèthes, 1926)	42	0	42
<i>An. (Ano.) maculipes</i> (Theobald, 1903)	4	0	4
<i>Anopheles</i> sp.	3	0	3
<i>Chagasia fajardi</i> (Lutz, 1904)	1	0	1
<i>Coquillettidia (Rhy.) albicosta</i> (Chagas, 1908)	21	0	21
<i>Cq. (Rhy.) chrysonotum</i> (Peryassú, 1922)	3	0	3
<i>Cq. (Rhy.) fasciolata</i> (Lynch-Arribálzaga, 1891)	139	0	139

<i>Cq. (Rhy.) juxtamansonia</i> (Chagas, 1907)	12	0	12
<i>Cq. (Rhy.) venezuelensis</i> (Theobald, 1912)	25	0	25
<i>Culex</i> sp.	183	0	183
<i>Cx. (Mel.) clarki</i> Evans, 1924	0	21	21
<i>Cx. (Cux.)</i> sp.	114	0	114
<i>Cx. (Mcx.)</i> sp.	9	0	9
<i>Cx. (Mel.) erraticus</i> (Dyar & Knab, 1906)	1	1	2
<i>Cx. (Mel.) pereyrai</i> Duret, 1967	0	2	2
<i>Cx. (Mel.)</i> spp.	235	0	235
<i>Mansonia (Man.) indubitans</i> Dyar & Shannon, 1925	1	0	1
<i>Ma. (Man.) titillans</i> (Walker, 1848)	73	0	73
<i>Psorophora (Jan.) ferox</i> (Humboldt, 1819)	2	0	2
<i>Uranotaenia davisii</i> Lane, 1943	3	0	3
<i>Ur. (Ura.) calosomata</i> Dyar & Knab, 1907	2	0	2
<i>Ur. (Ura.) geometrica</i> Theobald, 1901	3	1	4
<i>Ur. (Ura.) pulcherrima</i> Lynch-Arribálzaga, 1891	8	0	8
<i>Wyeomyia</i> sp.	2	0	2
Total	955	25	980

Tabela 7. Espécies capturadas no ponto amostral da Trilha Verde na Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade total de fêmeas e machos.

Espécies	Fêmeas	Machos	N
<i>Aedes (Och.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	1	0	1
<i>Ae. (Pro.) argyrothorax</i> (Bonne-Wepster & Bonne, 1920)	9	0	9
<i>Anopheles (Ker.) cruzii</i> Dyar & Knab, 1908	2	0	2
<i>Culex. (Cux.)</i> spp.	12	0	12
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i> Theobald, 1903	0	1	1
<i>Cx. (Mcx.)</i> sp.	2	0	2
<i>Haemagogus (Hag.) leucocelaenus</i> (Dyar & Shannon, 1924)	1	0	1
<i>Limatus durhamii</i> Theobald, 1901	1	0	1
<i>Psorophora (Jan.) ferox</i> (Humboldt, 1819)	3	0	3
<i>Runchomyia (Run.) reversa</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	2	0	2
<i>Sabethes (Sab.) chloropterus</i> (Humboldt, 1819)	1	0	1
<i>Trichoprosopon compressum</i> Lutz, 1905	3	0	3
<i>Tri. digitatum</i> (Rondani, 1848)	1	0	1
<i>Tr. pallidiventer</i> (Lutz, 1905)	6	0	6

<i>Trichoprosopon</i> sp.	1	0	1
<i>Wyeomyia</i> (Pho.) <i>edwardsi</i> (Lane & Cerqueira, 1942)	8	0	8
<i>Wyeomyia</i> sp.	27	0	27
Total	80	1	81

4.1 Identificação das Fontes Alimentares

A análise dos 1714 mosquitos capturados nos pontos amostrais do sítio Recanto Preservar e da REGUA, revelou que apenas 145 eram fêmeas ingurgitadas (8,46%). A análise molecular do conteúdo sanguíneo dessas fêmeas obteve apenas 55 amostras (37,93%) amplificadas. Adicionalmente, foi possível identificar a presença de alguns repastos mistos (dois ou mais vertebrados de uma mesma fêmea) em algumas amostras, incluindo humanos, anfíbios e aves. Em contrapartida, 90 amostras de fêmeas ingurgitadas (62,07%) não apresentaram amplificação do material genético para os *primers* testados. Inicialmente, as amostras com sangue foram submetidas à PCR utilizando os *primers* L14841/H15149, na qual resultaram na amplificação do *cytb* em 24 das 55 amostras. Posteriormente, foi testado os *primers* VF/VR, que resultaram na amplificação das 55 amostras.

4.1.1 Ponto amostral sítio Recanto Preservar, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro.

A análise dos 653 mosquitos capturados no sítio Recanto Preservar revelou apenas 21 fêmeas ingurgitadas (3,21%). No total, apenas oito amostras (9,5%) tiveram sucesso na amplificação, sendo possível a identificação do repasto sanguíneo de quatro delas. Das quatro restantes, uma retornou com sequência de mosquito e as outras três não tiveram nenhum retorno de similaridade pelo BLAST. As quatro amostras com repastos identificados corresponderam a três fêmeas de *Psorophora ferox* (von Humboldt, 1819) e uma de *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) (Tabela 8).

Tabela 8. Espécies ingurgitadas capturadas no ponto amostral Sítio Recanto Preservar no município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade de fonte alimentar das respectivas espécies.

Espécies	Fêmeas Ingurgitadas	Fontes Alimentares
----------	---------------------	--------------------

<i>Aedes (Och.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	5	1
<i>Ae. (Och.) serratus</i> (s.l.) (Theobald, 1901)	1	-
<i>Anopheles (Nys.) albitarsis</i> Lynch-Arribáizaga, 1878	1	-
<i>An. (Nys.) evansae</i> (Brèthes, 1926)	1	-
<i>Coquillettidia (Rhy.) fasciolata</i> (Lynch-Arribáizaga, 1891)	1	-
<i>Mansonia (Man.) humeralis</i> Dyar & Knab, 1916	1	-
<i>Ma. (Man.) titillans</i> (Walker, 1848)	6	-
<i>Psorophora (Jan.) ferox</i> (Humboldt, 1819)	5	3
Total	21	4

4.1.2 Ponto amostral Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro.

No ponto amostral da REGUA, dos 1061 mosquitos que foram capturados, apenas 124 fêmeas estavam ingurgitadas (11,69%), todavia, o sucesso na amplificação reuniu 47 amostras (37,90%). Das 80 fêmeas capturadas no ponto amostral da Trilha Verde, somente sete estavam ingurgitadas, compreendendo quatro espécies. Das 955 fêmeas capturadas na Trilha Amarela, 117 estavam ingurgitadas, compreendendo 16 espécies. Não foi possível a detecção de nenhuma fonte alimentar das espécies da Trilha Verde, de forma que todas as 47 amostras identificadas foram da Trilha Amarela.

De forma semelhante observado no ponto amostral do sítio Recanto Preservar, não foi possível detectar a fonte alimentar de 27 espécimes, sendo possível a identificação do repasto sanguíneo de 20 espécimes. Os espécimes corresponderam a duas fêmeas de *Uranotaenia geometrica* Theobald, 1901, dez *Coquillettidia fasciolata* (Lynch-Arribáizaga, 1891), duas *Cq. venezuelensis* (Theobald, 1912), um *Aedes scapularis* (Rondani, 1848), um *Ae. serratus* (s.l.) (Theobald, 1901), um *Ae. albopictus* (Skuse, 1895), um *Anopheles evansae* (Brèthes, 1926), um *An. evandroi* Costa Lima, 1937 e um *Culex (Melanoconion)* sp. (Tabela 9).

Tabela 9. Espécies ingurgitadas nos pontos amostrais na área da Reserva Ecológica de Guapiaçu, município de Cachoeiras de Macacu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Quantidade de fonte alimentar das respectivas espécies.

Espécies	Fêmeas Ingurgitadas	Trilha Amarela	Trilha Verde	Fontes Alimentares
<i>Aedes (Stg.) albopictus</i> (Skuse, 1895)	1	1	-	1
<i>Ae. (Pro.) argyrothorax</i> (Bonne-Wepster & Bonne, 1919)	4	-	4	-
<i>Ae. (Och.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	5	5	-	1

<i>Ae. (Och.) serratus (s.l.)</i> (Theobald, 1901)	1	1	-	1
<i>Anopheles (Ano.) evandroi</i> Costa Lima, 1937	1	1	-	1
<i>An. (Nys.) albitarsis</i> Lynch-Arribálzaga, 1878	4	4	-	-
<i>An. (Nys.) evansae</i> (Brèthes, 1926)	1	1	-	1
<i>Coquillettidia (Rhy.) albicosta</i> (Chagas, 1908)	4	4	-	-
<i>Cq. (Rhy.) chrysonotum</i> (Peryassú, 1908)	1	1	-	-
<i>Cq. (Rhy.) fasciolata</i> (Lynch-Arribálzaga, 1891)	38	38	-	10
<i>Cq. (Rhy.) juxtamansonia</i> (Chagas, 1907)	1	1	-	-
<i>Cq. (Rhy.) venezuelensis</i> (Theobald, 1912)	7	7	-	2
<i>Culex (Cux.)</i> sp.	2	2	-	-
<i>Culex (Mel.)</i> spp.	18	18	-	1
<i>Mansonia (Man.) titillans</i> (Walker, 1848)	30	30	-	-
<i>Psorophora (Jan.) ferox</i> (von Humboldt, 1819)	1	-	1	-
<i>Runchomyia (Run.) reversa</i> Lane & Cerqueira, 1942	1	-	1	-
<i>Trichoprosopon digitatum</i> (Rondani, 1848)	1	-	1	-
<i>Uranotaenia (Ura.) geometrica</i> Theobald, 1901	2	2	-	2
<i>Ur. (Ura.) pulcherrima</i> Lynch-Arribálzaga, 1891	1	1	-	-
Total	124	117	7	20

As fontes alimentares dos 24 espécimes (sítio Recanto Preservar e REGUA), incluíram 20 mamíferos (18 humanos, um canídeo e um camundongo), um anfíbio e seis aves, totalizando 27 fontes detectadas. No entanto, apesar da similaridade das sequências >95%, apenas as sequências dos humanos foram consideradas para publicação. De modo geral, duas amostras apresentaram repastos múltiplos: um espécime de *Cq. venezuelensis* apresentou duas fontes, um anfíbio e um humano; e *Cq. fasciolata* com quatro fontes, sendo um espécime para camundongo e ave e outro para humano e ave. Adicionalmente, duas amostras de aves foram identificadas apenas a nível de gênero (Tabela 10).

Tabela 10. Identificação das fontes alimentares ingeridas por fêmeas de mosquitos de áreas da REGUA e no Sítio Recanto Preservar capturadas em armadilha luminosa CDC, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Espécie	Localidade	Quant.	Fontes Alimentares	Classe
<i>Aedes (Och.) scapularis</i> (Rondani, 1848)	Sítio Recanto Preservar	1	<i>Anas acuta</i>	Aves
	REGUA	1	<i>Gallus gallus</i>	

<i>Coquilletidia</i> (Rhy.) <i>fasciolata</i> (Lynch-Arribáizaga, 1891)		1	<i>Harpia harpyja</i>	
		1	<i>Meleagris gallopavo</i>	
		1	<i>Larus</i> sp.	
		1	<i>Chroicocephalus</i> sp.	
<i>Cq.</i> (Rhy.) <i>venezuelensis</i> (Theobald, 1912)	REGUA	1	<i>Pithecopus rohdei</i>	Anfibio
<i>Anopheles</i> (Nys.) <i>evansae</i> (Brèthes, 1926)	REGUA	1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Mamífero
<i>Coquilletidia</i> (Rhy.) <i>fasciolata</i> (Lynch-Arribáizaga, 1891)	REGUA	1	<i>Mus musculus</i>	
<i>Ae.</i> (Stg.) <i>albopictus</i> (Skuse, 1895)	REGUA	1	<i>Homo sapiens</i>	
<i>Ae.</i> (Och.) <i>scapularis</i> (Rondani, 1848)		1		
<i>Ae.</i> (Och.) <i>serratus</i> (Theobald, 1901)		1		
<i>Anopheles</i> (Ano.) <i>evandroi</i> Lima, 1937		1		
<i>Cq.</i> (Rhy.) <i>fasciolata</i> (Lynch-Arribáizaga, 1891)		6		
<i>Cq.</i> (Rhy.) <i>venezuelensis</i> (Theobald, 1912)		2		
<i>Culex</i> (Mel.) sp.		1		
<i>Psorophora</i> (Jan.) <i>ferox</i> (von Humboldt, 1819)	Sítio Recanto Preservar	3		
<i>Uranotaenia</i> (Ura.) <i>geometrica</i> Theobald, 1901	REGUA	2		

Foi constatado que a fonte alimentar com maior presença entre os culicídeos foi de mamíferos, a espécie com maior número de detecções dessa fonte alimentar foi *Cq. fasciolata* (n= 7). A maioria das espécies de culicídeos demonstram estar altamente correlacionados, sugerindo uma sobreposição nas suas fontes alimentares. Já espécies como *Cq. fasciolata* e *Ae. scapularis* apresentam baixa similaridade com as outras, o que indica que elas têm dietas distintas em comparação com as demais, ou são mais oportunistas. Foi observado que *Ae. scapularis* apresentou detecção de fonte alimentar de aves e mamíferos e *Cq. fasciolata* de aves. Estas foram as únicas espécies que apresentaram ave como fonte alimentar. Em contrapartida, *Cq. venezuelensis* foi a única espécie que realizou repasto sanguíneo em anfíbio (Figura 15).

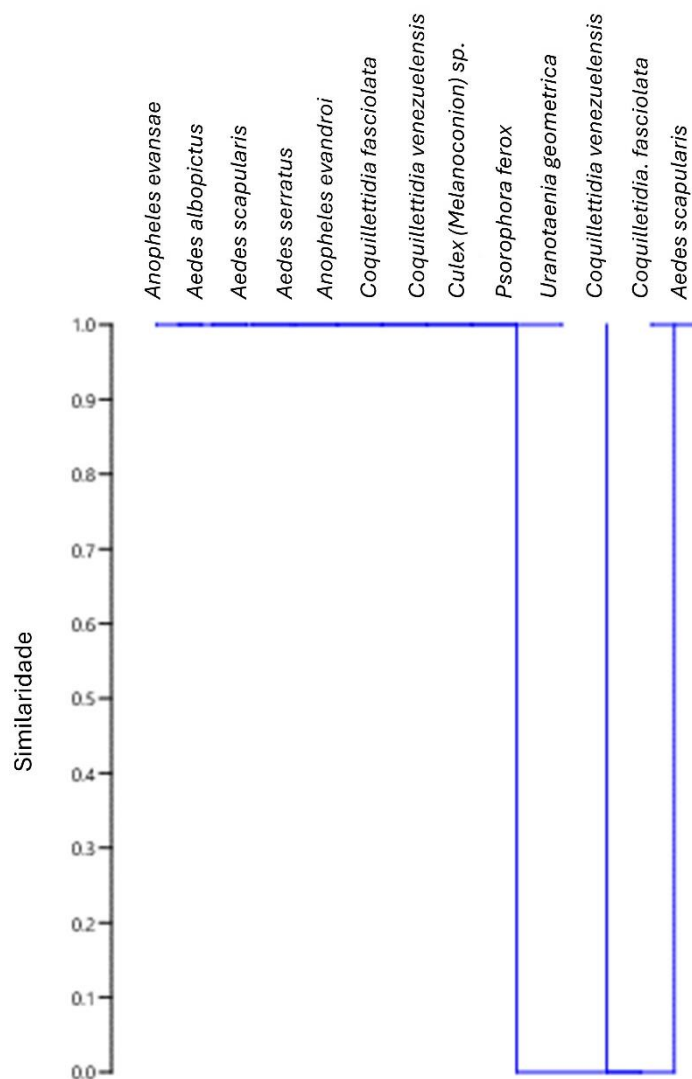


Figura 15. Dendrograma de similaridade baseado no índice de Morisita entre as espécies de culicídeos baseado nas suas fontes alimentares.

4.2 Identificação de *Flavivirus* em mosquitos

A amostra que continha um espécime de *Culex* sp. capturado no ponto amostral da trilha amarela, na REGUA, foi positivo na investigação de *Flavivirus* (Figura 16). Após as sequências deterem seus devidos tratamentos, foi identificado o vírus Tembusu (TMUV) em um espécime que não apresentava sangue em seu abdômen. A sequência foi depositada no banco de dados do GenBank com o número de acesso PP938640.



Figura 16. Gel de agarose corado com brometo de etídio demonstrando a amplificação que demonstra a amplificação da amostra 286 na qual o que foi identificada o vírus Tembusu foi identificado. Zkv - cDNA do vírus Zika, FA100 - cDNA da febre amarela, 50pb – DNA Ladder.

6. DISCUSSÃO

Os resultados observados neste presente estudo destacam a importância de considerar não apenas a presença humana, mas também o comportamento e as preferências alimentares dos mosquitos ao planejar estratégias de controle de vetores e prevenção de patógenos transmitidos por esses insetos. Cabe ressaltar a necessidade de mais pesquisas para esclarecer melhor os padrões de alimentação dos mosquitos e suas implicações para a saúde pública.

A biodiversidade da Mata Atlântica é considerada de extrema importância biológica, contudo essa riqueza de fauna e flora está ameaçada pelo desmatamento, quanto maior for o aumento da área desmatada, mais rápida se torna a velocidade e aceleração da perda da biodiversidade (BRANCO *et al.*, 2021). A perda de vegetação nativa está associada ao aumento na transmissão de agentes etiológicos de arboviroses (dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela), dessa forma os habitats naturais dos vetores e seus ciclos de vida são alterados, afetando sua densidade populacional. Cabe acrescentar que, com a degradação das áreas florestais e a crescente ocupação humana, os insetos vetores biológicos se aproximam dos domicílios e peridomicílios, ocasionando as transmissões (MORENO, 2021).

As fontes alimentares detectadas nos dois espécimes de *Ae. scapularis* foram em pontos amostrais distintos, correspondendo a um humano e a uma ave. No entanto, devido ao baixo número amostral, não foi possível analisar as preferências de hospedeiro da espécie. Estudos apontam que *Ae. scapularis* apresenta um comportamento generalista, se alimentando de aves, canídeos, bovinos, equinos e humanos (FORATTINI *et al.*, 1989; MUCCI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019), que corroboraram com nosso resultado.

Foi constatado que *Cq. fasciolata* foi reagente para as seguintes fontes sanguíneas: seis humanos e cinco aves. Cabe ressaltar que, algumas espécies de aves são capazes de se dispersarem por longas distâncias, frequentando sistemas terrestres e aquáticos (MARTÍN-VÉLEZ *et al.*, 2020). As gaivotas, por exemplo, são aves aquáticas que podem se deslocar centenas de quilômetros entre habitats de água doce, marinhos e terrestres (VIANA; SANTAMARÍA; FIGUEROLA, 2016). Os dois gêneros de aves encontrados no trabalho são correspondentes a duas gaivotas, entretanto, até onde se sabe, a área de estudo da REGUA não é rota migratória para aves desse gênero (BARBIERI, 2008; SANTOS *et al.*, 2021; CHUPIL *et al.*, 2024). Assim sendo, levantam-se duas possibilidades: essas aves podem ter migrado para a região ou ocorreu um erro na edição e análise por meio das ferramentas utilizadas.

Em nossa pesquisa, as sequências correspondentes desses dois gêneros obtiveram similaridade >95%, apontando para um alto índice de confiabilidade. Partindo desse princípio, poder-se-ia assumir que esses animais realmente estiveram na área de estudo, no entanto, TOWNZEN *et al.* (2008) aborda que verificar a distribuição dos vertebrados é tão importante quanto verificar a similaridade das sequências, pois esse conjunto de variáveis influenciam na identificação precisa do repasto sanguíneo realizado pelo mosquito. Dessa forma, apesar da similaridade das sequências estarem no padrão esperado, a presença de gaivotas nos arredores da REGUA é questionável devido ao tipo de habitat que compõe a área, e ao fato de não se terem registros da presença desses animais no local (TOWNZEN; BROWER; JUDD, 2008).

É inegável o fato de que com o advento do sequenciamento e com a gama de genomas presentes nos bancos de dados atuais, os estudos sobre os repastos sanguíneos realizados por artrópodes hematófagos obtiveram uma evolução sem precedentes (HOPKEN *et al.*, 2021; MUTURI *et al.*, 2021; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2022). Todavia, esses resultados apontam a importância do aprimoramento dessas ferramentas e das contínuas pesquisas sobre o tema.

A fonte alimentar de um único espécime de *An. evansae* foi constatado para canídeo, mas devido ao baixo número amostral, não foi possível detectar seus padrões de repastos

sanguíneos. *Cq. venezuelensis* positivou para duas fontes alimentares, correspondendo a um anfíbio e dois humanos. DE CARVALHO *et al.* (2014) e ALENCAR *et al.* (2015) apontaram que para *Cq. venezuelensis*, o hábito alimentar envolve mamíferos e aves. Entretanto, no presente estudo foi encontrado um espécime que realizou o repasto sanguíneo em um anfíbio, algo que até o momento não havia sido registrado (DE CARVALHO *et al.*, 2014; ALENCAR *et al.*, 2015b).

Estudos demonstrando que armadilhas luminosas com iscas de CO₂ atraem fêmeas em busca de hospedeiros, de modo que ou elas não estão alimentadas ou estão parcialmente alimentadas com sangue (THIEMANN; REISEN, 2012). Em nossa pesquisa foram constatados poucos mosquitos ingurgitados, isso pode ter ocorrido justamente devido ao método de captura utilizado, visto que foram usadas armadilhas CDC. Fêmeas de mosquitos que acabaram de realizar o repasto sanguíneo tendem a ficar em repouso (DUVALL, 2019), dessa forma, para melhores resultados em futuros estudos, armadilhas de repouso devem ser empregadas, como redes entomológicas (BRUGMAN *et al.*, 2017; MELGAREJO-COLMENARES; CARDO; VEZZANI, 2022) e aspiradores alimentados por bateria (VAZQUEZ-PROKOPEC *et al.*, 2009).

Os mosquitos são capazes de espalhar patógenos em diversos hospedeiros vertebrados, causando doenças aos humanos devido a sua alta capacidade vetorial (SEGURA *et al.*, 2021). No presente estudo, a fonte alimentar humana foi detectada em 9 espécies, destacando-se *Ae. albopictus*, vetor de alguns importantes vírus, incluindo dengue, febre amarela, Zika e Chikungunya (RYAN *et al.*, 2019), e *Ae. serratus* (s.l.), *Ae. scapularis* e *Ps. ferox* vetores do vírus da febre amarela (CARDOSO *et al.*, 2010; MORENO *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem uma tendência por hospedeiros humanos entre as espécies de mosquitos capturadas.

Essa dominância provavelmente se deve ao fato que esses fragmentos florestais são frequentados pelos moradores, turistas e pesquisadores. Paralelamente, hipotetizar que os repastos sanguíneos registrados não tenham sido realizados nos membros da equipe no momento da captura é uma consideração importante. É preconizado que as espécies de mosquitos podem apresentar alcance maior do que o esperado de movimentação mesmo em condições desfavoráveis, podendo voar distâncias significativas para encontrar hospedeiros.

Os mosquitos são conhecidos por apresentar uma plasticidade comportamental e adaptabilidade às condições ambientais, principalmente devido à sua capacidade de adaptação a diferentes fontes alimentares, incluindo sangue de vertebrados e recursos disponíveis na vegetação. Entretanto, em algumas situações, especialmente quando ocorrem redução de

hospedeiros vertebrados, as espécies de mosquitos podem realizar repastos sanguíneos em fontes alternativas de sangue, como seres humanos (ALENCAR *et al.*, 2015b).

Fatores físicos e químicos como visão, olfato, calor e umidade, assim como etapas comportamentais estão diretamente ligados na busca e orientação de um hospedeiro vertebrado (CARDÉ, 2015; COUTINHO-ABREU; RIFFELL; AKBARI, 2022). *na. gambiae* e *Ae. aegypti*, por exemplo, ao entrarem em contato com o ar carregado de odores de CO₂, alçam voo contra o vento em direção ao rastro do vertebrado (DEKKER; CARDÉ, 2011; HINZE *et al.*, 2021). Os resultados observados no presente estudo mostraram uma tendência de repastos por humanos em *Cq. fasciolata* e *Ps. ferox*. De acordo com a literatura, *Ps. ferox* pode voar em média 2500m, correspondendo a distância entre a disposição das armadilhas e a localização das pessoas (VERDONSCHOT; BESSE-LOTOTSKAYA, 2014).

A identificação bem sucedida dos repastos sanguíneos por métodos baseados em PCR pode apresentar algumas limitações, como a qualidade e quantidade do DNA do hospedeiro no abdomen do mosquito (GÓMEZ-DÍAZ; FIGUEROLA, 2010); preservação, transporte e armazenamento pós coleta (MUKABANA *et al.*, 2002); e a degradação do DNA durante o período de conservação antes da extração (KING *et al.*, 2008). A eficácia das análises de fonte alimentar difere amplamente entre os estudos (THIEMANN *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-TRIANA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019). Aqui o número de amostras que obtiveram sucesso na amplificação do DNA dos hospedeiros correspondeu a 37,93%.

Em parte devemos considerar que o sistema de sequenciamento baseado na metodologia de Sanger, usado nessa pesquisa apresenta uma limitação metodológica que é capaz de detectar apenas o produto amplificado presente em maior concentração e, se houver a mistura de mais de uma fonte, mesmo usando *primers* de boa especificidade, pode não haver correspondência no produto amplificado, promovendo o aparecimento de múltiplas populações no cromatograma (AVANESYAN; SUTTON; LAMP, 2021; NAGAKI *et al.*, 2021; TRIVELLONE; CAO; DIETRICH, 2022; ALONSO *et al.*, 2023). Outra possibilidade apontada em um estudo realizado por Trivellone em 2022, é que os *primers* usados para o sequenciamento Sanger, por serem curtos (<25 bp) podem contribuir para resultados conflitantes e com baixa especificidade, se comparados com outros métodos como o NGS (MARTÍNEZ-PORCHAS; VILLALPANDO-CANCHOLA; VARGAS-ALBORES, 2016; TRIVELLONE; CAO; DIETRICH, 2022).

Durante o monitoramento da circulação de *Flavivirus* nesses remanescentes de Mata Atlântica foi detectado a presença vírus Tembusu (TMUV) em um espécime de *Culex* sp.

capturado em junho de 2023 na REGUA. O vírus Tembusu foi isolado pela primeira vez na Malásia, em 1955 a partir do mosquito *Culex tritaeniorhynchus* Giles, 1901 (HAMEL *et al.*, 2021). Desde então, o vírus tem sido relatado em outras espécies de *Culex*, como *Cx. quinquefasciatus* (GUO *et al.*, 2020). Embora o espécime deste estudo não tenha sido identificado ao nível de espécie, existe a possibilidade de que seja transmitido por algumas das seis espécies de *Culex* encontradas anteriormente na área de estudo (ALENCAR *et al.*, 2015a).

O TMUV apresenta como principais reservatórios, aves silvestres e domésticas como patos, gansos, galinhas, pardais e pombos. Sua principal rota de transmissão é por mosquitos, mas pesquisas indicam possíveis transmissões por contato, aerossol e vertical entre patos e seus descendentes. O vírus causa distúrbios neurológicos, redução drástica na produção de ovos e crescimento retardado, com isso, diversas fazendas são afetadas na indústria avícola (LIU *et al.*, 2024). Durante os meses de coleta de junho e julho de 2023, algumas garças-vaqueiras, *Bulbucus ibis* (Linnaeus, 1758), apareceram mortas na trilha amarela, levantando a possibilidade de que fosse gripe aviária ou vírus do Nilo Ocidental.

Além das aves, o vírus Tembusu já foi encontrado em ratos e humanos. No entanto, a presença do vírus em outros vertebrados ainda não está bem definida, de modo que não se sabe se eles podem ser reservatórios ou hospedeiros amplificadores, ou se são somente hospedeiros finais, com carga viral baixa para transmitir aos mosquitos, como ocorre com outras arboviroses (HAMEL *et al.*, 2021). Essa carência de informações demonstra a importância de mais estudos sobre a patogenicidade do vírus.

Desde a sua descoberta, o Tembusu só foi relatado na Ásia e no Sudeste Asiático, incluindo China, Malásia, Taiwan e Tailândia (CAO *et al.*, 2011; HOMONNAY *et al.*, 2014; THONTIRAVONG *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2020). Dado a falta de vigilância, o vírus só foi detectado nesses países, no entanto, o afastamento desses países sugere que ele está mais amplamente estabelecido na Ásia (HAMEL *et al.*, 2021). Esse é o primeiro relato do vírus Tembusu sendo encontrado na América do Sul e no Brasil e, a descoberta de um vírus que *a priori* só acontece na Ásia, sendo encontrado no Brasil, levanta algumas possibilidades da forma que ele pode ter sido introduzido.

A introdução desse *Flavivirus* na América do Sul pode estar relacionada a várias rotas de migração de aves, embora a ausência de espécies que migrem diretamente da Ásia para essa região torna essa hipótese mais complexa. As aves setentrionais, oriundas do Canadá e dos EUA, e as meridionais, que vêm da América do Sul e da Antártida, são conhecidas por se deslocarem em busca de climas mais amenos, potencialmente atuando como vetores. Além

disso, a migração de aves pode facilitar o movimento de mosquitos que carregam o vírus, já que muitos desses insetos se reproduzem em áreas alagadas frequentemente visitadas por aves. Assim, a interação entre aves migratórias e os mosquitos pode ter sido uma via importante para a disseminação do vírus, mesmo que a conexão direta com a Ásia permaneça indefinida. Essa dinâmica ecológica ilustra a complexidade das rotas de introdução viral, onde múltiplos fatores interagem (ICMBIO, 2019). Dessa forma, se uma espécie infectada que dissemine da Ásia, apresentar uma rota para alguns desses continentes e compartilhar um habitat com uma espécie que migre para o Brasil, seria uma possível explicação para a chegada do vírus Tembusu. Cabe ressaltar, um exemplo é o caso do vírus influenza aviária de alta patogenicidade (IAAP, vírus H5N1), que apesar de não ser um arbovírus, se espalhou globalmente por meio da migração de aves silvestres.

O vírus H5N1 surgiu no Sudeste da Ásia e se disseminou para a Rússia, Europa Ocidental, África e Oriente Médio por meio da migração de longas distâncias de patos, gansos e cisnes selvagens (OLSEN *et al.*, 2006; CALIENDO *et al.*, 2022). Posteriormente, o vírus chegou a América do Norte por meio da migração transatlântica e por fim chegou a América do Sul, passando do Chile, Colômbia, Peru, Argentina, Uruguai e pôr fim ao Brasil (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA, 2023).

O aparecimento do vírus Tembusu no Brasil pode ter ocorrido através de mecanismos semelhantes aos que possibilitaram a disseminação de outros vírus, como os *Alphavirus*. A introdução do vírus Tembusu pode estar relacionada à migração de aves migratórias que carregam o vírus, assim como à movimentação de aves domésticas e à interação entre elas e os mosquitos vetores. Entretanto, a pergunta sobre por que o vírus Tembusu ainda não foi encontrado em outros países além da Ásia é intrigante. Desde o seu primeiro surto significativo na China em 2010 (CAO *et al.*, 2011), o vírus foi identificado principalmente em ambientes com grande concentração de aves, o que levanta questões sobre a sua ecologia e epidemiologia. A ausência de relatos em outras regiões poderia indicar que o vírus ainda não conseguiu se estabelecer em populações de aves ou mosquitos fora da Ásia, ou que sua detecção é dificultada por limitações na vigilância e na pesquisa.

Como mencionado, as rotas de migração de aves que passam pelo Brasil já são bem estabelecidas, no entanto, existem eventos esporádicos do deslocamento de aves oriundas da África, como as garças-vaqueiras encontradas mortas nas redondezas da REGUA. Essas aves são nativas da África Tropical e Subtropical, e foram registradas no Brasil pela primeira vez em 1962, onde nidificaram com outras espécies de garças e, desde então, colonizaram o país

(MIÑO *et al.*, 2022). Como existem rotas de migração entre a Ásia e a África (LATHOUWERS *et al.*, 2022), levanta-se a hipótese de a contaminação ter ocorrido na África, e por meio da garça-vaqueira, ter chegado ao Brasil. Dessa forma, existe a possibilidade de o vírus já estar circulando entre os países por meio das aves silvestres migratórias.

Os estudos retrospectivos que indicam a circulação do vírus na Tailândia em 2007 antes do surto na China (NINVILAI *et al.*, 2018) sugerem que o vírus Tembusu pode ter um ciclo de transmissão que não se manifesta em surtos evidentes, permanecendo em um estado endêmico ou em baixa prevalência em algumas áreas. Isso também pode ser reflexo das condições locais, como a densidade populacional de hospedeiros e vetores, práticas de manejo de aves e a interação entre diferentes ecossistemas.

A segunda hipótese da introdução do vírus no Brasil seria por meio da comercialização de animais, que se dá por diversos motivos, como exposições em zoológicos, programas de conservação, alimentação e turismo e imigração para animais de companhia. No entanto, o comércio de animais, tanto legal quanto ilegal, pode ser determinante na disseminação de doenças infecciosas emergentes (MARANO; ARGUIN; PAPPAIOANOU, 2007). Um bom exemplo foi a introdução da varíola dos macacos nos EUA em 2003, que ocorreu por meio de carregamento de ratos gigantes da Gâmbia, que foram repassados a revendedores, da qual um abrigou os ratos com cães destinados ao comércio de animais de estimação. Esses cães adoeceram e transmitiram a infecção a seus donos e veterinários que os tratavam (CDC, 2003).

No geral, a comercialização de animais passa por uma vigilância sanitária para evitar a introdução de zoonoses em outros países. No entanto, essa vigilância muitas vezes se apresenta de forma limitada, com testes apenas para doenças como gripe aviária, psitacose e febre aftosa (PAVLIN; SCHLOEGEL; DASZAK, 2009). Porém, ao se tratar do tráfico de animais, essa vigilância é praticamente nula e a probabilidade de se introduzir alguma zoonose se torna maior, como ocorreu com um par de águia-falcão-da-montanha (*Nisaetus nipalensis*) que foram contrabandeadas da Tailândia e confiscadas na Bélgica, e estavam infectadas com a H5N1 (VAN BORM *et al.*, 2005).

O Sudeste Asiático é uma região onde a comercialização ilegal de diversas espécies de animais selvagens ocorrem em mercados abertos, que são considerados o ponto perfeito para a transmissão de doenças zoonóticas (ABDULLAH *et al.*, 2024). Com isso, é possível pressupor que aves contaminadas poderiam estar presentes nesses mercados clandestinos, e que de alguma forma a introdução do vírus no Brasil ocorreu por meio da importação ilegal dessas aves ou por produtos avícolas. A disseminação em outras regiões ainda requer mais investigação para

entender os mecanismos de transmissão e os fatores que limitam sua propagação. Essa situação destaca a importância de monitoramento constante e vigilância epidemiológica, especialmente em contextos de intensa mobilidade humana e comércio de animais.

A dispersão de mosquitos infectados poderia ser uma terceira possibilidade para a introdução do vírus no Brasil. Ao se fazer uma recapitulação da história da disseminação dos vírus da dengue e da febre amarela, que saíram da África por meio do transporte dos mosquitos *Aedes* em navios negreiros (GOULD *et al.*, 2017), é possível conjecturar que espécies de *Culex* podem ter sido trazidas para o Brasil por meio do frequente transporte de pessoas. Atualmente, há uma crescente escala de mobilidade humana, tanto por transporte aéreo quanto por marítimo, que resulta em um aumento da introdução de vetores de doenças em diversas áreas geográficas (TATEM; HAY; ROGERS, 2006).

Existem diversos outros exemplos do transporte de vetores por meio da mobilidade humana, como a introdução do *An. gambiae* em 1930 da África Ocidental para Natal, no Nordeste do Brasil, por navio a vapor ou aeronave (LOUNIBOS, 2002). A introdução do *Aedes japonicus* (Theobald, 1901) em 1998 da Ásia (Japão, sul da China e Coreia) para os EUA, por meio de remessas de pneus (LOUNIBOS, 2002). E a introdução do *Ae. albopictus* para o Novo Mundo por meio do transporte marítimo de ovos e larvas em pneus (GRATZ, 2004). Embora exista uma distância considerável entre o Sudoeste Asiático e o Brasil, os ovos de *Culex* podem permanecer viáveis para eclodir quando em condições favoráveis. Como a transmissão vertical de arbovírus é amplamente conhecida (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016; GARCIA-REJON *et al.*, 2021; TANG *et al.*, 2024), levanta-se a possibilidade de a introdução do vírus ter ocorrido por meio de ovos transportados. No entanto, como não existe voo direto de algum país do Sudeste Asiático para a América do Sul, é mais provável que o vírus tenha chegado no Brasil pela rota marítima.

Independente da forma que o vírus chegou ao Brasil, sua presença gera grande preocupação. Até o momento, não se teve nenhum relato de aves mortas no Rio de Janeiro que não fossem causadas pela gripe aviária. Contudo, em São Paulo foi divulgado recentemente a morte de 20 e 15 patos em Piracicaba e Limeira, respectivamente (EDIJAN DEL SANTO, 2024a, 2024b). A razão dessas mortes ainda não é clara, mas já foi descartada a possibilidade de ser H1N5, levantando chances de ser ação do vírus Tembusu.

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo destacou a importância da investigação do hábito alimentar e a da vigilância viral em populações de mosquitos, atendendo aos objetivos propostos. Nossa investigação evidenciou que as espécies de mosquitos analisadas possuem uma clara tendência de se alimentar predominantemente de humanos. Esse achado está diretamente relacionado ao objetivo de analisar o hábito alimentar dos mosquitos, fornecendo subsídios para compreender os riscos associados à transmissão de patógenos que afetam a saúde pública. Além disso, A detecção do sangue de diferentes vertebrados, incluindo humanos e aves, confirma a plasticidade alimentar dos mosquitos, o que pode indicar potenciais interações zoonóticas.

A detecção de *Flavivirus* nos mosquitos analisados confirmou a circulação viral na região estudada, atingindo o objetivo de investigar a presença desses patógenos, e destacando a relevância da vigilância epidemiológica em ambientes silvestres. A detecção do vírus Tembusu em áreas anteriormente não relatadas, levanta um enorme questionamento sobre sua introdução no Brasil e sua possível adaptação a novos vetores e hospedeiros. Esse achado ressalta a necessidade de um monitoramento contínuo e da investigação sobre a patogenicidade e disseminação do vírus, tanto em território nacional quanto em outros continentes.

As arboviroses estão progressivamente se distribuindo pelo globo e o impacto que causam na saúde pública torna evidente a necessidade de se desenvolver estratégias eficazes de vigilância, controle e prevenção. O conhecimento sobre a epidemiologia dos vírus permite identificar áreas de risco e antecipar surtos, assim como o entendimento das respostas clínicas auxilia no diagnóstico e no tratamento adequado. Além disso, a identificação dos vetores e hospedeiros envolvidos possibilita a implementação de medidas de controle de mosquitos vetores e o monitoramento de vertebrados, como as aves migratórias.

Por fim, nossa pesquisa também demonstrou que para esse tipo de investigação, armadilhas de capturas especializadas, assim como a conservação e a preservação do material genético é um fator determinante para o sucesso da pesquisa. Além disso, apesar da identificação do repasto sanguíneo por meio da biologia molecular ser a técnica mais especializada e promissora atualmente, os protocolos necessitam ser aprimorados e ajustados, para aumentar sua sensibilidade e obter um melhor resultado. Dessa forma, este trabalho contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre a biologia dos mosquitos vetores, fornecendo subsídios para ações preventivas e para o desenvolvimento de políticas públicas voltadas ao controle de arbovírus em ecossistemas naturais e antrópicos.

7. REFERÊNCIA

- ABDULLAH, A. et al. Parrot Trade and the Potential Risk of Psittacosis as a Zoonotic Disease in Indonesian Bird Markets. **Birds**, v. 5, n. 1, p. 137–154, 7 mar. 2024.
- ADUGNA, T.; YEWHELEW, D.; GETU, E. Bloodmeal Sources and Feeding Behavior of Anopheline Mosquitoes in Bure District, Northwestern Ethiopia. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 166, 19 mar. 2021.
- ALENCAR, J. et al. Culicidae Community Composition and Temporal Dynamics in Guapiaçu Ecological Reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122268, 27 mar. 2015a.
- ALENCAR, J. et al. Feeding Patterns of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 5, p. 783–788, set. 2015b.
- ALMEIDA-GOMES, M. et al. Herpetofauna of the Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA) and Its Surrounding Areas, in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 3, set. 2014.
- ALONSO, D. P. et al. Host Feeding Patterns of *Mansonia* (Diptera, Culicidae) in Rural Settlements near Porto Velho, State of Rondonia, Brazil. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, p. 553, 17 mar. 2023.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's Climate Classification Map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 1 dez. 2013.
- AVANESYAN, A.; SUTTON, H.; LAMP, W. O. Choosing an Effective PCR-Based Approach for Diet Analysis of Insect Herbivores: A Systematic Review. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, n. 3, p. 1035–1046, 11 jun. 2021.
- BALASHOV, Y. S. Interaction Between Blood-Sucking Arthropods and Their Hosts, and Its Influence on Vector Potential. **Annual Review of Entomology**, v. 29, n. 1, p. 137–156, 1984.
- BALASUBRAMANIAN, S. et al. Characterization of Triatomine Bloodmeal Sources Using Direct Sanger Sequencing and Amplicon Deep Sequencing Methods. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 10234, 17 jun. 2022.
- BARBAZAN, P. et al. Detection of Host Virus-Reactive Antibodies in Blood Meals of Naturally Engorged Mosquitoes. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 103–108, fev. 2009.
- BARBIERI, E. Variação sazonal do gaivotão (*Larus dominicanus*) durante o ano de 2005 no estuário de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 97–102, jun. 2008.
- BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. Alu Repeats and Human Genomic Diversity. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 5, p. 370–379, maio 2002.

BECKHAM, J. D.; TYLER, K. L. Arbovirus Infections: *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, v. 21, p. 1599–1611, dez. 2015.

BEIER, J. C. et al. Bloodmeal Identification by Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa), Tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya¹². **Journal of Medical Entomology**, v. 25, n. 1, p. 9–16, 1 jan. 1988.

BELLEKOM, B. et al. Effects of Storage Conditions and Digestion Time on DNA Amplification of Biting Midge (Culicoides) Blood Meals. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 13, 13 jan. 2023.

BENSON, D. A. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D16–D20, 1 jan. 2006.

BIDLINGMAYER, W. L. The Measurement of Adult Mosquito Population Changes Some Considerations. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 3, p. 328–348, 1985.

BIDLINGMAYER, W. L.; HEM, D. G. The Range of Visual Attraction and the Effect of Competitive Visual Attractants upon Mosquito (Diptera: Culicidae) Flight. **Bulletin of Entomological Research**, v. 70, n. 2, p. 321–342, jun. 1980.

BILLINGSLEY, P. F.; HECKER, H. Blood Digestion in the Mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): Activity and Distribution of Trypsin, Aminopeptidase, and α -Glucosidase in the Midgut. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 6, 1991.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N.; OLSON, K. E. Molecular Strategies for Interrupting Arthropod-Borne Virus Transmission by Mosquitoes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 651–661, out. 2000.

BORKENT, A.; GRIMALDI, D. A. The Earliest Fossil Mosquito (Diptera: Culicidae), in Mid-Cretaceous Burmese Amber. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 882–888, 2004.

BORLAND, E. M.; KADING, R. C. Modernizing the Toolkit for Arthropod Bloodmeal Identification. **Insects**, v. 12, n. 1, p. 37, 6 jan. 2021.

BOSCH, O. J.; GEIER, M.; BOECKH, J. Contribution of Fatty Acids to Olfactory Host Finding of Female *Aedes aegypti*. **Chemical Senses**, v. 25, n. 3, p. 323–330, 1 jun. 2000.

BRAACK, L. et al. Mosquito-Borne Arboviruses of African Origin: Review of Key Viruses and Vectors. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 29, dez. 2018.

BRAKS, M. A. H.; TAKKEN, W. Incubated Human Sweat but Not Fresh Sweat Attracts the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* Ssensu Stricto. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 3, p. 663–672, 1999.

BRANCO, A. F. V. C. et al. Avaliação da perda da biodiversidade na Mata Atlântica. **Ciência Florestal**, v. 31, n. 4, p. 1885–1909, 2021.

- BRIEGEL, H.; REZZONICO, L. Concentration of Host Blood Protein During Feeding by Anopheline Mosquitoes (Diptera: Culicidae)1. **Journal of Medical Entomology**, v. 22, n. 6, p. 612–618, 27 nov. 1985.
- BRINKMANN, A.; NITSCHKE, A.; KOHL, C. Viral Metagenomics on Blood-Feeding Arthropods as a Tool for Human Disease Surveillance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1743, 19 out. 2016.
- BRUGMAN, V. A. et al. Blood-Feeding Patterns of Native Mosquitoes and Insights into Their Potential Role as Pathogen Vectors in the Thames Estuary Region of the United Kingdom. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 163, dez. 2017.
- CALIENDO, V. et al. Transatlantic Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 by Wild Birds from Europe to North America in 2021. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11729, 11 jul. 2022.
- CAO, Z. et al. Tembusu Virus in Ducks, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1873–1875, out. 2011.
- CARDÉ, R. T. Multi-Cue Integration: How Female Mosquitoes Locate a Human Host. **Current Biology**, v. 25, n. 18, p. R793–R795, set. 2015.
- CARDÉ, R. T.; GIBSON, G. Host finding by female mosquitoes: mechanisms of orientation to host odours and other cues. **Olfaction in vector-host interactions**. p. 115–141. 2010
- CARDOSO, J. D. C. et al. Yellow Fever Virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* Mosquitoes, Southern Brazil, 2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1918–1924, dez. 2010.
- CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 17 jun. 2014.
- CARROLL, M. W. et al. Temporal and Spatial Analysis of the 2014–2015 Ebola Virus Outbreak in West Africa. **Nature**, v. 524, n. 7563, p. 97–101, 6 ago. 2015.
- CASTRO, E. B. V. **Fatores Determinantes da Vulnerabilidade à Extinção e Ordem de Perda de Espécies de Pequenos Mamíferos em uma Paisagem Fragmentada da Mata Atlântica**. Dissertação de Mestrado, 2002.
- CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). Surto de varíola dos macacos em vários estados - Illinois, Indiana e Wisconsin, 2003. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 52, n. 23, p. 537–540, 2003.
- CHAMBERLAIN, R. W.; SUDIA, W. D. Mechanism of Transmission of Viruses by Mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 6, n. 1, p. 371–390, jan. 1961.
- CHASE, J. M.; KNIGHT, T. M. Drought-induced Mosquito Outbreaks in Wetlands. **Ecology Letters**, v. 6, n. 11, p. 1017–1024, nov. 2003.

CHEN, R. et al. Comprehensive Genome Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 90, n. 23, p. 10600–10611, dez. 2016.

CHOUMET, V. et al. Visualizing non Infectious and Infectious *Anopheles gambiae* Blood Feedings in Naive and Saliva-Immunized Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50464, 13 dez. 2012.

CHUPIL, H. et al. Insights Into the Ecology and Conservation of Coastal Brazil Seabirds Based On Band Returns. **Marine Ornithology**, n. 52, p. 37–44, 2024.

CLETON, N. et al. Come Fly with Me: Review of Clinically Important Arboviruses for Global Travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191–203, nov. 2012.

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

COULSON, R. M. R. et al. Amplification and Analysis of Human DNA Present in Mosquito Bloodmeals. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 4, p. 357–366, out. 1990.

COUTINHO-ABREU, I. V.; RIFFELL, J. A.; AKBARI, O. S. Human Attractive Cues and Mosquito Host-Seeking Behavior. **Trends in Parasitology**, v. 38, n. 3, p. 246–264, mar. 2022.

DAEP, C. A.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; EUGENIN, E. A. Flaviviruses, an Expanding Threat in Public Health: Focus on Dengue, West Nile, and Japanese Encephalitis Virus. **Journal of NeuroVirology**, v. 20, n. 6, p. 539–560, dez. 2014.

DAVIS, G. E.; PHILIP, C. B. The Identification of The Blood-Meal in West African Mosquitoes by Means of The Precipitin Test. A Preliminary Report. **American Journal of Epidemiology**, v. 14, n. 1, p. 130–141, 1 jul. 1931.

DAVIS, L. E.; BECKHAM, J. D.; TYLER, K. L. North American Encephalitic Arboviruses. **Neurologic Clinics**, v. 26, n. 3, p. 727–757, ago. 2008.

DAY, J. F.; EBERT, K. M.; EDMAN, J. D. Feeding Patterns of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Simultaneously Exposed to Malarious and Healthy Mice, Including a Method for Separating Blood Meals from Conspecific Hosts¹. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 2, p. 120–127, 1983.

DE CARVALHO, G. C. et al. Blood Meal Sources of Mosquitoes Captured in Municipal Parks in São Paulo, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 39, n. 1, p. 146–152, jun. 2014.

DEKKER, T. et al. L-lactic Acid: A Human-signifying Host Cue for the Anthropophilic Mosquito *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, n. 1, p. 91–98, mar. 2002.

DEKKER, T.; CARDÉ, R. T. Moment-to-Moment Flight Manoeuvres of the Female Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*) in Response to Plumes of Carbon Dioxide and Human Skin Odour. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 20, p. 3480–3494, 15 out. 2011.

DELATTE, H. et al. Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Réunion. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 249–258, abr. 2010.

DICK, G. W. A. Zika Virus (II). Pathogenicity and Physical Properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521–534, set. 1952.

DUVALL, L. B. Mosquito Host-Seeking Regulation: Targets for Behavioral Control. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 704–714, set. 2019.

EDIJAN DEL SANTO. **Após morte de 20 patos em dez dias, Esalq em Piracicaba restringe acesso a lago e investiga causas**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/piracicaba-regiao/noticia/2024/01/05/apos-morte-de-20-patos-em-dez-dias-esalq-em-piracicaba-restringe-acesso-a-lago-e-investiga-causas.ghml>>. Acesso em: 14 set. 2024a.

EDIJAN DEL SANTO. **Morte de 15 patos em lago do Bosque Maria Thereza intriga moradores em Limeira**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/piracicaba-regiao/noticia/2024/04/16/morte-de-15-patos-em-lago-do-bosque-maria-thereza-preocupa-moradores-em-limeira-entenda.ghml>> Acesso em: 14 set. 2024b.

EDRISSIAN, Gh. H.; HAFIZI, A. Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Identification of *Anopheles* Mosquito Bloodmeals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 1, p. 54–56, jan. 1982.

EIRAS, A. E.; JEPSON, P. C. Host Location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): A Wind Tunnel Study of Chemical Cues. **Bulletin of Entomological Research**, v. 81, n. 2, p. 151–160, jun. 1991.

EIRAS, A. E.; JEPSON, P. C. Responses of Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Host Odours and Convection Currents Using an Olfactometer Bioassay. **Bulletin of Entomological Research**, v. 84, n. 2, p. 207–211, jun. 1994.

FARAJI, A. et al. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3037, 7 ago. 2014.

FERNANDES, D. da S. Estrutura de uma floresta seca de restinga em Cabo Frio, RJ. 2005. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical**, Rio de Janeiro, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian Flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643–1649, nov. 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent Arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, abr. 2007.

FIKRIG, K.; HARRINGTON, L. C. Understanding and Interpreting Mosquito Blood Feeding Studies: The Case of *Aedes albopictus*. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 959–975, nov. 2021.

FLICK, R.; BOULOY, M. Rift Valley Fever Virus. **Current Molecular Medicine**, v. 5, n. 8, p. 827–834, 1 dez. 2005.

FLIES, E. J. et al. Regional Comparison of Mosquito Bloodmeals in South Australia: Implications for Ross River Virus Ecology. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 4, p. 902–910, jul. 2016.

FOLEY, D. H.; RUEDA, L. M.; WILKERSON, R. C. **Insight into Global Mosquito Biogeography from Country Species Records**. 2007.

FORATTINI, O. P. et al. Preferências alimentares e domiciliação de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, com especial referência a *Aedes scapularis* e a *Culex (Melanoconion)*. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 9–19, fev. 1989.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia e Epidemiologia**. Departamento de Epidemiologia, Universidade de São Paulo.: EdUsp, 2002. v. 2

FORRESTER, N. L. et al. Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2729–2738, mar. 2012.

FOSTER, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 443–474, 1995.

FOSTER, W. A.; WALKER, E. D. Mosquitoes (Culicidae). Em: **Medical and Veterinary Entomology**. Elsevier, 2019. p. 261–325.

FRANZ, A. et al. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 8 jul. 2015.

FREIRE, M. G. et al. Relationship between Environmental Conditions and Host-Seeking Activity of *Ochlerotatus Albifasciatus* (Diptera: Culicidae) in an Agroecosystem and in an Urban Area in Chubut, Central Patagonia, Argentina. **Journal of Natural History**, v. 50, n. 21–22, p. 1369–1380, 10 jun. 2016.

GAIO, A. D. O. et al. Contribution of Midgut Bacteria to Blood Digestion and Egg Production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 105, dez. 2011.

GANGULA, R. et al. Ensemble Machine Learning Based Prediction of Dengue Disease with Performance and Accuracy Elevation Patterns. **Materials Today: Proceedings**, v. 80, p. 3458–3463, 2023.

GAO, D. et al. Prevention and Control of Zika as a Mosquito-Borne and Sexually Transmitted Disease: A Mathematical Modeling Analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28070, 17 jun. 2016.

GARCIA-REJON, J. E. et al. An Updated Review of the Invasive *Aedes albopictus* in the Americas; Geographical Distribution, Host Feeding Patterns, Arbovirus Infection, and the Potential for Vertical Transmission of Dengue Virus. **Insects**, v. 12, n. 11, p. 967, 26 out. 2021.

GEIER, M. Ammonia as an Attractive Component of Host Odour for the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Chemical Senses**, v. 24, n. 6, p. 647–653, 1 dez. 1999.

- GEORGE, J. et al. Malaria Mosquitoes Host-Locate and Feed upon Caterpillars. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.
- GILLIES, M. T. Selection for host preference in *Anopheles gambiae*. **Nature**, n. 203, p. 852–54, 1964.
- GILLIES, M. T. The Role of Carbon Dioxide in Host-Finding by Mosquitoes (Diptera: Culicidae): A Review. **Bulletin of Entomological Research**, v. 70, n. 4, p. 525–532, dez. 1980.
- GILLIES, M. T.; WILKES, T. J. The Range of Attraction of Animal Baits and Carbon Dioxide for Mosquitoes. Studies in a Freshwater Area of West Africa. **Bulletin of Entomological Research**, v. 61, n. 3, p. 389–404, fev. 1972.
- GOMES, L. A. et al. Comparison between Precipitin and ELISA Tests in the Bloodmeal Detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) Mosquitoes Experimentally Fed on Feline, Canine and Human Hosts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 693–695, jul. 2001.
- GÓMEZ-DÍAZ, E.; FIGUEROLA, J. New Perspectives in Tracing Vector-Borne Interaction Networks. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 470–476, out. 2010.
- GOUAGNA, L. C. et al. Sugar-Source Preference, Sugar Intake and Relative Nutritional Benefits in *Anopheles arabiensis* Males. **Acta Tropica**, v. 132, p. S70–S79, abr. 2014.
- GOULD, E. et al. Emerging Arboviruses: Why Today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, dez. 2017.
- GOUVEIA DE ALMEIDA, A. P. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal: desafios para o século XXI. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 6, p. 961–74, 20 jun. 2012.
- GRATZ, N. G. Critical Review of the Vector Status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 3, p. 215–227, set. 2004.
- GREENWALT, D. E. et al. Hemoglobin-Derived Porphyrins Preserved in a Middle Eocene Blood-Engorged Mosquito. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 46, p. 18496–18500, 2013.
- GUAPIAÇU GRANDE VIDA. **Documento de Concepção do Programa para Atividades de Reflorestamento**. 2016.
- GUARNER, J.; HALE, G. L. Four Human Diseases with Significant Public Health Impact Caused by Mosquito-Borne Flaviviruses: West Nile, Zika, Dengue and Yellow Fever. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 170–176, maio 2019.
- GUBLER, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13–24, dez. 2001.
- GUO, X. et al. Potential Vector Competence of Mosquitoes to Transmit Baiyangdian Virus, a New Tembusu-Related Virus in China. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 7, p. 541–546, 1 jul. 2020.

GYAWALI, N. et al. Identification of the Source of Blood Meals in Mosquitoes Collected from North-Eastern Australia. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 198, dez. 2019.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1477, 28 fev. 2012.

HADJ-HENNI, L. et al. Comparison of Vertebrate Cytochrome b and Prepronociceptin for Blood Meal Analyses in Culicoides. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, 27 maio 2015.

HAGAN, R. W. et al. Dehydration Prompts Increased Activity and Blood Feeding by Mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6804, 1 maio 2018.

HALL, R. A. et al. Advances in Arbovirus Surveillance, Detection and Diagnosis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–2, 2012.

HAMEL, R. et al. New Insights into the Biology of the Emerging Tembusu Virus. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1010, 10 ago. 2021.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): A Review of Taxonomy, Classification and Phylogeny*. **Zootaxa**, v. 1668, n. 1, p. 591–638, 21 dez. 2007.

HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and Classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology**, v. 23, n. 4, p. 327–370, out. 1998.

HARRIS, P.; RIORDAN, D. F.; COOK, D. Mosquitoes Feeding on Insect Larvae. **Science**, v. 164, n. 3876, p. 184–185, 1969.

HARTKOPF-FRODER, C. et al. Mid-Cretaceous charred fossil flowers reveal direct observation of arthropod feeding strategies. **Biology Letters**, v. 8, n. 2, p. 295–298, 2012.

HAYDON, D. T. et al. Identifying Reservoirs of Infection: A Conceptual and Practical Challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1468–1473, dez. 2002.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological Identifications through DNA Barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 7 fev. 2003.

HERNÁNDEZ-TRIANA, L. M. et al. Molecular Approaches for Blood Meal Analysis and Species Identification of Mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in Rural Locations in Southern England, United Kingdom. **Zootaxa**, v. 4250, n. 1, 3 abr. 2017.

HINZE, A. et al. Mosquito Host Seeking in 3D Using a Versatile Climate-Controlled Wind Tunnel System. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 643693, 11 mar. 2021.

HOFFMANN, E. J.; MILLER, J. R. Reduction of Mosquito (Diptera: Culicidae) Attacks on a Human Subject by Combination of Wind and Vapor-Phase DEET Repellent. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 935–938, 1 nov. 2002.

HOLMES, E.; TWIDDY, S. The Origin, Emergence and Evolutionary Genetics of Dengue Virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, maio 2003.

HOMONNAY, Z. G. et al. Tembusu-like *Flavivirus* (Perak Virus) as the Cause of Neurological Disease Outbreaks in Young Pekin Ducks. **Avian Pathology**, v. 43, n. 6, p. 552–560, 2 nov. 2014.

HOPKEN, M. W. et al. Temporal and Spatial Blood Feeding Patterns of Urban Mosquitoes in the San Juan Metropolitan Area, Puerto Rico. **Insects**, v. 12, n. 2, p. 129, 2 fev. 2021.

HORNE, K.; VANLANDINGHAM, D. Bunyavirus-Vector Interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4373–4397, 13 nov. 2014.

HUSNINA, Z.; CLEMENTS, A. C. A.; WANGDI, K. Forest Cover and Climate as Potential Drivers for Dengue Fever in Sumatra and Kalimantan 2006–2016: A Spatiotemporal Analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 7, p. 888–898, jul. 2019.

ILACQUA, R. C. et al. Reemergence of Yellow Fever in Brazil: The Role of Distinct Landscape Fragmentation Thresholds. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2021, p. 1–7, 23 jul. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, I. (ed.). **Manual técnico da vegetação brasileira**. 2ª edição revista e ampliada ed. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2012.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Plano de Manejo da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado**. 2008.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil**. 3ª edição, 2019.

JOUANNIC, J.-M. et al. Zika Virus Infection in French Polynesia. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1051–1052, mar. 2016.

KEESING, F. et al. Impacts of Biodiversity on the Emergence and Transmission of Infectious Diseases. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 647–652, dez. 2010.

KENNEDY, J. S. The Visual Responses of Flying Mosquitoes. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. A109, n. 4, p. 221–242, jan. 1940.

KENNEY, J. L.; BRAULT, A. C. The Role of Environmental, Virological and Vector Interactions in Dictating Biological Transmission of Arthropod-Borne Viruses by Mosquitoes. **Advances in Virus Research, Elsevier**, v. 89, p. 39–83, 2004.

KENT, R. J. Molecular Methods for Arthropod Bloodmeal Identification and Applications to Ecological and Vector-Borne Disease Studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 4–18, jan. 2009.

KEVEN, J. B.; WALKER, E. D.; VENTA, P. J. A Microsatellite Multiplex Assay for Profiling Pig DNA in Mosquito Bloodmeals. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 4, p. 907–914, 27 jun. 2019.

KILPATRICK, A. M. et al. West Nile Virus Epidemics in North America Are Driven by Shifts in Mosquito Feeding Behavior. **PLoS Biology**, v. 4, n. 4, p. 82, 2006.

KING, R. A. et al. INVITED REVIEW: Molecular Analysis of Predation: A Review of Best Practice for DNA-based Approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 4, p. 947–963, fev. 2008.

KLINEL, L.; LEMIRE, G. F. Field Evaluation of Heat as an Added Attractant to Traps Baited with Carbon Dioxide and Octenol for *Aedes taeniorhynchus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, n. 4, p. 454–456, 1995.

KLOWDEN, M. J.; BRIEGEL, H. Mosquito Gonotrophic Cycle and Multiple Feeding Potential: Contrasts Between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 4, p. 618–622, 1 jul. 1994.

KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New Dates and New Rates for Divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1412, p. 2257–2263, 7 dez. 1998.

KOCHER, T. D. et al. Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6196–6200, ago. 1989.

KURTZ, B. C.; DE ARAUJO, D. S. D. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de um trecho de Mata Atlântica na Estação Ecológica Estadual do Paraíso, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 51, n. 78–79, p. 69–112, 2000.

LACEY, E. S.; RAY, A.; CARDÉ, R. T. Close Encounters: Contributions of Carbon Dioxide and Human Skin Odour to Finding and Landing on a Host in *Aedes aegypti*. **Physiological Entomology**, v. 39, n. 1, p. 60–68, mar. 2014.

LAHONDÈRE, C.; LAZZARI, C. R. Mosquitoes Cool Down during Blood Feeding to Avoid Overheating. **Current Biology**, v. 22, n. 1, p. 40–45, jan. 2012.

LAPORTA, G. Z. et al. Malaria Transmission in Landscapes with Varying Deforestation Levels and Timelines in the Amazon: A Longitudinal Spatiotemporal Study. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6477, 19 mar. 2021.

LATHOUWERS, M. et al. Migration Routes and Timing of European Nightjars (*Caprimulgus europaeus*) Breeding in Eastern Mongolia. **Journal of Ornithology**, v. 163, n. 4, p. 881–890, out. 2022.

LEAL, W. S. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 373–391, 7 jan. 2013.

LEHANE, M. J. **The Biology of Blood-Sucking in Insects**. Second Edition ed. Inglaterra: Cambridge University Press, 2005.

LEQUIME, S.; PAUL, R. E.; LAMBRECHTS, L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 5, p. e1005548, 12 maio 2016.

- LIU, M. et al. A Novel Goose-Origin Tembusu Virus Exhibits Pathogenicity in Day-Old Chicks with Evidence of Direct Contact Transmission. **Poultry Science**, v. 103, n. 2, p. 103332, fev. 2024.
- LOAIZA, J. R. et al. Disturbance and Mosquito Diversity in the Lowland Tropical Rainforest of Central Panama. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7248, 3 ago. 2017.
- LOAIZA, J. R. et al. Forest Disturbance and Vector Transmitted Diseases in the Lowland Tropical Rainforest of Central Panama. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 7, p. 849–861, jul. 2019.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, ago. 2014.
- LOUNIBOS, L. P. Invasions by Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 233–266, jan. 2002.
- LYIMO, I. N.; FERGUSON, H. M. Ecological and Evolutionary Determinants of Host Species Choice in Mosquito Vectors. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 189–196, abr. 2009.
- MACDONALD, A. J.; MORDECAI, E. A. Amazon Deforestation Drives Malaria Transmission, and Malaria Burden Reduces Forest Clearing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 44, p. 22212–22218, 29 out. 2019.
- MAIN, B. J. et al. The Genetic Basis of Host Preference and Resting Behavior in the Major African Malaria Vector, *Anopheles arabiensis*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 9, 2016.
- MARANO, N.; ARGUIN, P. M.; PAPPAIOANOU, M. Impact of Globalization and Animal Trade on Infectious Disease Ecology. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1807–1809, dez. 2007.
- MARM KILPATRICK, A. et al. Host Heterogeneity Dominates West Nile Virus Transmission. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1599, p. 2327–2333, 22 set. 2006.
- MARTINA, B. E. et al. Human to Human Transmission of Arthropod-Borne Pathogens. **Current Opinion in Virology**, v. 22, p. 13–21, fev. 2017.
- MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J. et al. Effect of Blood Meal Digestion and DNA Extraction Protocol on the Success of Blood Meal Source Determination in the Malaria Vector *Anopheles Atroparvus*. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 109, dez. 2013.
- MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; VILLALPANDO-CANCHOLA, E.; VARGAS-ALBORES, F. Significant Loss of Sensitivity and Specificity in the Taxonomic Classification Occurs When Short 16S rRNA Gene Sequences Are Used. **Heliyon**, v. 2, n. 9, p. e00170, set. 2016.
- MARTÍN-VÉLEZ, V. et al. Functional Connectivity Network between Terrestrial and Aquatic Habitats by a Generalist Waterbird, and Implications for Biovectoring. **Science of The Total Environment**, v. 705, p. 135886, fev. 2020.

MCKINNEY, R. M.; SPILLANE, J. T.; HOLDEN, P. Mosquito blood meals: identification by a fluorescent antibody method. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 6, p. 999–1003, 1972.

MELGAREJO-COLMENARES, K.; CARDO, M. V.; VEZZANI, D. Blood Feeding Habits of Mosquitoes: Hardly a Bite in South America. **Parasitology Research**, v. 121, n. 7, p. 1829–1852, jul. 2022.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Panorama da ocorrência da infecção pelo vírus influenza A de alta patogenicidade (H5N1) em aves silvestres e domésticas de subsistência no Brasil - maio a julho de 2023**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/influenza-aviaria>>.

MIÑO, C. I. et al. Genetic Insights into the Range Expansion of the Cattle Egret (Pelecaniformes: Ardeidae) in Brazil and Population Differentiation between the Native and Colonized Areas. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 136, n. 2, p. 306–320, 26 maio 2022.

MOLAEI, G. et al. Host-Feeding Patterns of Potential Mosquito Vectors in Connecticut, USA: Molecular Analysis of Bloodmeals from 23 Species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, 2008.

MOLAEI, G.; ANDREADIS, T. G. Identification of Avian- and Mammalian-Derived Bloodmeals in *Aedes vexans* and *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and Its Implication for West Nile Virus Transmission in Connecticut, U.S.A. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, 2006.

MORENO, E. S. et al. Reemergence of Yellow Fever: Detection of Transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 290–296, 1 jul. 2011.

MORENO, G. S. Burning, wildfires and arboviruses: emerging relationships in the pre and post pandemic. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 14, n. 33, p. 1984–3240, 2021.

MOURÃO, M. P. G. et al. Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 2063–2064, dez. 2009.

MTAMBO, J. et al. Comparison of Preservation Methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) for Reliable DNA Amplification by PCR. **Experimental & Applied Acarology**, v. 38, n. 2–3, p. 189–199, fev. 2006.

MUCCI, L. F. et al. Feeding Habits of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Area of Sylvatic Transmission of Yellow Fever in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 6, dez. 2015.

MUKABANA, W. R. et al. Extent of Digestion Affects the Success of Amplifying Human DNA from Blood Meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, n. 3, p. 233–239, jun. 2002.

MUKABANA, W. R.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Analysis of Arthropod Bloodmeals Using Molecular Genetic Markers. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 505–509, nov. 2002.

MURILLO B., C.; ASTAIZA V., R.; FAJARDO O., P. Biología de *Anopheles (Kerteszia) neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la Costa Pacífica de Colombia: III. Medidas de luminosidad y el comportamiento de picadura. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 2, p. 109–112, abr. 1988.

MUTURI, E. J. et al. Next Generation Sequencing Approach for Simultaneous Identification of Mosquitoes and Their Blood-Meal Hosts. **Journal of Vector Ecology**, v. 46, n. 1, 14 jun. 2021.

NAGAKI, S. S. et al. Host Feeding Patterns of *Nyssorhynchus darlingi* (Diptera: Culicidae) in the Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 213, p. 105751, jan. 2021.

NAKHAPAKORN, K.; TRIPATHI, N. K. An Information Value Based Analysis of Physical and Climatic Factors Affecting Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever Incidence. **International Journal of Health Geographics**, v. 4, n. 13, 2005.

NASCI, R. S. et al. West Nile Virus in Overwintering *Culex* Mosquitoes, New York City, 2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 742–744, 2001.

NGO, K. A.; KRAMER, L. D. Identification of Mosquito Bloodmeals Using Polymerase Chain Reaction (PCR) With Order-Specific Primers. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 215–222, 1 mar. 2003.

NIEBYLSKI, M. L.; SAVAGE, H. M. Blood Hosts of *Aedes albopictus* in The United States. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 10, n. 3, p. 447–450, 1994.

NINVILAI, P. et al. The Presence of Duck Tembusu Virus in Thailand since 2007: A Retrospective Study. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 5, p. 1208–1216, out. 2018.

NORRIS, D. E.; KENT, R. J. Identification of Mammalian Blood Meals in Mosquitoes By A Multiplexed Polymerase Chain Reaction Targeting Cytochrome B. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 336–342, 1 ago. 2005.

NUNES, M. R. T. et al. Oropouche Virus Isolation, Southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1610–1613, out. 2005.

OLSEN, B. et al. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. **Science**, v. 312, n. 5772, p. 384–388, 21 abr. 2006.

ORSBORNE, J. et al. Investigating the Blood-Host Plasticity and Dispersal of *Anopheles Coluzzii* Using a Novel Field-Based Methodology. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 143, dez. 2019.

ORTIZ, D. I. et al. The Impact of Deforestation, Urbanization, and Changing Land Use Patterns on the Ecology of Mosquito and Tick-Borne Diseases in Central America. **Insects**, v. 13, n. 1, p. 20, 23 dez. 2021.

- OSHAGHI, M. A. et al. Effects of Post-Ingestion and Physical Conditions on PCR Amplification of Host Blood Meal DNA in Mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 232–236, abr. 2006.
- PATEL, P. et al. Development of One-Step Quantitative Reverse Transcription PCR for the Rapid Detection of Flaviviruses. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 58, dez. 2013.
- PATÍÑO, L. et al. Genomics for Arbovirus Surveillance: Considerations for Routine Use in Public Health Laboratories. **Viruses**, v. 16, n. 8, p. 1242, 2 ago. 2024.
- PATZ, J. A. et al. Unhealthy Landscapes: Policy Recommendations on Land Use Change and Infectious Disease Emergence. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1092–1098, jul. 2004.
- PAVLIN, B. I.; SCHLOEGEL, L. M.; DASZAK, P. Risk of Importing Zoonotic Diseases through Wildlife Trade, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1721–1726, nov. 2009.
- PEACH, D. A. H. et al. Multimodal Floral Cues Guide Mosquitoes to Tansy Inflorescences. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3908, 7 mar. 2019.
- PEACH, D. A. H.; GRIES, G. Mosquito Phytophagy – Sources Exploited, Ecological Function, and Evolutionary Transition to Haematophagy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 168, n. 2, p. 120–136, fev. 2020.
- PENG, S.-H. et al. Genome Analysis of a Novel Tembusu Virus in Taiwan. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 567, 22 maio 2020.
- PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.
- PICHON, B. et al. Blood-Meal Analysis for the Identification of Reservoir Hosts of Tick-Borne Pathogens in Ireland. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 2, p. 172–180, jun. 2005.
- POINAR, G. O. et al. *Paleoculicis minutus* (Diptera: Culicidae) n. Gen., n. Sp., from Cretaceous Canadian Amber, with a Summary of Described Fossil Mosquitoes. **Acta Geologica Hispanica**, v. 35, n. 1–2, 2000.
- QUICK, J. et al. Multiplex PCR Method for MinION and Illumina Sequencing of Zika and Other Virus Genomes Directly from Clinical Samples. **Nature Protocols**, v. 12, n. 6, p. 1261–1276, jun. 2017.
- RAJALAKSHMI, S. DIFFERENT TYPES OF PCR TECHNIQUES AND ITS APPLICATIONS. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 285–292, 2017.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BARCODING, BOLD : The Barcode of Life Data System ([Http://Www.Barcodinglife.Org](http://www.Barcodinglife.Org)). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355–364, maio 2007.

- REEVES, L. E. et al. Maintenance of Host DNA Integrity in Field-Preserved Mosquito (Diptera: Culicidae) Blood Meals for Identification by DNA Barcoding. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 503, dez. 2016.
- REIDENBACH, K. R. et al. Phylogenetic Analysis and Temporal Diversification of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Based on Nuclear Genes and Morphology. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 298, dez. 2009.
- REITER, P. Climate Change and Mosquito-Borne Disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2001.
- RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 73–88, jan. 2003.
- ROCHA, C. F. D. et al. A Survey of the Leaf-Litter Frog Assembly from an Atlantic Forest Area (Reserva Ecológica de Guapiaçu) in Rio de Janeiro State, Brazil, with an Estimate of Frog Densities. **Tropical Zoology**, v. 20, p. 99–108, 2007.
- RYAN, S. J. et al. Global Expansion and Redistribution of *Aedes*-Borne Virus Transmission Risk with Climate Change. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007213, 28 mar. 2019.
- SALLUM, M. A. M. et al. Vector Competence, Vectorial Capacity of *Nyssorhynchus darlingi* and the Basic Reproduction Number of *Plasmodium vivax* in Agricultural Settlements in the Amazonian Region of Brazil. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 117, dez. 2019.
- SAMUEL, P. P. et al. Host-Feeding Pattern of *Culex quinquefasciatus* Say and *Mansonia annulifera* (Theobald) (Diptera: Culicidae), the Major Vectors of Filariasis in a Rural Area of South India. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 442–446, 1 maio 2004.
- SANTOS, C. S. et al. Molecular Identification of Blood Meals in Mosquitoes (Diptera, Culicidae) in Urban and Forested Habitats in Southern Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212517, 19 fev. 2019.
- SANTOS, L. E. D. et al. First Records of Gray-Hooded Gull, *Chroicocephalus cirrocephalus* (Vieillot, 1818) (Charadriiformes, Laridae), in the State of Espírito Santo, Brazil. **Check List**, v. 17, n. 1, p. 21–26, 5 jan. 2021.
- SARDI, S. I. et al. Coinfections of Zika and Chikungunya Viruses in Bahia, Brazil, Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2348–2353, set. 2016.
- SAVAGE, H. M. et al. Host-Feeding Patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) at a Temperate North American Site. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 27–34, 1 jan. 1993.
- SCARAFFIA, P. Y. Disruption of Mosquito Blood Meal Protein Metabolism. **Genetic Control of Malaria and Dengue**, n. Adelman ZN, p. 253–275, 2016.

- SCOTT, T. W. et al. Detection of Multiple Blood Feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) During a Single Gonotrophic Cycle Using a Histologic Technique. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 94–99, 1 jan. 1993.
- SCOTT, T. W.; TAKKEN, W. Feeding Strategies of Anthropophilic Mosquitoes Result in Increased Risk of Pathogen Transmission. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 114–121, mar. 2012.
- SEGURA, N. A. et al. Minireview: Epidemiological Impact of Arboviral Diseases in Latin American Countries, Arbovirus-Vector Interactions and Control Strategies. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 7, p. ftab043, 6 set. 2021.
- SEUTIN, G.; WHITE, B. N.; BOAG, P. T. Preservation of Avian Blood and Tissue Samples for DNA Analyses. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, n. 1, p. 82–90, 1 jan. 1991.
- SIMPSON, S. J. Mouthparts and feeding. Em: CHAPMAN, R. F. (Ed.). **The Insects**. 5. ed. Cambridge University Press, 2012. p. 15–45.
- SLAMA, D. et al. Blood Meal Analysis of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in Central Tunisia. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120528, 20 mar. 2015.
- SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 122, n. 1, p. e59, abr. 2018.
- SMALLEGANGE, R. C. et al. The Effect of Aliphatic Carboxylic Acids on Olfaction-Based Host-Seeking of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* Sensu Stricto. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 8, p. 933–943, ago. 2009.
- SMALLEGANGE, R. C.; VERHULST, N. O.; TAKKEN, W. Sweaty Skin: An Invitation to Bite? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 143–148, abr. 2011.
- SWAMI, K. K.; SRIVASTAVA, M. Original Article Blood Meal Preference of Some Anopheline Mosquitoes in Command and Non-Command Areas of Rajasthan, India. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 98-103. 2012.
- TAANMAN, J.-W. The Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1410, n. 2, p. 103–123, fev. 1999.
- TAKIZAWA, F. H. **Levantamento Pedológico e Zoneamento Ambiental da Reserva Biológica de Poço das Antas**. 1995. Departamento de Ciência do Solo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 1995.
- TAKKEN, W.; VERHULST, N. O. Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 433–453, 7 jan. 2013.
- TALEBZADEH, F. et al. Efficiency of Mitochondrial Genes and Nuclear Alu Elements in Detecting Human DNA in Blood Meals of *Anopheles stephensi* Mosquitoes: A Time-Course Study. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 284, 14 ago. 2023.

TANG, Y. et al. Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* for Tembusu Virus and Viral Factors for Virus Transmission by Mosquitoes. **Veterinary Research**, v. 55, n. 1, p. 109, 18 set. 2024.

TATEM, A. J.; HAY, S. I.; ROGERS, D. J. Global Traffic and Disease Vector Dispersal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 16, p. 6242–6247, 18 abr. 2006.

TEMPELIS, C. H. REVIEW ARTICLE1: Host-Feeding Patterns of Mosquitoes, with a Review of Advances in Analysis of Blood Meals by Serology. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 6, p. 635–653, 10 jan. 1975.

THIEMANN, T. C. et al. Mosquito Host Selection Varies Seasonally with Host Availability and Mosquito Density. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. e1452, 20 dez. 2011.

THIEMANN, T. C.; REISEN, W. K. Evaluating Sampling Method Bias in *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Bloodmeal Identification Studies. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 143–149, 1 jan. 2012.

THONGSRIPONG, P. et al. Human–Mosquito Contact: A Missing Link in Our Understanding of Mosquito-Borne Disease Transmission Dynamics. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 114, n. 4, p. 397–414, 8 jul. 2021.

THONTIRAVONG, A. et al. Tembusu-Related Flavivirus in Ducks, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2164–2167, dez. 2015.

TOBE, S. S.; KITCHENER, A. C.; LINACRE, A. M. T. Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e14156, 30 nov. 2010.

TOWNSON, H. The Biology of Mosquitoes. Volume 1. Development, Nutrition and Reproduction. By A.N. Clements. (London: Chapman & Hall, 1992). **Bulletin of Entomological Research**, v. 83, n. 2, p. 307–308, jun. 1993.

TOWNZEN, J. S.; BROWER, A. V. Z.; JUDD, D. D. Identification of Mosquito Bloodmeals Using Mitochondrial *Cytochrome Oxidase Subunit I* and *Cytochrome b* Gene Sequences. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, n. 4, p. 386–393, dez. 2008.

TRIVELLONE, V.; CAO, Y.; DIETRICH, C. H. Comparison of Traditional and Next-Generation Approaches for Uncovering Phytoplasma Diversity, with Discovery of New Groups, Subgroups and Potential Vectors. **Biology**, v. 11, n. 7, p. 977, 28 jun. 2022.

VALERIO, L. et al. Host-Feeding Patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Urban and Rural Contexts within Rome Province, Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 291–294, abr. 2010.

VALINSKY, L. et al. Molecular Identification of Bloodmeals From Sand Flies and Mosquitoes Collected in Israel. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 678–685, 1 maio 2014.

VAN BORM, S. et al. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Smuggled Thai Eagles, Belgium. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 702–705, maio 2005.

- VAN BREUGEL, F. et al. Mosquitoes Use Vision to Associate Odor Plumes with Thermal Targets. **Current Biology**, v. 25, n. 16, p. 2123–2129, ago. 2015.
- VARGHESE, J.; DE SILVA, I.; MILLAR, D. S. Latest Advances in Arbovirus Diagnostics. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1159, 28 abr. 2023.
- VAZQUEZ-PROKOPEC, G. M. et al. A New, Cost-Effective, Battery-Powered Aspirator for Adult Mosquito Collections. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 1256–1259, 1 nov. 2009.
- VEGA-RODRÍGUEZ, J. et al. Multiple Pathways for *Plasmodium* Ookinete Invasion of the Mosquito Midgut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, 28 jan. 2014.
- VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: Ministério da Economia, Fazenda e Planejamento, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Geociências, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991.
- VERDONSCHOT, P. F. M.; BESSE-LOTOTSKAYA, A. A. Flight Distance of Mosquitoes (Culicidae): A Metadata Analysis to Support the Management of Barrier Zones around Rewetted and Newly Constructed Wetlands. **Limnologica**, v. 45, p. 69–79, mar. 2014.
- VIANA, D. S.; SANTAMARÍA, L.; FIGUEROLA, J. Migratory Birds as Global Dispersal Vectors. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 10, p. 763–775, out. 2016.
- WAAGE, J. K. The Evolution of Insect/Vertebrate Associations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 12, n. 3, p. 187–224, nov. 1979.
- WALTON, W. E.; REISEN, W. K. Influence of Climate Change on Mosquito Development And Blood-Feeding Patterns. **Viral Infections and Global Change**. 1. ed. Wiley, 2013. p. 35–56.
- WASHINO, R. K.; TEMPELIS, C. H. Mosquito Host Bloodmeal Identification: Methodology and Data Analysis. **Annual Review of Entomology**, v. 28, n. 1, p. 179–201, jan. 1983.
- WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary History and Recent Epidemic Spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, ago. 2015.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, fev. 2010.
- WIEGMANN, B. M. et al. Single-Copy Nuclear Genes Resolve the Phylogeny of the Holometabolous Insects. **BMC Biology**, v. 7, n. 1, p. 34, dez. 2009.
- WILKERSON, R. C. et al. Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini That Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133602, 30 jul. 2015.

WILSON, M. R. et al. Acute West Nile Virus Meningoencephalitis Diagnosed Via Metagenomic Deep Sequencing of Cerebrospinal Fluid in a Renal Transplant Patient. **American Journal of Transplantation**, v. 17, n. 3, p. 803–808, mar. 2017.

WOLFF, G. H.; RIFFELL, J. A. Olfaction, Experience and Neural Mechanisms Underlying Mosquito Host Preference. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, 15 fev. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global vector control response 2017-2030**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report**. Geneva: World Health Organization, 2023.

ZINSZER, K. et al. Reconstruction of Zika Virus Introduction in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 91–94, jan. 2017.