



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA BEATRIZ OLIVEIRA PAMPOLHA

**COMPETÊNCIA VETORIAL DO MOSQUITO *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823)
AO *Orthoflavivirus ilheusense* (ILHV)**

Belém
2023

ANA BEATRIZ OLIVEIRA PAMPOLHA

**COMPETÊNCIA VETORIAL DO MOSQUITO *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823)
AO *Orthoflavivirus ilheusense* (ILHV)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto e coorientação da Profa. Dra. Jacqueline Cortinhas Monteiro.

Belém
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- O48c Oliveira Pampolha, Ana Beatriz.
COMPETÊNCIA VETORIAL DO MOSQUITO "Culex
quinquefasciatus" (SAY, 1823) AO "Orthoflavivirus ilheusense"
(ILHV) / Ana Beatriz Oliveira Pampolha. — 2023.
viii, 36 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto Coorientação:
Profª. Dra. Jacqueline Cortinhas Monteiro Trabalho de Conclusão de
Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de
Ciências Biológicas, Belém, 2023.
1. Culicidae. 2. Orthoflavivirus. 3. Susceptibilidade. 4.
Arbovírus. 5. Flavivirus. I. Título.

CDD 616.968



UFPA - INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(LICENCIATURA E BACHARELADO)



No dia quinze de dezembro de dois mil e vinte e três, nas dependências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, reuniu-se a Banca Examinadora de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "COMPETÊNCIA VETORIAL DO MOSQUITO *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823) AO *Orthoflavivirus ilheusense* (ILHV)", elaborado pela discente **Ana Beatriz Oliveira Pampolha** e apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas. A Banca Examinadora foi constituída pelo prof. Dr. **Joaquim Pinto Nunes Neto**, orientador do referido TCC, e pelos membros Profa. Dra. **Ivoneide Maria Da Silva** (avaliadora 1) e MsC. **Lúcia Aline Moura Reis** (avaliadora 2). Após análise do trabalho, a Banca Examinadora APROVOU o TCC atribuindo-lhe a nota 9,5, distribuída conforme quadro abaixo, e correspondente ao conceito EXCELENTE conforme determinado pelo art. 178º do Regimento Interno da Universidade Federal do Pará.

PARTE 1 – AVALIAÇÃO DA APRESENTAÇÃO ORAL (5 PONTOS)

ITENS AVALIADOS	NOTA
Apresentação visual (máximo = 1 ponto)	1,0
Conteúdo - domínio, clareza na apresentação do trabalho, resposta à arguição, etc (máximo = 3 pontos)	3,0
Adequação da linguagem (máximo = 1 ponto)	1,0
TOTAL DA PARTE 1	5,0

PARTE 2 – AVALIAÇÃO DO TRABALHO ESCRITO (5 PONTOS)

ITENS AVALIADOS	NOTA
Pesquisa e organização bibliográfica, normas técnicas de edição de texto (máximo = 1 ponto)	1,0
Correlação objetivos X resultados (máximo = 2 pontos)	2,0
Adequação da metodologia (máximo = 1 ponto)	1,0
Análise dos resultados (máximo = 1 ponto)	0,5
TOTAL DA PARTE 2	4,5

TOTAL GERAL	NOTA	CONCEITO
	<u>9,5</u>	<u>EXCELENTE</u>

Banca Examinadora:

- 1- Joaquim Pinto Nunes Neto (orientador) Joaquim P. Nunes Neto
- 2- Ivoneide Maria Da Silva Ivoneide Maria Da Silva
- 3- Lúcia Aline Moura Reis Lúcia Aline M. Reis

Dedico esse trabalho aos meus amigos, pelo apoio e valorização, a minha irmã, que me introduziu no mundo da pesquisa e se tornou meu exemplo de pesquisadora e aos meus pais, que me incentivaram e ajudaram para que pudesse realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais Leni Nunes de Oliveira e João Bosco Soares Pampolha Junior, que me apoiaram, guiaram e permitiram que a minha caminhada nesse processo fosse fácil, sempre me ajudando.

A minha mãe, que sempre me auxiliou e aconselhou e fez o máximo que pôde para meu conforto dentro e fora de casa, além de me ajudar com qualquer dúvida minha no colégio e universidade.

Ao meu pai, que sempre se dispôs a me ensinar e ser uma boa aluna e estudante desde pequena, me ensinando a procurar sempre aprender e não apenas decorar conteúdo.

Sou grata a minha irmã, Ana Flávia Oliveira Pampolha, que foi a minha base de inspiração para seguir nesse caminho, desde pequena muito curiosa e amável com os animais, cuidando de gatos e de lagartas até o estágio adulto, e cheia de livros de ciência para crianças e que nunca se negou a transmitir seu conhecimento para mim, apesar de eu me distrair as vezes.

Aos meus amigos do ensino fundamental, médio, universidade e da vida, que sempre apoiaram, admiraram e elogiaram meu desenvolvimento acadêmico, além de sempre me ajudarem com qualquer dúvida que eu pudesse ter, sempre estarem lá por mim, independentemente de tudo e que carinhosamente me apelidaram de “bea dos mosquitos”.

Agradeço principalmente aos meus amigos Daniel Carvalho, minha dupla de trabalhos e Fernando Yan, minha dupla de atrasos no ônibus, que foram os amigos mais presentes, próximos e essenciais da minha graduação.

Aos meus professores do curso, que sempre me ajudaram e compartilharam seus conhecimentos com a minha turma e me orientaram em apresentações de trabalhos e projetos de pesquisa.

E, por fim, gostaria de agradecer a realização desse trabalho ao Instituto Evandro Chagas, ao meu professor e orientador Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto e todos os membros do laboratório de Entomologia Médica da Seção de Arbovirologia e Febres Emergentes, que foram muito receptivos, gentis e compreensíveis comigo; que sempre me ajudaram e se dispuseram a me ensinar tudo o que sei sobre mosquitos e vírus.

Sem eles, a realização desse trabalho não seria possível, tampouco meu interesse na área de entomologia que, graças a minha excelente experiência ao trabalhar com insetos nesse projeto, permanecerei estudando ao longo da minha vida acadêmica.

RESUMO

Com o aumento do desmatamento e as constantes mudanças climáticas, a aproximação dos animais silvestres com os seres humanos é inevitável e, com isso, surgem os riscos da emergência de zoonoses através do contato entre espécies, seja ele direto ou indireto, através de vetores. O *Orthoflavivirus ilheusense* (ILHV) é um arbovírus emergente da família *Flaviviridae* de ciclo primariamente aviário, detectado em diferentes gêneros de mosquitos e já registrado em humanos em diversos países, causando infecções com sintomas febris e encefalites. Entretanto, para que seja possível a transmissão o vírus depende, em primeiro plano, da competência vetorial do mosquito, que varia de acordo com a sua resposta imunológica pois, em virtude da exposição a patógenos através da prática de hematofagia, possui barreiras fisiológicas que dificultam a sua susceptibilidade a infecção. Com isso, torna-se fundamental determinar a competência vetorial do *Culex quinquefasciatus* para transmissão do ILHV, por ser mosquito comum das residências brasileiras associado a transmissão de arbovírus originalmente aviários causadores de encefalites. Para a realização do estudo foram realizadas duas infecções, via alimentação oral, com 4 mL de sangue de ganso e suspensão viral obtidos de estoque viral com proporção 1:1, com grupo controle de fêmeas da mesma geração não infectadas. A segmentação foi realizada no 7º, 14º e 21º dia pós-infecção (DPI) separados em saliva, corpo e cabeça e, em seguida, foi feito isolamento viral para posterior análise no teste de imunofluorescência indireta (IFI) das amostras. Os resultados do título viral foram obtidos através das amostras diluídas em série de 10 vezes bem como realizado o cálculo das taxas de infecção, disseminação e transmissão. Foram analisados individualmente um total de 70 mosquitos, resultado das duas infecções. Por meio do teste de IFI, foi indicada a ausência da presença do vírus para as amostras de cada DPI, com uma taxa de 0% de infecção, disseminação e de transmissão. Portanto, para a metodologia utilizada o *Culex quinquefasciatus* apresentou refratariedade para o vírus, ou seja, não é um vetor suscetível à infecção e transmissão do *Orthoflavivirus ilheusense*. Ademais, é necessária a realização de mais pesquisas que estudem a resposta imunológica do mosquito para o vírus e os mecanismos de ação do ILHV nas barreiras de infecção dos mosquitos para uma maior compreensão de sua capacidade vetorial.

Palavras-chave: Culicidae; *Orthoflavivirus*; Susceptibilidade; Arbovírus; *Flavivirus*.

ABSTRACT

With the increase in deforestation and constant climate change, the proximity of wild animals to humans is inevitable and the risks of the emergence of zoonoses arise through contact between species, whether direct or indirect, through vectors. *Orthoflavivirus ilheusense* (ILHV) is an emerging arbovirus of the *Flaviviridae* family with a primarily avian cycle, detected in different genera of mosquitoes and already registered in humans in several countries, causing infection with febrile symptoms and encephalitis. However, for transmission to be possible the virus depends, first and foremost, on the mosquito vector capacity, which varies according to its immunological response because, due to exposure to pathogens through the practice of hematophagy, it has physiological barriers that hinder their susceptibility to infection. Therefore, it is essential to determine the vector competence of *Culex quinquefasciatus* for transmitting ILHV, as it is a common mosquito in Brazilian homes associated with the transmission of originally avian arboviruses that cause encephalitis. To carry out the study, two infections were carried out, via oral infection, with 4 mL of goose blood and viral suspension obtained from viral stock with a 1:1 ratio, with a control group of uninfected females of the same generation. Segmentation was carried out on the 7th, 14th and 21st day post-infection (DPI) separated into saliva, body and head and then viral isolation was performed for subsequent analysis in the indirect immunofluorescence test (IIF) of the samples. Viral titer results were obtained using samples diluted in a 10-fold series, as well as calculating infection, dissemination and transmission rates. A total of 70 mosquitoes were analyzed individually, resulting from the two infections. Through the IIF test, the absence of the presence of the virus was indicated for samples from each DPI, with a 0% infection, dissemination, and transmission rate. Therefore, for the methodology used, *Culex quinquefasciatus* was refractory to the virus, that is, it is not a vector susceptible to infection and transmission of *Orthoflavivirus ilheusense*. Furthermore, it is necessary to carry out more research to study the mosquito's immunological response to the virus and the mechanisms of action of ILHV on mosquito infection barriers to better understand its vectorial capacity.

Keywords: Culicidae; *Orthoflavivirus*; Susceptibility; Arbovirus; *Flavivirus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Zoonose.....	2
1.2.	Amazônia.....	3
1.3.	Arbovírus	4
1.3.1.	<i>Orthoflavivirus ilheusense</i> (ILHV)	6
1.4.	Vetor	7
1.4.1.	Gênero <i>Culex</i>	9
2	OBJETIVOS.....	11
2.1.	Geral	11
2.2.	Objetivos específicos.....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1.	Amostras.....	11
3.2.	Preparo do estoque viral.....	12
3.3.	Infecção dos mosquitos	12
3.4.	Segmentação dos mosquitos e extração da saliva	14
3.5.	Isolamento viral	15
3.6.	Teste de imunofluorescência indireta (IFI).....	16
3.7.	Titulação viral.....	17
3.8.	Cálculo das taxas de infecção, disseminação e transmissão	18
4	RESULTADOS	18
5	DISCUSSÃO.....	24
6	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
	ANEXO A – CERTIFICADO CEUA	36

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido a preocupação com as mudanças climáticas resultante das ações antrópicas desenfreadas sobre o meio ambiente, que desencadeiam problemas econômicos, ambientais e sociais ao redor do mundo (de Jesus Santos, Santana Santos & Jesus, 2023).

Dentre esses problemas, está o aparecimento de doenças de origem zoonóticas, que surgem devido a capacidade de troca de ciclo natural do patógeno de um animal silvestre para um ser humano (Filho et al., 2022) e que estão diretamente interligadas com o clima e a fragmentação de habitat (Junior, Mation & Sakowski, 2015).

Essa mudança de ciclo ocorre devido a aproximação dos humanos com animais silvestres, diretamente ou por meio de vetores, que tem sua densidade relacionada a temperatura e umidade local o que torna, assim, regiões tropicais um ambiente ideal para o desenvolvimento constante de vetores de doenças, devido ao clima quente e úmido constante ao longo do ano (Ramos *et al.*, 2019; Allen *et al.*, 2017).

Por isso, tem crescido as problemáticas relacionadas ao desmatamento da mata amazônica, no meio abiótico – atmosfera e clima – e biótico – na vida de inúmeros seres vivos, sobretudo humanos, por possuir um clima equatorial e uma grande biodiversidade, propiciando um ambiente ideal para a emergência de doenças (Junior, Mation & Sakowski, 2015).

Atualmente afetada pelo aumento do desmatamento e queimadas (Santos, Salomão & Veríssimo, 2021), decorrente do enfraquecimento de fiscalização ambiental governamental (Alencar *et al.*, 2021), a Amazônia possui uma elevada importância por ser um dos biomas mais biodiversos do planeta e por ser responsável pela manutenção climática mundial (Ellwanger *et al.*, 2020).

Essa relação clima-desmatamento é demonstrada principalmente no Brasil, país que detém grande parte desse bioma e que, em parte, tem o clima regulado por rios voadores, que dependem da transpiração da floresta amazônica para sua manutenção (Copertino *et al.*, 2019). Além disso, sua biomassa contém um grande estoque de carbono (Copertino *et al.*, 2019), que é liberado para a atmosfera com o desmatamento e contribui para o aumento dos gases do efeito estufa, fenômeno natural que quando agravado é responsável pelo aquecimento global.

Com isso, somado o desflorestamento com as alterações climáticas, o funcionamento natural do ecossistema é afetado, pois a destruição do habitat de espécies locais, em conjunto com as mudanças de temperatura e umidade, afeta o desenvolvimento de espécies e interfere em relações bióticas intra e interespecíficas, que aproxima cada vez mais animais silvestres – potenciais reservatórios de doenças – e vetores, dos humanos (Lima *et al.*, 2021;

Dos Santos, Sousa & Aguilar-Aleixo, 2021). Esse contato torna tanto o ser humano, quanto o animal silvestre suscetíveis a infecção de agentes etiológicos, que antes se limitavam a isolados ciclos.

Conforme aumenta o desmatamento nos biomas, sobretudo na Amazônia, aumenta a probabilidade de emergirem zoonoses que antes se restringiam a animais silvestres (Lima *et al.*, 2021) e interfere no desenvolvimento natural de vetores, com aumento na proliferação.

Diante disso, para que seja possível prevenir a propagação de novas doenças, aumenta a necessidade de estudos que avaliem o risco de emergência de novos patógenos e a interação patógeno-transmissor, através do estudo da resposta dos principais transmissores de zoonoses do país, os mosquitos, com patógenos emergentes, em específico os arbovírus (Allen *et al.*, 2017).

1.1.Zoonose

Uma doença é classificada como zoonose quando o patógeno tem capacidade de infectar um hospedeiro ou vetor e ser transmitido de animais vertebrados para humanos, podendo ser uma doença viral, parasitária, micótica ou bacteriana (Filho *et al.*, 2022).

Segundo Rupasinghe, Chomel & Martínez-López (2022), atualmente 60% das doenças emergentes são de origem zoonótica, com prevalência global (Filho *et al.*, 2022) e constante aumento (Allen *et al.*, 2017). O Brasil, em relação a América Latina, concentra cerca de 40% dos casos de dengue, 25% dos casos de doença de Chagas, 39% de leishmaniose cutânea e 93% de leishmaniose visceral (Alevi, Da Rosa & De Oliveira, 2019).

A emergência de zoonose sofre influência da variação de diversidade de hospedeiros como aves e mamíferos, a exemplo de estudos que mostram um aumento da incidência do *Orthoflavivirus nilense* (WNV) em humanos relacionada a baixa diversidade de pássaros nos Estados Unidos (Keesing *et al.*, 2010), haja vista que a falta do hospedeiro de origem implica na “procura” por diferentes hospedeiros que possam disseminar a infecção de forma mais rápida e eficiente e o humano, tal como o mosquito/vetor, por ausência de contato prévio e consequente falta de barreiras de infecção específicas, são hospedeiros ideais.

Ações antrópicas também estão relacionadas a emergência de doenças zoonóticas, normalmente associadas a práticas agrícolas (Allen *et al.*, 2017), sendo o principal fator o desmatamento (Assis, Lima & Campos, 2022) e a consequente perda de habitat e mudança de nicho de diferentes espécies de animais silvestres, aproximando o contato entre diferentes hospedeiros e vetores de doenças.

Além do desmatamento como impulsionador do aumento de casos de zoonoses há fatores secundários relacionados, como o aumento da liberação de gases do efeito estufa, ocasionando mudanças climáticas, como o aquecimento global (Ellwanger *et al.*, 2020). Tais variações climáticas influenciam na interação hospedeiro-vetor-patógeno e favorece a emergência de novas doenças transmitidas por vetores, principalmente em países subdesenvolvidos (Filho *et al.*, 2022), por alterar seu ciclo natural. Como exemplo o surto de WNV no início dos anos 2000, associado a fortes chuvas e sol na França (Rupasinghe, Chomel & Martínez-López, 2022) e à recente aceleração da expansão de doenças infecciosas nos países do hemisfério norte com as atuais mudanças climáticas, em conjunto com as chuvas (Filho *et al.*, 2022).

Estudos realizados por Junior, Mation & Sakowski (2015) mostram um aumento em 23% da ocorrência de malária a cada 1% de área desmatada e relações de aumento de casos de Doença de Chagas, Paracoccidioidomicose e Leishmaniose com o desflorestamento (Ellwanger *et al.*, 2020), além de um aumento na densidade de mosquito de acordo com a variação da temperatura e umidade do ar (Silva *et al.*, 2021), também há relatos de aumento de surtos de Chikungunya após secas no Brasil, por ocasionar ambientes larvais em barris de armazenamento de água para consumo próprio (Nava *et al.*, 2017).

1.2.Amazônia

O bioma amazônico além de ser o maior bioma brasileiro, com aproximadamente 48% de ocupação territorial, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), somada a um acréscimo de 11% quando considerada a área abordada pela Amazônia legal, possui uma enorme biodiversidade de fauna e flora. A diversidade de espécies, em conjunto com o clima tropical, produz condições favoráveis para a predominância de doenças zoonóticas, por isso, a Amazônia é o maior reservatório de arbovírus do mundo (Araújo *et al.*, 2019), com ênfase na área brasileira por possuir a maior variedade de arbovírus isolada mundialmente (Casseb *et al.*, 2013).

Aproximadamente 20% da mata amazônica original já foi desmatada (Ellwanger *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021), com um aumento exponencial do desmatamento na Amazônia na última década (Lopes *et al.*, 2023), que ameaça o ciclo natural das zoonoses do meio silvestre e põe em risco a saúde humana, com grande potencial pandêmico (Filho *et al.*, 2022).

A perda florestal, consequência do crescimento demográfico, do setor agropecuário e da exploração de recursos ambientais, ocasiona riscos à saúde humana por uma maior

exposição e contato com animais silvestres, seja esse direto ou indireto, associado ao consumo de carne de animais silvestres e mudanças no ciclo natural de vetores de doenças em resposta ao desequilíbrio ecológico (Assis *et al.*, 2022). Com isso, se traz para o meio rural e urbano, a emergência e proliferação de zoonoses, entre outras enfermidades, que antes tinham a circulação limitada somente entre vertebrados silvestres, a exemplo do vírus SARS-CoV-2, causador da pandemia da Covid-19 (Nogueira & Da Silva, 2020) e do Vírus Ebola (DVE), na África Subsaariana que segundo o Ministério da saúde (MS), sofre surtos esporádicos da doença, ambos com emergência associada ao aumento do consumo de carne silvestre e fragmentação de habitat (Wilkinson *et al.*, 2018).

Por isso, a fauna amazônica, que abriga uma enorme diversidade de patógenos, muitos com baixo potencial epidêmico em humanos (Ellwanger *et al.*, 2020), com o aumento do contato com vetores ou hospedeiros silvestres cria um alerta para a emergência de doenças de origem zoonóticas em humanos através do processo de *spillover*.

Spillover é o nome que define a sucedida infecção de um patógeno de um animal silvestre para outros, sobretudo humanos, através da criação de condições internas e externas ideais (Acosta *et al.*, 2020; Plowright *et al.*, 2017; Wilkinson *et al.*, 2018).

O processo que ocorre para a infecção do patógeno ser bem sucedida, segundo Plowright *et al.* (2017), decorre de três principais etapas: a primeira é a pressão do patógeno, que depende da distribuição do hospedeiro e {...} sobrevivência, desenvolvimento e disseminação no meio externo; a segunda etapa é a proximidade do humano com o vetor; seguido pela terceira, que depende tanto da dose do vírus quanto de respostas imunológicas e genéticas do humano.

A probabilidade de *spillover* entre espécies está condicionada, principalmente, pela exposição ao agente infeccioso, que aumenta conforme maior proximidade de seres humanos com outros animais (Acosta *et al.*, 2020) e é maior em ambientes com perda intermediária (Wilkinson *et al.*, 2018) devido a sobreposição de habitats e compartilhamento de recursos, que aproximam as espécies (Acosta *et al.*, 2020).

1.3.Arbovírus

Os arbovírus são vírus que tem capacidade de infectar artrópodes, chamados de vetores, com viremia suficiente para que ocorra a transmissão e estabelecimento do patógeno em um animal vertebrado, chamado hospedeiro. Essa transmissão em vertebrados pode ocorrer através de contato com animais infectados ou vetores. A manutenção do patógeno no vetor

ocorre por contaminação via alimentação em vertebrados contaminados ou por transmissão vertical, chamada via transovariana, da fêmea para as proles (Cruz & Vasconcelos, 2008; Casseb *et al.*, 2013).

A distribuição geográfica dos arbovírus é predominante, principalmente, em regiões tropicais, por oferecer constantes condições favoráveis durante o ano (Casseb *et al.*, 2013). Os mosquitos, por não controlarem sua temperatura, dependem da variação climática do ambiente em que vivem para a realização de reações químicas biológicas (Fouque & Reeder, 2019), por isso a temperatura constante e alta dos ambientes intertropicais são ideais, pois influenciam no aumento da taxa de desenvolvimento, produtividade e abundância de mosquitos, além de auxiliar na diminuição do tempo de incubação extrínseca do mosquito, período de amplificação do patógeno em seu corpo (Fouque *et al.*, 2019; Poh *et al.*, 2019).

Estimativas apontam a existência de mais de 500 espécies de arbovírus no mundo, desses, mais de 150 patogênicos ao ser humano (Lopes *et al.*, 2014; Da Silva, 2021). No Brasil já foram isoladas 200 espécies de arbovírus diferentes, com aproximadamente 100 relacionados a casos clínicos em humanos (Da Silva, 2021). De todos os arbovírus isolados no país, até 2013, 93% haviam sido identificados inicialmente na Amazônia, muitos encontrados somente nessa região até então (Casseb *et al.*, 2013). Desses, 34 patogênicos para o homem (Cruz *et al.* 2008).

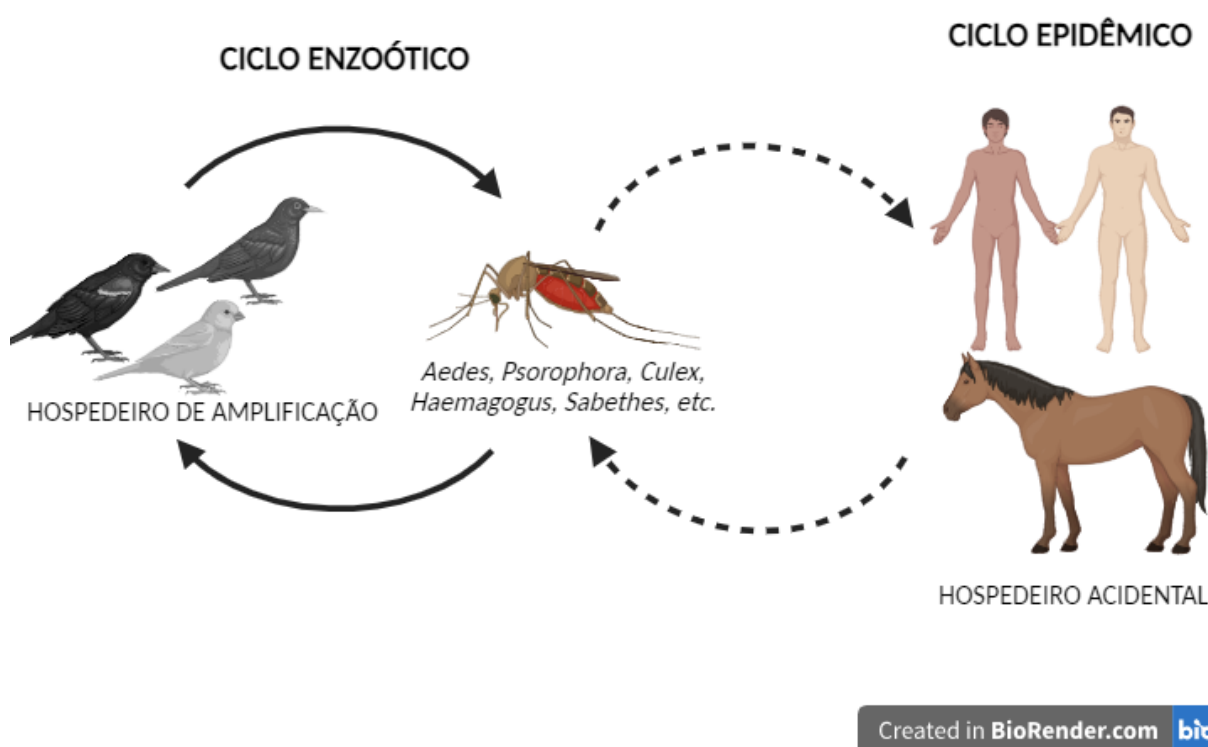
Os arbovírus, com exceção do vírus da peste suína africana (ASFV), são vírus de RNA (Da Silva, 2021; Casseb *et al.*, 2013), as principais famílias relacionadas a doenças ocasionadas em humanos são *Sedoreoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Peribunyaviridae*, de RNA segmentado (múltiplas moléculas genômicas) e *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, de RNA não segmentado (uma única molécula genômica) (da Silva, 2021; Lopes *et al.*, 2014, Casseb *et al.*, 2013; QIN *et al.*, 2014).

Dos 6 principais, a família *Peribunyaviridae* possui o maior número de arbovírus conhecidos, distribuídos em cinco gêneros. *Togaviridae* e *Flaviviridae* possuem somente um gênero de importância médica para estudos de arbovírus, que se diferenciam na classificação antigênica; *Alphavirus*, da família *Togaviridae* pertencente sorologicamente ao grupo A e o gênero *Orthoflavivirus*, da família *Flaviviridae* pertencente ao grupo B (Casseb *et al.*, 2013).

O gênero *Orthoflavivirus* possui cerca de 39 espécies de arbovírus conhecidos, com capacidade de reatividade cruzada entre si e de causar encefalites ou febres hemorrágicas em vertebrados (Lopes *et al.*, 2014). Além disso, esses vírus possuem uma relação de coevolução com o *Aedes aegypti*, que faz com que o mosquito possa se infectar e transmitir até quatro vírus, causadores de quatro doenças diferentes (de Lima, da Silva, de Souza, 2021).

A maioria dos arbovírus transmitidos por espécies do gênero *Culex* são da família *Flaviviridae* e *Togaviridae* e possuem reservatórios aviários (Franz *et al.*, 2015). A exemplo do ciclo de transmissão enzoótico do *Orthoflavivirus ilheusense* (ILHV) – figura 1 – em que as aves atuam como hospedeiros de amplificação e o ser humano e equinos como hospedeiros acidentais e seus principais vetores são mosquitos pertencentes, principalmente, dos gêneros *Aedes* e *Psorophora* (Vieira *et al.*, 2019).

Figura 1 – Ciclo de transmissão do arbovírus *Orthoflavivirus ilheusense*



Descrição: exemplificação do ciclo de transmissão enzoótico e epidêmico do arbovírus *Orthoflavivirus ilheusense* através dos mosquitos em que o arbovírus já foi isolado. Imagem: desenvolvida por autor em Biorender.

1.3.1. *Orthoflavivirus ilheusense* (ILHV)

O *Orthoflavivirus ilheusense* é um arbovírus neurotrópico (Saivish, 2023) emergente pertencente ao gênero *Orthoflavivirus* da família *Flaviviridae*, classificado originalmente no complexo antigênico da encefalite japonesa (Johnson *et al.*, 2007) e atualmente considerado parte do complexo antigênico Ntaya (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV), de acordo com o grau de reatividade entre os vírus (da Costa *et al.*, 2023).

O ILHV é um vírus de RNA simples de sentido positivo, envelopado e de morfologia esférica, com aproximadamente 45nm de diâmetro (Plante *et al.*, 2023). Além disso, esse arbovírus é filogeneticamente associado ao *Rocio virus* (ROCV), sendo considerados da mesma espécie por causa de suas similaridades de aminoácidos (da Costa *et al.*, 2023).

Isolado primeiramente em 1944 na cidade de Ilhéus – BA, já foi detectado em diferentes mosquitos, a exemplo de mosquitos do gênero *Aedes*, *Psorophora*, *Culex*, *Haemagogus*, *Sabethes*, dentre outros. Apesar de apresentar um ciclo enzoótico entre aves e mosquitos, atualmente já foi registrada a ocorrência de infecção de ILHV em humanos em pelo menos seis países da América do sul a exemplo de Trinidad, Panamá, Brasil e Colômbia. Também já foram registrados casos em outros mamíferos, como macacos, roedores e morcegos (da Costa *et al.*, 2023; Reis & Neto, 2021).

No Brasil, já foi registrada a presença do vírus em diferentes biomas, incluindo a região sudeste, o Pantanal e na Amazônia. Entretanto, ainda há poucos casos de infecção por ILHV, apesar de já haver registro sorológico do vírus em humanos em diferentes estados brasileiros e em diferentes espécies de mosquitos do gênero *Culex* (Vieira *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2023^a).

Em humanos esse arbovírus pode causar síndrome febril e encefalite (da Silva, 2021), podendo evoluir para meningoencefalite, apesar disso, ainda não há casos de sequelas a longo prazo e somente uma morte relacionada a infecção com ILHV (da Costa *et al.*, 2023; Milhim *et al.*, 2020).

1.4.Vetor

A densidade de mosquitos está diretamente relacionada com a temperatura (Silva *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2019), por isso regiões tropicais e equatoriais tem maior probabilidade de serem berço de novas doenças zoonóticas.

A Amazônia possui uma alta biodiversidade e, dentro dela, há uma grande variedade de insetos, incluindo os hematófagos, que são os principais vetores de zoonoses como a Doença de Chagas, Malária, Leishmaniose e variados arbovírus, principalmente do gênero *Orthoflavivirus*, como o vírus da Dengue (*Orthoflavivirus denguei* – DENV) e da Febre Amarela (*Orthoflavivirus flavi* – YFV).

A prática da hematofagia é comum entre diversos insetos que parasitam os animais vertebrados, muitos desses insetos pertencentes a ordem Díptera, principais transmissores de arbovírus no mundo (Franz *et al.*, 2015), como flebotomíneos e mosquitos, principalmente da

família *Culicidae*, que inclui os gêneros *Aedes* sp. e *Culex* sp., por serem amplamente distribuídos ao redor do mundo (Franz *et al.*, 2015; Viglietta *et al.*, 2021).

Os arbovírus são transmitidos para os mosquitos através de 3 formas de contato: a transmissão vertical, da fêmea contaminada para a sua prole durante a produção dos ovos; a transmissão horizontal, entre a fêmea e o macho durante a cópula; e a vetorial, através do contato da saliva do mosquito com a corrente sanguínea do hospedeiro durante a alimentação (Viglietta *et al.*, 2021).

Entre as espécies de mosquitos somente as fêmeas realizam a hematofagia, em razão de utilizar o sangue como uma fonte de aminoácidos necessários para a maturação de seus ovos. Dessa forma, a alimentação sanguínea é favorável e necessária por fornecer nutrientes para a fêmea, porém desfavorável ao se tornar uma rica fonte de infecção, por expor os mosquitos a diversos patógenos como bactérias, fungos e vírus. Logo, como resposta imunológica, os mosquitos desenvolveram diversas barreiras fisiológicas a fim de dificultar a infecção por patógenos (Silva, Lemos & Silva, 2012).

Por isso, a susceptibilidade a infecção está relacionada a fatores genéticos e mecânicos, que variam de acordo com cada espécie de mosquito, por isso, somente alguns vírus específicos possuem a capacidade de infectar mosquitos e serem transmitidos (Franz *et al.*, 2015).

Ao se infectar, o artrópode permanece com o vírus até a morte (Casseb *et al.*, 2013), com isso o mosquito pode disseminar o vírus para outros animais, através das diferentes formas de transmissão viral, e se tornar vetor do patógeno. Contudo, para isso ocorrer primeiramente o agente precisa passar por três principais barreiras do mosquito; que começam no intestino médio, a porta de entrada principal da infecção, segue para a hemocele e, logo depois, para as glândulas salivares (Viglietta *et al.*, 2021).

Após a alimentação sanguínea, o sangue ingerido pelo mosquito é armazenado em um saco quitinoso dentro do intestino médio para futura digestão, por isso, para infectar o restante do corpo do mosquito, o vírus precisa passar pelo epitélio do intestino médio – a primeira barreira. Com a disseminação bem sucedida no intestino médio, o vírus se encaminha para a hemocele, onde estão localizados os hemócitos, células imunológicas similares aos macrófagos em humanos, que servem para reconhecimento e fagocitose do antígeno – a segunda barreira. Com isso, o vírus consegue alcançar os tecidos das glândulas salivares e, assim, transpor as barreiras de infecção e de escape das glândulas salivares; a terceira e última barreira. Ainda assim, após a replicação nas glândulas, para que a saliva infectada seja liberada pelos dutos salivares e disseminada através da picada do mosquito é preciso ocorrer a indução

da apoptose nas células acinares de suas glândulas, local em que fica depositada a saliva produzida (Viglietta *et al.*, 2021; Franz *et al.*, 2015).

1.4.1. Gênero *Culex*

O complexo *Culex pipiens* (figura 2), definido em 1951 (Mattingly, 1967), engloba mais de 4 subespécies de mosquitos do gênero *Culex*, organizados com base em comparações geográficas e morfofisiológicas (Vallada, 1972). Além disso, possuem grande relevância médica por serem cosmopolitas e terem uma relação próxima com humanos (Gil *et al.*, 2021), se tornando grandes vetores de doenças ao redor do mundo, pois, assim como todos da família *Culicidae*, os mosquitos do complexo *Culex pipiens* são hematófagos e, por isso, tem potencial para transmitir doenças tanto para animais silvestres e domésticos, quanto para seres humanos através de sua saliva.

Figura 2 – Mosquito do complexo *Culex pipiens*



Descrição: Foto do mosquito do gênero *Culex pipiens* Linneaus. Imagem: Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU).

Na América existem pelo menos 7 espécies do gênero *Culex* distribuídas pelo continente, que variam de acordo com a temperatura, umidade e vegetação local (Gorris, Bartlow, Temple *et al.*, 2021). No Brasil, grande parte do país é ocupada pela espécie *Culex*

quinquefasciatus, que é mais adaptada a climas tropicais, enquanto regiões temperadas são ocupadas principalmente por *Culex pipiens* (Fernandes, 2017; Rios *et al.*, 2022).

Como todos do complexo *Cx. Pipiens*, o *Cx. quinquefasciatus* é um mosquito de hábito noturno, de ampla distribuição e densidade em ambientes e domicílios urbanos (Fernandes, 2017) que, junto com os mosquitos *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, tem capacidade de se adaptar em ambiente urbano e rural e residir em habitações humanas (Van Den Hurk *et al.*, 2017; Harvey-Samuel *et al.*, 2021). Sua principal característica diferenciadora tem relação com a sua oviposição. O *Cx. quinquefasciatus* prefere águas turvas e ricas em matérias orgânicas como ambiente larval. Além disso, a fêmea ovipõe até cerca de 250 ovos, que permanecem agrupados em formato de jangada, diretamente sobre a água (Fernandes, 2017).

O *Culex quinquefasciatus* possui como preferência a hematofagia em humano (antropofilia) e em aves (ornitofilia), podendo ser um possível vetor de amplificação de vírus aviários, a exemplo do *Orthoflavivirus nilense* (WNV), como destacado por Garcia-Rejon *et al.* (2010).

Atualmente associados a transmissão do WNV e vírus relacionados a doenças encefálicas, tal como o *Orthoflavivirus louisense* (SLEV), os mosquitos do gênero *Culex* tem sido estudados quanto a sua capacidade de se tornar vetor de diferentes arbovírus, principalmente emergentes, com potencial epidêmico (Gorris *et al.*, 2021).

Estudos já demonstraram a incapacidade de espécies de mosquitos do gênero *Culex* para a transmissão de dois dos vírus de maior circulação do território brasileiro, o *Orthoflavivirus zikaense* – ZIKV (Main *et al.*, 2018; De Gusmão, Patriota & De Lima Carvalho, 2019) e o *Orthoflavivirus denguei* – DENV (Huang, Vergne & Gubler, 2019).

Entretanto, ainda não é descartada a possibilidade de transmissão desses vírus pelo *Cx. quinquefasciatus*, visto que já foram detectados casos positivos para a sua infecção (Van Den Hurk *et al.*, 2017; Main, 2018), indicando a possibilidade de susceptibilidade dessa espécie, que pode variar de acordo com a exposição do mosquito a diferentes condições ambientais e virais.

Por isso estudos de competência vetorial (CV), ou seja, a capacidade de um vetor de infectar-se com um patógeno (susceptibilidade a infecção), mantê-lo em multiplicação pelos tecidos (período de incubação extrínseco – PIE) e transmiti-lo a partir de uma alta viremia nas glândulas salivares e na saliva (Vogels *et al.*, 2016), relacionados à cinética da replicação e tropismo viral nas populações de mosquitos do gênero *Culex* são importantes, pois podem contribuir para uma melhor compreensão do potencial de transmissão e da interação vírus-vetor, fatores que condicionam a epidemiologia da doença em uma determinada localidade.

Devido ao pouco conhecimento a respeito da epidemiologia da doença causada pela infecção do ILHV, a realização de experimentos de infecção experimental do *Orthoflavivirus ilheusense* em mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* possui grande importância para o entendimento dos possíveis mecanismos de transmissão do vírus por esse vetor, uma vez que não há trabalhos de análise de competência vetorial dessa espécie para a transmissão do ILHV, além de possibilitar a consideração de outras espécies que podem vir a atuar como vetores do ILHV, em conjunto com os vetores já conhecidos como os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Psorophora*.

A presente pesquisa é o prelúdio para a melhor compreensão a respeito da existência de mecanismos de defesa desse vetor frente a uma alimentação sanguínea infecciosa.

2 OBJETIVOS

2.1.Geral

Avaliar a competência vetorial do *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823) para transmissão do *Orthoflavivirus ilheusense*.

2.2.Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade da infecção de mosquitos *Culex quinquefasciatus* a partir de suspensão viral de células infectadas com *Orthoflavivirus ilheusense*.
- Determinar o título viral do ILHV nas regiões de cabeça, tórax e abdômen (corpo) e saliva após o período de 7, 14 e 21 dias pós infecção.
- Calcular as taxas de infecção, disseminação e transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Amostras

Com o certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas (Anexo A), as colônias de *Cx. quinquefasciatus* (Cidade Nova – Ananindeua/Pará) foram obtidas através da captura ativa de adultos e cedidas pelo Laboratório de Entomologia Médica do Instituto Evandro Chagas (IEC), sendo mantidas em insetário

climatizado com temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $80\% \pm 10\%$ e ciclos de claro/escuro de 12h/12h, de acordo com protocolo estabelecido por Vogels *et al.* (2016).

As jangadas de ovos foram criadas em recipientes contendo 700 mL de água destilada com enriquecimento ambiental de matéria orgânica, com suplementação de ração de peixe triturada e esterilizada, durante os quatro estádios do período larval (L1, L2, L3 e L4). Ao atingirem a forma de pupa, foram coletadas com auxílio de pipeta Pasteur e transferidas para um recipiente transparente de polipropileno (*Firstlab*®) contendo 50 mL de água destilada e acondicionadas em gaiolas entomológicas com dimensões de 30x30x30 cm.

As formas aladas foram mantidas com algodão embebido em solução de açúcar a 10% *ad libitum*. Para a realização da infecção e para o grupo controle foram utilizadas as proles da geração inicial, a geração F1.

3.2.Preparo do estoque viral

O estoque viral foi preparado em células Vero de rim de macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*) (ATCC® CCL-81™), na qual 150 µL do vírus foram inoculados em frasco de poliestireno para cultura de células (*Sarstedt*®) com capacidade de 21 a 55 mL, o frasco foi então incubado a uma temperatura de 37°C em estufa a 5% CO_2 por uma hora para adsorção, agitando levemente o frasco a cada 15 minutos. Após a adsorção, 25 mL de meio de cultura de manutenção 199 (GIBCO) contendo 2% de soro fetal bovino, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) foram adicionados ao frasco.

As células infectadas foram mantidas em estufa e monitoradas diariamente em microscópio invertido (*ZEISS*) para avaliação da ocorrência de efeito citopático (ECP) por um período de cinco dias. Após a identificação do ECP em 90% da monocamada, o frasco foi agitado para liberação da monocamada da parede, adicionou-se 10% de soro fetal bovino e realizou-se aliquotagem de 2 mL do sobrenadante da cultura em tubos para criogênica congelar KMA (*Mylabor*®), mantendo-os em freezer a -70°C até o momento do uso (TESH, 1979).

3.3.Infecção dos mosquitos

Após a emergência da fase adulta da geração F1, as fêmeas foram separadas e privadas de açúcar por um período de 24 horas antes da alimentação sanguínea infecciosa. As infecções orais foram realizadas em Infectório, em uma cabine de segurança biológica (CBS) classe II B2.

Com o auxílio de um alimentador artificial de vidro (Figura 3), a área de oferta de sangue para os mosquitos foi envolvida por uma membrana de peritônio de fígado bovino adquirida em frigorífico. Preenchido com 2 mL de sangue de ganso desfibrinado, adquirido no biotério do IEC, e mais 2 mL de suspensão viral, o sangue dentro do alimentador artificial foi mantido constantemente aquecido a 37°C em “banho-maria” (*Digital Bath NI 1255-25L*) e as fêmeas permaneceram expostas à refeição de sangue infectante por 60 minutos.

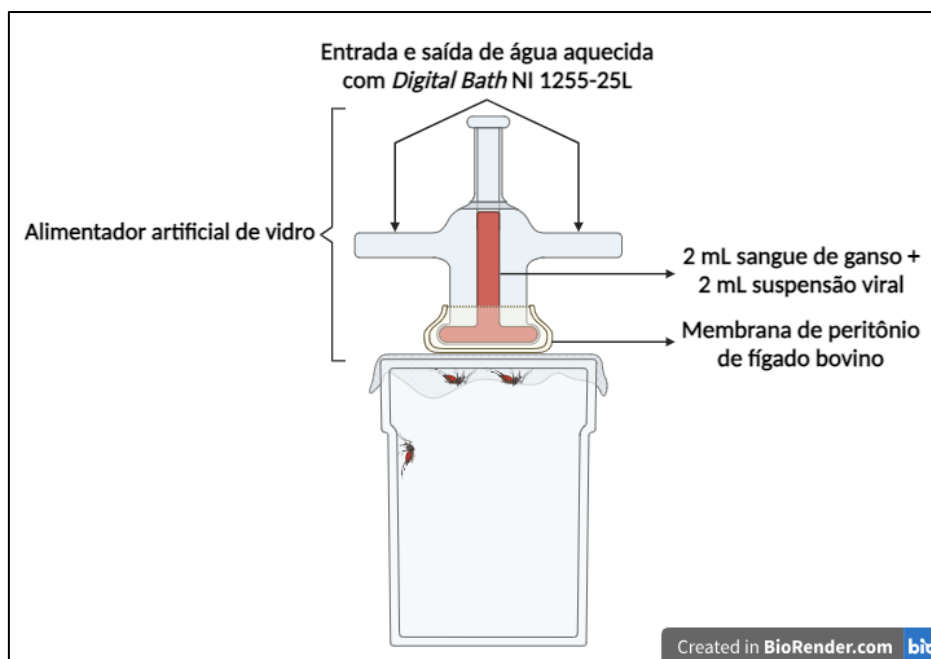
Após o período de exposição à refeição de sangue infeccioso, as fêmeas ingurgitadas foram separadas e transferidas para uma gaiola entomológica dupla.

Quarenta e oito horas após a alimentação do sangue infectante, um recipiente transparente de polipropileno (*Firstlab®*) contendo 15 mL de água destilada e matéria orgânica para oviposição foi depositado no interior das gaiolas, para possibilitar a verificação da prole, se necessário, permanecendo nesta por um período de até sete dias após a alimentação infectante.

O grupo controle de mosquitos foi composto por fêmeas não infectadas pertencentes à mesma geração utilizada na infecção, de acordo com os protocolos definidos por Vogels *et al.* (2016).

Para maior veracidade dos resultados foram realizadas duas infecções independentes na colônia de proles F1 da mesma geração inicial (F0).

Figura 3 – Alimentação com alimentador artificial



Descrição: exemplificação da alimentação artificial do mosquito *Culex quinquefasciatus* com sangue de ganso contendo suspensão viral de *Orthoflavivirus ilheusense*. Imagem: desenvolvida por autor em Biorender.



Descrição: foto do interior da gaiola durante a alimentação artificial do mosquito *Culex quinquefasciatus*. Imagem: Lúcia Aline Reis.

3.4.Segmentação dos mosquitos e extração da saliva

A segmentação dos mosquitos e a extração da saliva foi realizada no 7º, 14º e 21º dia pós-infecção (DPI) sendo separados de forma individual cabeça, saliva, tórax e abdômen (corpo) – figura 4.

A segmentação do corpo e cabeça foi realizada de acordo com a técnica descrita por Consoli & Oliveira (1994): as fêmeas infectadas foram paralisadas em banho de gelo, sendo depositadas em lâmina de microscópio (*Kolplast*®) esterilizada, com o ventre para cima foram retiradas, com auxílio de pinça entomológica, primeiramente as asas e pernas.

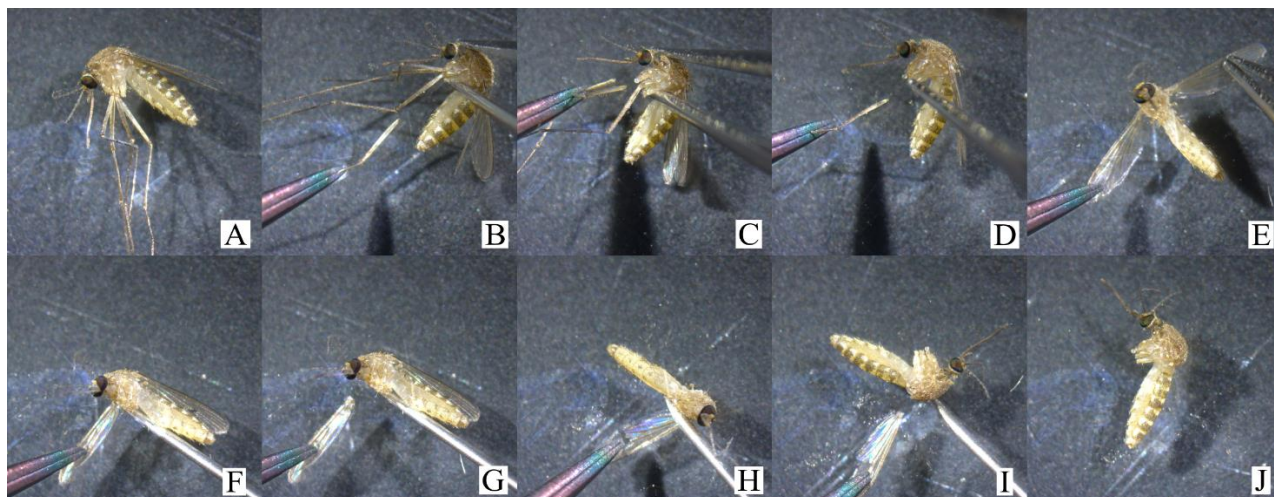
Em seguida, foi realizado o procedimento de extração de saliva acordo com a técnica adaptada descrita por Nuñez *et al.* (2020) e Castro *et al.* (2004): a probóscide da fêmea foi inserida na ponta de uma micropipeta de polipropileno de 10 µL (*Axygen*®) contendo 5 µL de soro fetal bovino (SBF) (GIBCO) e, então, aguardou-se 30 minutos para a salivação. Após esse período, o meio contendo a saliva foi transferido para tubos eppendorf (*Sarstedt*®) contendo 45 µL do meio Leibowitz L-15 (GIBCO), sendo a saliva imediatamente armazenada em freezer a -70°C.

Após a extração da saliva, o corpo e a cabeça de cada mosquito foi separado e transferido para tubos *eppendorf* (*Sarstedt*®) individualmente e, então, 1000 µL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) (*Life technologies, Carlsbad, CA, EUA*) contendo 2% de penicilina e estreptomicina, 1% de fungizona e 5% de soro fetal bovino mais

uma esfera de aço inoxidável de 3 mm foram adicionados aos *eppendorfs* para a realização do procedimento de maceração em equipamento *TissueLyser II* (Qiagen, Hilden, Alemanha) a uma velocidade de 25 voltas (Hz) por minuto.

Logo após, as amostras foram armazenadas em freezer a temperatura -70°C por um período mínimo de 24 horas.

Figura 4 – Segmentação do mosquito



Descrição: Passo a passo da segmentação realizada nas fêmeas do mosquito *Culex quinquefasciatus* de acordo com a técnica descrita por Consoli & Oliveira (1994). Imagem: Lúcia Aline Reis.

3.5. Isolamento viral

O isolamento viral em cultura de células foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Igarashi (1978) no qual, após o processo de maceração e incubação das amostras em freezer -70°C , os *eppendorfs* foram centrifugados (*Hettich*® modelo *Mikro 220R*) a uma velocidade de 10.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a uma temperatura de 4°C . Em seguida, 100 μL do sobrenadante do macerado foi coletado e inoculado na monocamada de cultura de células de *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC: CRL-1660) cultivada em placas de 24 poços para cultura de células (*TPP*®). Após a inoculação as placas foram levadas para estufa 20°C e 5% de CO_2 para adsorção e foram homogeneizadas a cada 15 minutos. Posteriormente, 1,5 mL de meio de manutenção *Leibowitz L-15* (*GIBCO*) preparado com 2,95% de fosfato de triptose, aminoácidos não essenciais, penicilina, estreptomicina e 2% de soro fetal bovino foram adicionados à monocamada.

As células C6/36 inoculadas foram armazenadas em estufa (*NAPCO*) com 5% de CO_2 a 28°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) e avaliadas diariamente em microscópio óptico invertido (*OLYMPUS* modelo CK-2) por sete dias para verificar a ocorrência de efeito citopático (ECP) e

posteriormente submetidos ao teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando anticorpo policlonal para grupo B (*Flavivirus*).

Controles positivo e negativo também foram utilizados para conferir maior confiabilidade ao teste.

3.6. Teste de imunofluorescência indireta (IFI)

O teste foi realizado de acordo com protocolo estabelecido por Gubler (1989). Adicionou-se em cada orifício da lâmina de imunofluorescência 25 µL do sobrenadante de células C6/36 inoculadas com as amostras, aguardou-se sedimentação das células por 10 minutos, retirou-se o excesso de amostra da lâmina e aguardou-se a secagem da amostra em cabine de segurança biológica (CBS), em seguida foi realizado a fixação com acetona propanona (PA) por 10 minutos a -20°C. As lâminas foram, então, imersas em solução de albumina bovina nas concentrações de 3% e 1% e em PBS (pH 7,4) por 10 minutos a 25°C. A seguir, 25 µL do anticorpo policlonal fluído ascético hiperimune (FAI) produzido em camundongo suíço albino adulto (*Mus musculus*) pela Seção de arbovirologia e febres emergentes (SAARB) do IEC, foram adicionados aos orifícios das lâminas e as mesmas acondicionadas em câmara úmida em estufa (NAPCO) por 30 minutos a 37°C.

As lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 10 minutos, em seguida rinsadas em água destilada, secas e 25 µL do anticorpo anti-mouse conjugado com isotiocianato de fluoresceína (*Cappel, catalog: 55499, FITC-conjugated goat IgG, fraction to mouse immunoglobulin IgG, IgA, and IgM, United State*) diluído em 1:900 em PBS e Azul de Evans (*Evans Blues*) a 0,5% foi adicionado a cada orifício da lâmina.

As lâminas foram novamente acondicionadas em câmara úmida e em estufa por 30 minutos, repetiu-se a lavagem com PBS por 10 minutos e adicionou-se 25 µL de glicerina tamponada (pH 8,2) em cada orifício da lâmina com fixação da lamínula para observação em microscópio de fluorescência (*Olympus BX51, objetiva UPlanFL N20X/ 0,5 e filtros WB e U-25nd*).

O grau de fluorescência das amostras positivas foi analisado de acordo com o protocolo estabelecido por Weller & Coons (1954), na qual as reações de fluorescência são graduadas de 1+ (uma cruz) a 4+ (quatro cruzes), onde 1+ indica fluorescência mínima e 4+ indica fluorescência intensa de acordo com a presença e quantidade de vírus.

3.7. Titulação viral

A titulação viral foi realizada no estoque viral utilizado no processo de infecção e no sangue contendo o *Orthoflavivirus ilheusense* (MIX).

A titulação viral foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Dulbecco & Vogt (1953), no qual em uma placa de cultura de células de 96 poços (Kasvi®) dividida ao meio para permitir a diluição em série de 10 vezes das amostras (10^{-1} a 10^{-6}), diluente PBS com bovina a 0,75%, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 2% de soro fetal bovino. 225 µL de meio de cultura de manutenção 199 (GIBCO) foram adicionados à placa, então 25 µL da amostra foram adicionados ao orifício identificado como “-1” e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, aspirou-se 125 µL do orifício “-1” e transferiu-se para o próximo orifício identificado por “-2”, repetindo o procedimento até a última diluição de “-6”.

Após o processo de diluição da amostra, em uma placa de cultura de células de 24 poços (Kasvi®) contendo monocamada de células Vero cultivadas (*Cercopithecus aethiops*) (ATCC® CCL-81™), onde cada orifício é identificado de -1 a -6 de acordo com a diluição realizada, o meio de cultura 199 (GIBCO) usado para cultivar células VERO foi substituído e 100 µL da amostra viral diluída foram adicionados a cada poço de acordo com a identificação. Em seguida, a placa foi incubada em estufa (NAPCO) a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora, na qual, a cada 15 minutos, a placa foi homogeneizada para aumentar a adsorção viral.

Após a adsorção viral, 1,5 mL de carboximetilcelulose (CMC, 3% em meio 199) suplementado com 5% de soro fetal bovino, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) foram adicionados a cada orifício, seguido pela incubação da placa em estufa a 37°C por quatro dias. Após esse período, as células foram fixadas com 1,5 mL de formaldeído a 10% em água e a placa incubada na estufa por quatro a sete horas ou em overnight. Em seguida, a placa foi lavada até a completa retirada do produto e são adicionados 1,5 mL do corante Cristal Violeta 0,1% aguardando em temperatura ambiente por um período de 24 horas.

A titulação viral foi determinada multiplicando-se o número de unidades formadoras de placa (PFU) obtidas em uma determinada diluição, pelo fator de diluição, sendo o resultado expresso em Unidades Formadoras de Placas por Mililitro (UFP/mL).

$\text{Título viral} = \text{Nº de PFU} \times \text{fator de diluição} \times \text{diluição}$

3.8.Cálculo das taxas de infecção, disseminação e transmissão

O cálculo da taxa de infecção foi realizado a partir do número de mosquitos com o corpo infectado entre as fêmeas ingurgitadas, enquanto a taxa de disseminação foi calculada com base no número de mosquitos com cabeça infectadas entre os mosquitos previamente identificados com o corpo infectado e a taxa de transmissão foram calculados de acordo com o número de mosquitos com a saliva infectada entre aqueles positivos para infecção e disseminação de acordo com protocolo estabelecido por Chouin-Carneiro (2016).

$$\text{Taxa de infecção: } \frac{\text{nº de fêmeas com corpo infectado}}{\text{Total de fêmeas ingurgitadas}}$$

$$\text{Taxa de Disseminação: } \frac{\text{nº de fêmeas com cabeça infectada}}{\text{Total de fêmeas com o corpo infectado}}$$

$$\text{Taxa de Transmissão: } \frac{\text{nº de fêmeas com saliva infectada}}{\text{Total de fêmeas com corpo e cabeça infectadas}}$$

4 RESULTADOS

Foram realizadas duas infecções independentes nos mosquitos de mesma colônia via alimentação sanguínea *in vitro* e analisados no teste de IFI um total de 70 mosquitos, com 16 provenientes da 1ª infecção e 54 provenientes da 2ª.

Foram analisadas, no 7 DPI da 1ª infecção, as amostras de cabeça e tórax e abdômen de 4 mosquitos, assim como no 14 DPI; no 21 DPI foram analisados um total de 8 mosquitos. Assim como os mosquitos da 1ª infecção, também foram analisadas as amostras de cabeça (Figura 5 e 6) e tórax e abdômen (Figura 7) dos mosquitos da 2ª infecção, com análise de 17 mosquitos no 7 DPI; 18 mosquitos no 14 DPI e 19 mosquitos no 21 DPI (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise e resultado de amostras no 7º, 14º e 21º DPI

		7 DPI		14 DPI		21 DPI	
	Amostra	Nº	Resultado	Nº	Resultado	Nº	Resultado
1ª infecção	Cabeça	4	Ø	4	Ø	8	Ø
	Tórax	4	Ø	4	Ø	8	Ø

	Abdômen	4	Ø	4	Ø	8	Ø
--	----------------	---	---	---	---	---	---

2ª infecção	Cabeça	17	Ø	18	Ø	19	Ø
	Tórax	17	Ø	18	Ø	19	Ø
	Abdômen	17	Ø	18	Ø	19	Ø

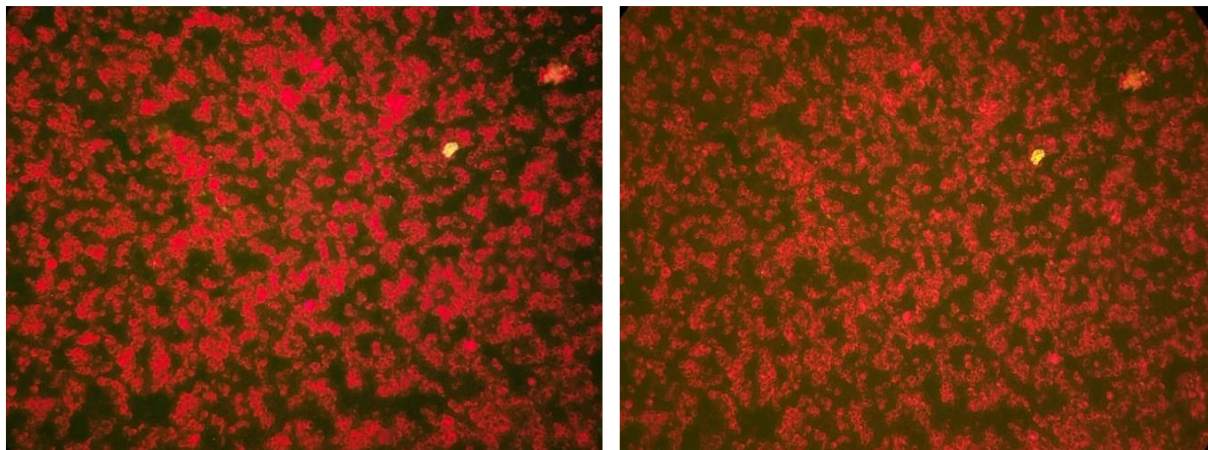
O teste de IFI das 140 amostras dos mosquitos não detectou a presença de *Orthoflavivirus ilheusense* nas partes anatômicas da cabeça e do tórax e abdômen (corpo), indicando a não infecção de ILHV pelas fêmeas *Culex quinquefasciatus*.

Por causa do resultado negativo para infecção de ILHV não foi necessária a análise das amostras de saliva, haja vista que a presença de vírus na saliva só existirá se houver a infecção e replicação de vírus em outras partes do corpo do mosquito.

Entretanto, nos controles, o resultado da imunofluorescência indireta foi positivo quando realizada no sangue contendo o *Orthoflavivirus ilheusense* (MIX) da 1ª e da 2ª infecção (Figura 8), com 2 cruces (++) e também no estoque viral com anticorpos policlonais do grupo B (Figura 9), com 3 cruces (+++), também mostrou um resultado de 1 cruz (+) para o grupo controle positivo (C+) contendo *Orthoflavivirus denguei* tipo 1 – DENV1 (Figura 10), assim como a presença de efeito citopático em 90% da monocamada das células infectadas (Figura 11). Assim, é notória a indicação de presença de vírus no sangue oferecido às fêmeas para serem infectadas.

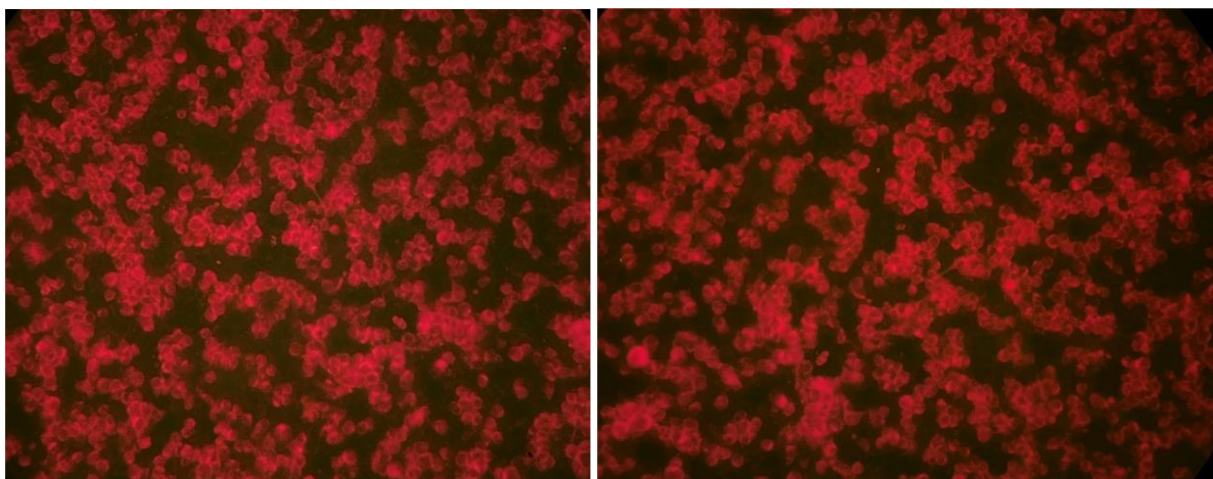
A titulação viral realizada para a amostra de estoque ($31,5 \times 10 \times 10^5$) foi de $3,1 \times 10^7$ PFU/mL, para o MIX da primeira infecção foi de $1,45 \times 10^6$ PFU/mL e para o MIX da segunda infecção foi de $1,55 \times 10^6$ PFU/mL. Devido o resultado negativo para a presença de vírus nas fêmeas não foi necessária a realização do cálculo de titulação viral, portanto a taxa de infecção, disseminação e de transmissão foi de 0%, consequente da ausência de amostras positivas.

Figura 5 – Lâmina anatômica do mosquito 11 – 2ª infecção



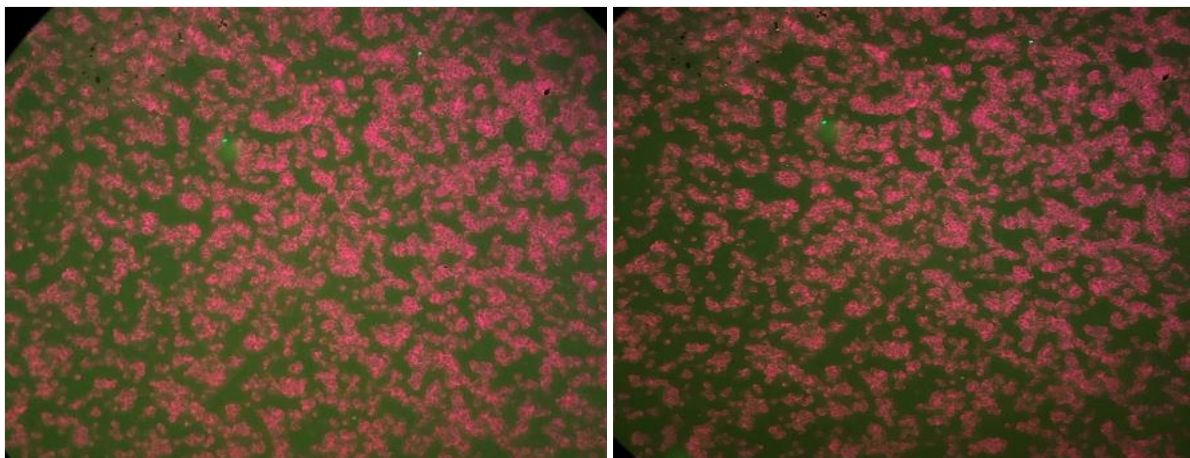
Descrição: duas regiões distintas da lâmina da cabeça do mosquito 11 da segunda infecção, 21 dias após a infecção (21º DPI) com resultado negativo para presença de vírus – células negativas são marcadas de vermelho pelo corante Azul de Evans. Imagens: Lúcia Aline Reis. Imagens na objetiva de 20X de magnificação

Figura 6 – Lâmina anatômica do mosquito 16 – 2ª infecção



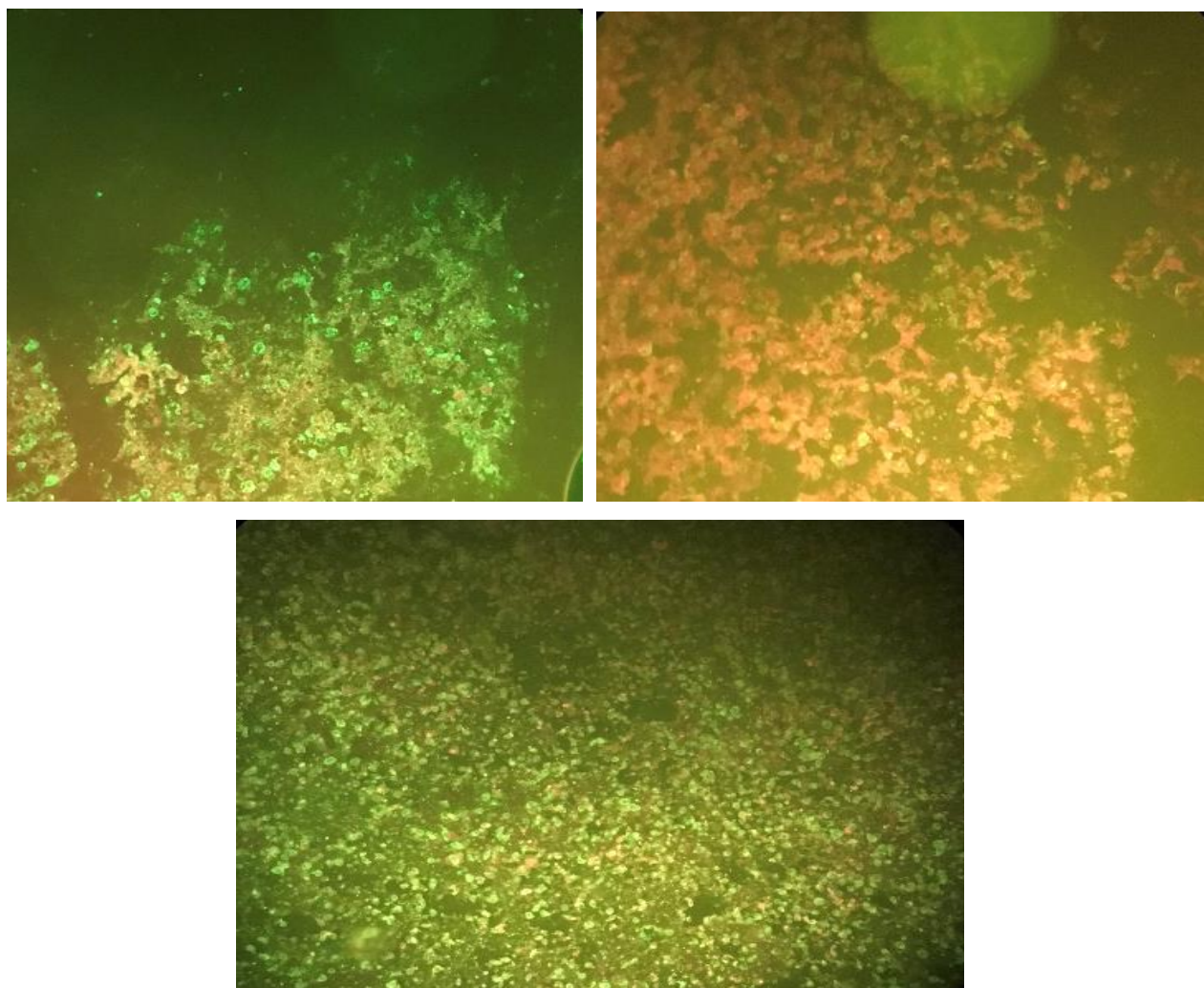
Descrição: duas regiões distintas da lâmina da cabeça do mosquito 16 da segunda infecção, 21 dias após a infecção (21º DPI) indicando a ausência de vírus. Imagens: Lúcia Aline Reis. Imagens na objetiva de 20X de magnificação

Figura 7 – Lâmina anatômica do mosquito 18 – 2ª infecção



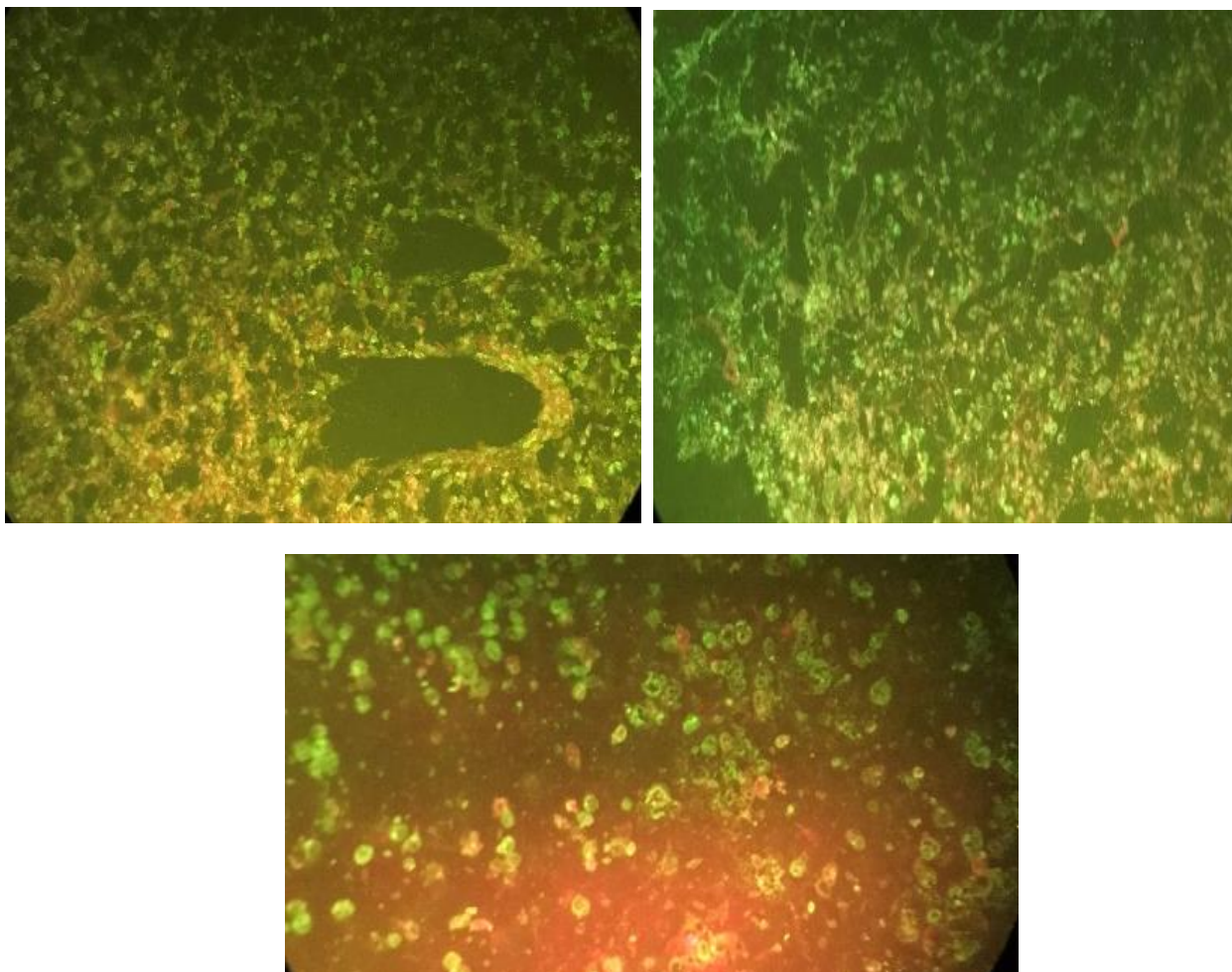
Descrição: duas regiões distintas da lâmina do corpo (tórax e abdômen) do mosquito 18 da segunda infecção, 21 dias após a infecção (21º DPI), com resultado negativo para presença de vírus. Imagens: Lúcia Aline Reis. Imagens na objetiva de 20X de magnificação.

Figura 8 – Resultado IFI para o MIX da 2ª infecção



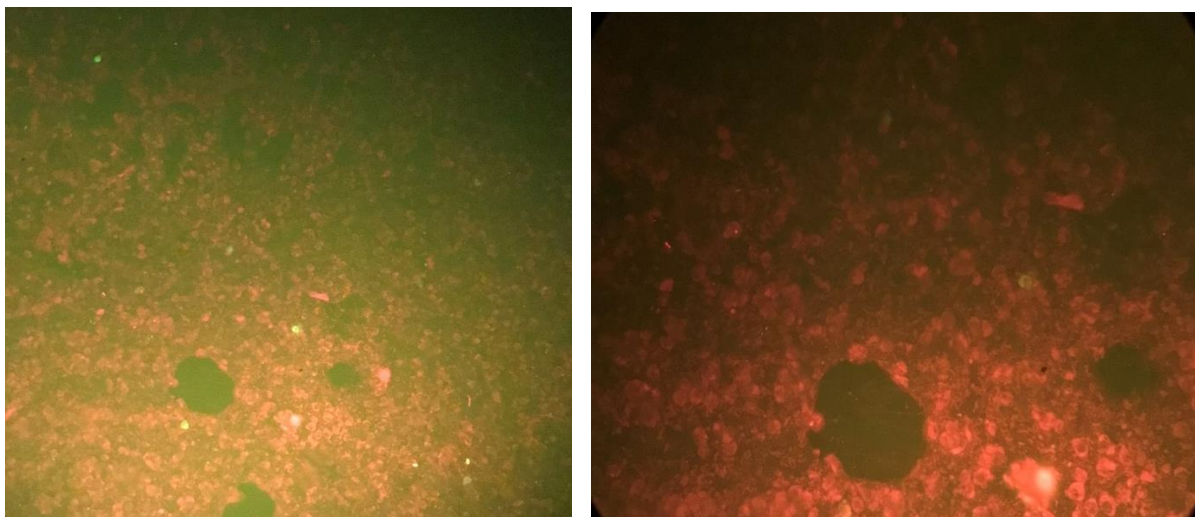
Descrição: diferentes regiões da lâmina do MIX da 2ª infecção na imunofluorescência indireta, indicando o resultado positivo, com 2 cruces (++), de acordo com o protocolo estabelecido por Weller & Coons (2016).
Imagens: Lúcia Aline Reis. Imagens na objetiva de 20X de magnificação.

Figura 9 – Resultado IFI para o estoque



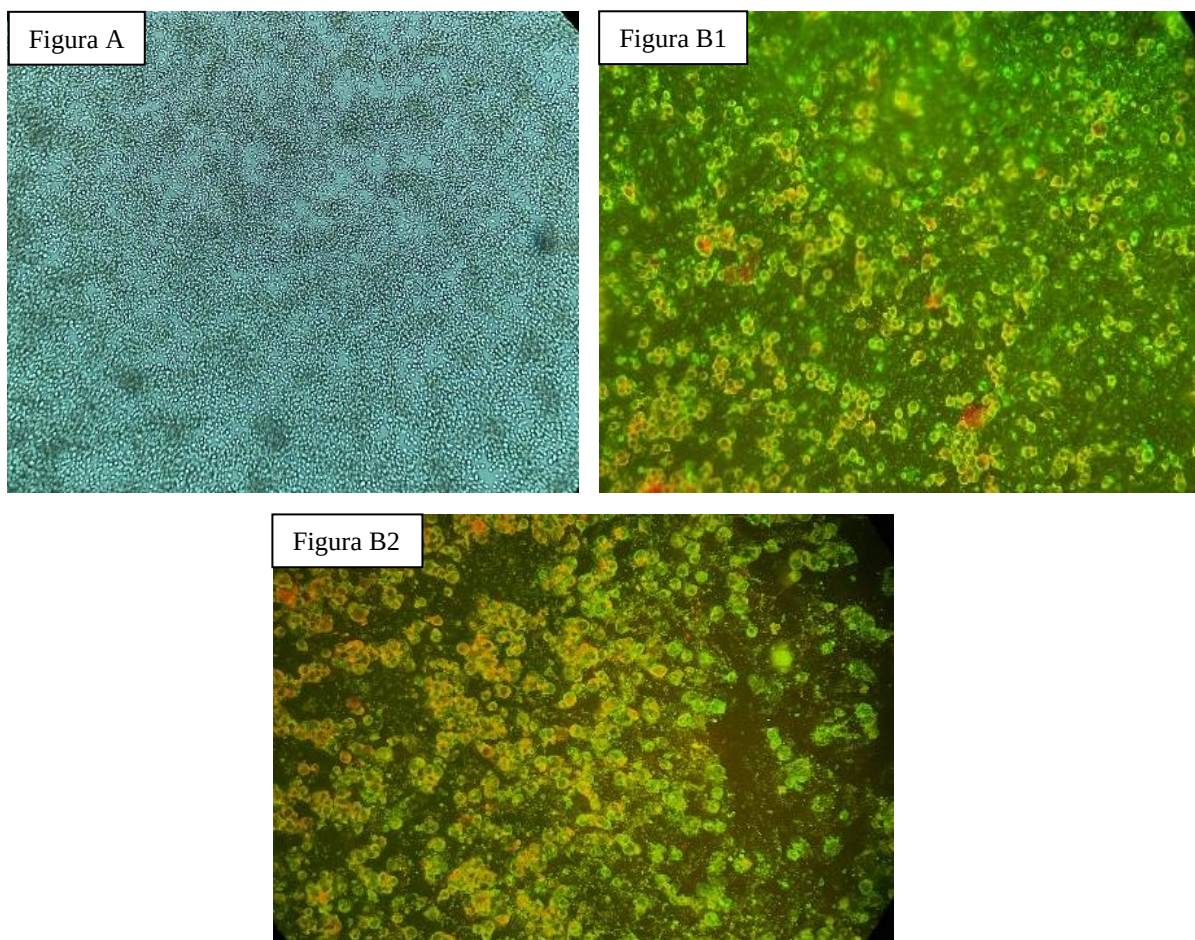
Descrição: três diferentes áreas da lâmina positiva do estoque viral com anticorpos policlonais do grupo B na imunofluorescência indireta, indicando o resultado de 3 cruces (+++), de acordo com o protocolo estabelecido por Weller & Coons (2016). Imagens: Lúcia Aline Reis. Imagens na objetiva de 20X de magnificação.

Figura 10 – Resultado IFI para o C+



Descrição: duas diferentes áreas da lâmina positiva do controle positivo contendo DENV1 na imunofluorescência indireta indicando o resultado de 1 cruz (+), de acordo com o protocolo estabelecido por Weller & Coons (2016).
Imagens: Lúcia Aline Reis. Imagens na objetiva de 20X de magnificação.

Figura 11 – Efeito citopático de células C6/36



Descrição: efeito citopático observado em microscópio invertido de 90% da monocamada de células C6/36 infectadas da primeira (Figura A) e segunda (Figura B1 e B2) infecção. Imagens: Lúcia Aline Reis. Imagens na objetiva de 20X de magnificação.

5 DISCUSSÃO

Zoonoses começaram a ser vistas como crise mundial a partir da década de 2010 (Filho et al., 2022), com o aumento de pesquisas associadas. Com isso, estudos de tendências zoonóticas passaram a observar a relação patógeno-vetor quando em situações de mudanças climáticas, fator que influencia tanto no nicho ecológico, quanto na resposta imunológica do vetor e a consequente distribuição e probabilidade de infecção do patógeno por outros seres vivos, incluindo os humanos.

Em uma abordagem sobre zoonoses e alterações climáticas Rupasinghe *et al.* (2022) cita riscos quanto ao aumento da transmissão de dengue para humanos, em aproximadamente 60 anos, somado a um aumento anual de malária, entre 2050 e 2080 e de surtos de influenza aviária.

Acrescido disso é fundamental destacar o aumento de mosquitos do complexo *Culex pipiens* próximo a fontes de água durante climas quentes e secos, que diminui a distância de contato entre vetor e ave e facilita a chance de multiplicação viral de doenças aviárias, que são transmitidas, principalmente, pelo mosquito *Culex quinquefasciatus*, a exemplo do arbovírus *Orthoflavivirus nilense* (WNV) e do vírus *Avipoxvirus* (*Poxviridae*). Essas doenças não apenas têm potencial de afetar os humanos, como também ameaçam a comunidade aviária por serem os principais hospedeiros desses vírus e, em ambientes isolados, como ilhas, podem ocasionar a extinção de espécies de aves locais (Harvey-Samuel *et al.*, 2021).

Com isso, como o *Culex* é um dos gêneros de mosquitos mais associados à transmissão de arbovírus (Fernandes, 2017) e as constantes alterações climáticas podem contribuir para a facilidade de infecção e transmissão de vírus, não é possível descartar a possibilidade de infecção e transmissibilidade do *Orthoflavivirus ilheusense* por *Culex quinquefasciatus*. Sua negatividade a infecção com o vírus pode ter sido influenciada pelas condições utilizadas para a realização da pesquisa, como a alimentação *in vitro*, sangue utilizado no MIX, tempo de exposição, entre outros.

Portanto, apesar dos resultados negativos, o mosquito não pode deixar de ser considerado como possível vetor do vírus.

Ressalta-se a necessidade de estudos com outras variáveis que influenciem na competência vetorial de um mosquito para transmissão de um arbovírus a exemplo de diferentes titulações virais, como citado por Degallier *et al* (2001), pois como demonstrado em estudo de competência vetorial de mosquitos do gênero *Culex* para Zika virus analisados por Viveiros-

Rosa (2020), a diferença de titulação e cepa utilizada é de fundamental importância para a capacidade do *Cx. quinquefasciatus* se infectar e transmitir um vírus.

Assim, para a titulação viral utilizada, os resultados negativos para a presença de vírus nas amostras de cabeça e corpo (tórax + abdômen), indicaram a refratariedade do *Cx. quinquefasciatus* para o vírus, ou seja, a infecção e disseminação do patógeno pelos tecidos foi barrada pelas barreiras de infecção do mosquito (Macleod & Dimopoulos, 2020).

Essa refratariedade do mosquito *Cx. quinquefasciatus* para os vírus da família *Flaviviridae* também é vista em pesquisas realizadas para infecção artificial com ZIKV (Elizondo-Quiroga, 2019; Dodson & Rasgon, 2017; Macleod & Dimopoulos, 2020) e DENV (Huang, Vergne & Gubler, 2019), além de refratariedade para vírus de outras famílias como o *Mayaro virus* (*Togaviridae*) (Pereira *et al.*, 2020). Apesar disso, pesquisas realizadas na mesma população de mosquitos do presente estudo analisaram a competência dos mosquitos para a transmissão de *Orthoflavivirus nilense*, demonstrando sua competência vetorial a transmissão e susceptibilidade ao arbovírus da família *Flaviviridae* (Reis *et al.*, 2023^b) e também, para outras famílias, a exemplo do *Oropouche virus* (OROV) – família *Orthobunyavirus*, mesmo que com baixo potencial, como demonstrado por McGregor, Connelly & Kenney (2021).

Portanto, com ausência de infecção e replicação do vírus no *Culex quinquefasciatus*, é necessária a realização de mais pesquisas relacionadas aos receptores celulares presentes nos mosquitos do gênero *Culex*, para vírus, em específico ao ILHV, pois para que uma infecção seja estabelecida no corpo de um mosquito, é necessário que o vírus primeiramente infecte as células do intestino médio e passe pela barreira do intestino médio, disseminando-se para outros órgãos, incluindo as glândulas salivares, responsáveis pela transmissão (Manning, 2018). Além disso, a liberação da saliva contendo o vírus em mosquitos, através da apoptose das células das glândulas salivares, ainda não é bem compreendida (Franz *et al.*, 2015), levantando questionamentos quanto a capacidade de transmissão viral por mosquitos.

Desse modo, é necessário que se façam mais pesquisas que estudem a resposta imunológica do mosquito ao vírus exposto e que estudem a sua capacidade de transmissão. A exposição a diferentes titulações virais ou diferentes formas de alimentação, como a infecção direta via hospedeiro infectado, de preferência ave, por ser um vírus originalmente aviário – para uma maior compreensão da sua competência vetorial.

Além disso, se faz necessária a realização de pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação do ILHV nas barreiras de infecção dos mosquitos, para melhor compreensão de seu potencial endêmico pois, apesar do mosquito *Culex quinquefasciatus* estar

relacionado a transmissão de vírus causadores de doenças encefálicas (Gorris *et al.*, 2021) e apresentar predisposição a transmissão do ILHV, de acordo com o agrupamento, em análises filogenéticas, de arbovírus capazes de serem transmitidos por mosquitos do gênero *Culex* (Rathore & St. John, 2020), apresentou exceção quando exposto ao ILHV.

6 CONCLUSÃO

Para as condições impostas à pesquisa, na metodologia aplicada, o *Culex quinquefasciatus* não demonstrou ser um vetor susceptível à infecção e transmissão do *Orthoflavivirus ilheusense*, devido o resultado negativo para presença de vírus no organismo, exposto no teste de imunofluorescência indireta. Por isso, não foi necessária a realização de cálculo de titulação viral na cabeça, corpo e saliva dos mosquitos pois, para a titulação utilizada, a espécie *Culex quinquefasciatus* não se infectou, ou seja, não apresentou vírus. Além disso, o mosquito, por não apresentar vírus em suas partes anatômicas, apresentou taxa de 0% para infecção, disseminação e transmissão de *Orthoflavivirus ilheusense*. Portanto, não apresentou capacidade vetorial, para a quantidade de vírus ingerida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. L. *et al.* Interfaces à transmissão e spillover do coronavírus entre florestas e cidades. **Estudos Avançados**, v. 34, n. 99, p. 191–208, ago. 2020.

ALENCAR, A.; SILVESTRINI, R; JARLENE GOMES, J; SAVIAN, G. Amazônia em chamas: o novo e alarmante patamar do desmatamento na Amazônia. **Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia**. Nota Técnica, n. 9, 2022.

ALEVI, K. C. C.; DA ROSA, J. A.; DE OLIVEIRA, J. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS TRANSMITIDAS POR VETORES BIOLÓGICOS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL: PASSADO, PRESENTE E FUTURO. **Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental** 2. Rio Branco, Acre: Strictus Sensu, 2019.

ALLEN, T.; MURRAY, K. A.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; MORSE, S. S.; RONDININI, C.; DI MARCO, M.; BREIT, N.; OLIVAL, K. J. & DASZAK, P. Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. **Nature Communications** 8: 1124, 2017.

ARAÚJO, P. A. *et al.* Investigation about the Occurrence of Transmission Cycles of Arbovirus in the Tropical Forest, Amazon Region. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 774, 22 ago. 2019.

ASSIS, S. N. S; LIMA, R. A.; CAMPOS, M. C. C. IMPACTO DO DESMATAMENTO SOBRE A INCIDÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 11, n. 2, p. 279-297, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde de A a Z. Ebola**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/e/ebola>. Acesso em: 26 mar. 2023.

CASSEB, A. D. R. *et al.* ARBOVÍRUS: IMPORTANTE ZOONOSE NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

CHOUIN-CARNEIRO, T.; VEGA-RUA, A.; VAZEILLE, M.; YEBAKIMA, A.; GIROD, R.; GOINDIN, D.; DUPONT-ROUZEYROL, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004543, 2016.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5.

COPERTINO, M.; PIEDADE, M. T. F.; VIEIRA, I. C. G.; BUSTAMANTE, M. Desmatamento, fogo e clima estão intimamente conectados na Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 71, n. 4, p. 04-05, 2019.

CRUZ, A. C. R & VASCONCELOS, P. F. C. ARBOVÍRUS NO BRASIL. **Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.45-46, 2008.

DA COSTA, V. G.; SAIVISH, M. V.; LINO, N. A. B.; BITTAR, C.; DE FREITAS CALMON, M.; NOGUEIRA, M. L.; RAHAL, P. Clinical Landscape and Rate of Exposure to Ilheus Virus: Insights from Systematic Review and Meta-Analysis. **Viruses** **2023**, v. 15, n. 1, p. 92, 2022.

DA SILVA, N. I. O. **DINÂMICA DE CIRCULAÇÃO DE VÍRUS ZOONÓTICOS EMERGENTES: investigação de arbovírus em primatas não humanos no Brasil**. 2021. 227 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, BH, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/37878>. Acesso em: 09 nov. 2022.

DE CASTRO, M. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected Aedes albopictus from Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, [S.L.], v. 99, n. 8, p. 809-814, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO).

DE JESUS SANTOS, A. C.; SANTANA SANTOS, K.; JESUS, T. S. de. **Os impactos ambientais e as mudanças climáticas: uma análise das consequências a saúde humana**. 28 f. Tese (Graduação em licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro Universitário AGES: Paripiranga, BA, 2023. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/33259>. Acesso em: 03 out. 2023.

DE LIMA, L. P.; DA SILVA, E. M.; DE SOUZA, A. S. B. Aedes aegypti e doenças relacionadas: Uma revisão histórica e biológica/Aedes aegypti and related diseases: A historical and biological review. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3429–3448, jul. 2021.

DE GUSMÃO, C. M. G.; PATRIOTA, A. C. de L. S.; DE LIMA CARVALHO, I. AEDES AEGYPTI E ARBOVIROSES NO BRASIL: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA FOCADA NO ZIKA VÍRUS. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, ISSN: 2236-1103, p. 23-23, 2019.

DEGALLIER, N. *et al.* Estudos experimentais sobre competência vetorial de Aedes aegypti e Aedes albopictus para os vírus da dengue e febre amarela. **Inf. Epidemiol. Sus**, Brasília, v.10, supl.1, p.9-11, 2001.

DODSON B. L.; RASGON J. L. Vector competence of Anopheles and Culex mosquitoes for Zika virus. **PeerJ** 5:e3096, 2017. DOI <https://doi.org/10.7717/peerj.3096>. Disponível em: <https://peerj.com/articles/3096/>. Acesso em: 22 nov. 2023.

DOS SANTOS, I. V. R.; SOUSA, C. S.; AGUILAR-ALEIXO, L. Perda de hábitat e o surgimento de epidemias: importância da socialização do conceito de Saúde Única na conscientização ambiental. **Textura**, v. 15, n. 2, p. 35-45, 2021.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Some Problems of Animal Virology as Studied by The Plaque Technique. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 18, p. 273-279, 1 jan. 1953.

ELIZONDO-QUIROGA, D. *et al.* Vector competence of Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus from the metropolitan area of Guadalajara, Jalisco, Mexico for Zika virus. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 16955, 2019.

ELLWANGER, J. H. *et al.* Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 1, p. e20191375, 2020.

FERNANDES, R. S. **Competência vetorial de populações brasileiras de Culex quinquefasciatus e Aedes aegypti frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil**. 93f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, RJ, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/20707>. Acesso: 27 ago. 2023.

FILHO, W. L.; TERNOVA, L.; PARASNIS, S. A.; KOVALEVA, M.; NAGY, G. J. Climate Change and Zoonoses: A Review of Concepts, Definitions, and Bibliometrics. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, p. 893, 2022.

FOUQUE, F. & REEDER, J. C. Impact of past and on-going changes on climate and weather on vector-borne diseases transmission: a look at the evidence. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 8, n. 1, p. 51, 2019.

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

GARCIA-REJON, J. E., BLITVICH, B. J., FARFAN-ALE, J. A., LOROÑO-PINO, M. A., CHI CHIM, W. A., FLORES-FLORES, L. F., ROSADO-PAREDES, E., BAAK-BAAK, C.,

PEREZ-MUTUL, J., SUAREZ-SOLIS, V., FERNANDEZ-SALAS, I., & BEATY, B. J. Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. **Journal of insect science**, 10, 32. 2010.

GIL, M. F. *et al.* *Culex quinquefasciatus* larvae development arrested when fed on *Neochloris aquatica*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0009988, 2021.

GORRIS, M. E.; BARTLOW, A. W.; TEMPLE, S. D. *et al.* Updated distribution maps of predominant *Culex* mosquitoes across the Americas. **Parasites Vectors** 14, n. 547. 2021.

GUBLER, D. J. *et al.* Mosquito Cell Cultures and Specific Monoclonal Antibodies in Surveillance for Dengue Viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1 jan. 1984.

HARVEY-SAMUEL, T.; ANT, T.; SUTTON, J. *et al.* *Culex quinquefasciatus*: status as a threat to island avifauna and options for genetic control. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2021.

HENRIQUES, F.; QUARESMA, A. S.; FUZII, T.; SILVA, V. P. da; AARÃO, L. S.; AZEVEDO, do S. da S.; CASSEB, M. M.; VASCONCELOS, F. da C. **Infecção persistente pelo vírus Ilheus em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*)**. Revista Pan-Amazônica de Saúde, [S. l.], v. 7, n. Esp, p. 10, 2020. DOI: 10.5123/S2176-62232016000500021. Disponível em: <https://ojs.iec.gov.br/index.php/rpas/article/view/673>. Acesso em: 26 dez. 2023.

HUANG, G.; VERGNE, E.; GUBLER, D. J. Failure of dengue viruses to replicate in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 29, n. 6, p. 911-914, 1992.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Brasil em síntese**. Disponível em: <https://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio.html>. Acesso em: 20 set. 2023.

ICTV – **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>. Acesso em: 27 nov. 2023.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. **Journal of General Virology**, v. 40, n. 3, p. 531–544, 1 set. 1978.

JOHNSON B. W.; CRUZ C., FELICES V.; ESPINOZA W. R.; MANOCK S. R.; GUEVARA C.; OLSON J. G.; KOCHER T. J. Ilheus virus isolate from a human, Ecuador. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 6, p. 956, 2007.

JUNIOR, N. L. S.; MATION, L. F.; SAKOWSKI, P. A. M. **Impacto do desmatamento sobre a incidência de doenças na Amazônia**. Texto para discussão 2142. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília: Ipea, p. 38, 2015.

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.

LIMA, T. F. da S.; COSTA, G. F.; SILVA, S. M.; VIANA, G. da S. F.; BARROS, B. T. D.; MENDES, L. O.; CASTRO, H. C. de O.; OLIVEIRA, V. M. L. P.; MARCOS, W.; MELO, M. K. A. Climate variables and their relationship whit diseases of infectious origin: An integrative review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e7910212126, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12126. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12126>. Acesso em: 30 nov. 2023.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; DA SILVA, I. N. B.; GURGEL, E. S. C. Impacto do desmatamento e queimas na biodiversidade invisível da Amazônia. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente – RAMA**, v. 16, n. 1, 2023.

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.

MACLEOD, H. J.; DIMOPOULOS, G. Detailed analyses of Zika virus tropism in *Culex quinquefasciatus* reveal systemic refractoriness. **Mbio**, v. 11, n. 4, p. 10.1128/mbio. 01765-20, 2020.

MAIN, B. J. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex tarsalis*, and *Culex quinquefasciatus* from California for Zika virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006524, 2018.

MANNING J. E.; MORENS D. M.; KAMHAWI S.; VALENZUELA J. G.; MEMOLI M. Mosquito Saliva: The Hope for a Universal Arbovirus Vaccine?. **J Infect Dis**. 2018 Jun 5;218(1):7-15. Disponível em:10.1093/infdis/jiy179. Acesso em: 28 ago. 2023.

MATTINGLY, P. F. The systematics of the *Culex pipiens* complex. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 37, n. 2, p. 257, 1967.

MCGREGOR B.L., CONNELLY C. R. & KENNEY J.L. Infection, Dissemination, and Transmission Potential of North American *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis*, and *Culicoides sonorensis* for Oropouche Virus. **Viruses**, 13, n. 2, p. 226. 2021.

MILHIM, B. H. G. A.; ESTOFOLETE, C. F.; ROCHA, L. C. D.; LISO, E.; BRIENZE, V. M. S.; VASILAKIS, N.; TERZIAN, A. C. B. & NOGUEIRA, M. L. Fatal Outcome of Ilheus Virus in the Cerebrospinal Fluid of a Patient Diagnosed with Encephalitis. **Viruses**, 12(9), 957. 2020.

NAVA, A. *et al.* The Impact of Global Environmental Changes on Infectious Disease Emergence with a Focus on Risks for Brazil. **ILAR Journal**, v. 58, n. 3, p. 393–400, dez. 2017.

NOGUEIRA, J. V. D; DA SILVA, C. M. CONHECENDO A ORIGEM DO SARS-COV-2 (COVID 19). **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, Três Lagoas, v. 11, n. 2, p. 115-124, 2020.

NUÑEZ, A. I. *et al.* Evidence of Zika virus horizontal and vertical transmission in *Aedes albopictus* from Spain but not infectious virus in saliva of the progeny. **Emerging Microbes & Infections**, Bellaterra, v. 9, n. 1, p. 2236-2244, 1 jan. 2020.

PEREIRA, T. N. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007518, 2020.

PLANTE, J. A.; PLANTE, K. S.; POPOV, V. L.; SHINDE, D. P.; WIDEN, S. G.; BUENEMANN, M.; NOGUEIRA, M. L.; VASILAKIS, N. Morphologic and Genetic Characterization of Ilheus Virus, a Potential Emergent Flavivirus in the Americas. **Viruses** 2023, 15, 195.

PLOWRIGHT, R. K. *et al.* Pathways to zoonotic spillover. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 502–510, ago. 2017.

POH, K. C. *et al.* The influence of weather and weather variability on mosquito abundance and infection with West Nile virus in Harris County, Texas, USA. **The Science of the total environment**, v. 675, p.260-272, 2019.

QIN, X. *et al.* A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 18, p. 6744-6749, 2014.

RAMOS, C. J. R. *et al.* Fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae) em ambientes intra e peridomiciliar na cidade de Lages, SC. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 13, n. 3, p. 387-400, 2019.

RATHORE, A. P. S. & ST JOHN, A. L. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. **Frontiers in immunology**, vol. 11, p. 334. 2020.

REIS, L. A. M.; NETO, J. P. N. *Ilheus virus*: Revisão sobre um Arbovirus Emergente/*Ilheus virus*: emerging arbovirus review. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.4, p. 37675-37695, abr. 2021.

^aREIS, L. A. M.; PAMPOLHA, A. B. O.; NASCIMENTO, B. L. S. D.; DIAS, D. D.; ARAÚJO, P. A. D. S.; SILVA, F. S. D.; SILVA, L. H. D. S. E.; REIS, H. C. F.; SILVA, E. V. P. D.; NUNES NETO, J. P. Genus *Culex* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) as an Important Potential Arbovirus Vector in Brazil: An Integrative Review. **Life** **2023**, 13, 2179.

^bREIS, L. A. M.; SILVA, E. V. P. DA; DIAS, D. D.; FREITAS, M. N. O.; CALDEIRA, R. D.; ARAÚJO, P. A. DA S.; SILVA, F. S. DA; ROSA JUNIOR, J. W.; BRANDÃO, R. C. F.; NASCIMENTO, B. L. S. DO; *et al.* Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* from Brazil for West Nile Virus. **Tropical Medicine and Infectious Disease** 8, n. 4, p. 217. 2023.

RIOS, F. G. F. *et al.* Predominância de *Culex quinquefasciatus* durante a vigilância integrada de mosquitos em uma área urbana da Amazônia brasileira. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

RUPASINGHE, R.; CHOMEL, B. B.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, B. CLIMATE CHANGE AND ZONOSSES: A REVIEW OF THE CURRENT STATUS, KNOWLEDGE GAPS, AND FUTURE TRENDS. **Acta Tropica**, v. 226, 2022.

SAIVISH, M. V.; PACCA, C. C.; DA COSTA, V. G.; DE LIMA MENEZES, G.; DA SILVA, R. A.; NEBO, L.; DA SILVA, G. C. D.; DE AGUIAR MILHIM, B. H. G.; DA SILVA TEIXEIRA, I.; HENRIQUE, T. *et al.* Caffeic Acid Has Antiviral Activity against Ilhéus Virus In Vitro. **Viruses** 2023, 15, 494.

SANTOS, D.; SALOMÃO, R.; VERÍSSIMO, A. **Fatos da Amazônia 2021**. Amazônia 2030, 2021. *E-book*. 86p. DOI <http://doi.org/10.59346/report.amazonia2030.202103.ed3>. Disponível em:<https://amazonia2030.org.br/fatos-da-amazonia-2021/>. Acesso em: 20 set. 2023.

SILVA, C. P.; LEMOS, F. J. A.; SILVA, J. R. Digestão em Insetos. In: SILVA NETO, M. A. C (Rio de Janeiro). Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do

Rio de Janeiro, 2012. Cap. 5. P. 1-32. Disponível em: http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/images/documentos/biblioteca/Capitulo_5_Digestao_em_Insetos.pdf. Acesso em: 10 jun. 2021.

SILVA, R. B. D. *et al.* INFLUENCIA DA VARIABILIDADE CLIMÁTICA NA DENSIDADE DE MOSQUITOS VETORES NO LESTE DA AMAZÔNIA. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 26, mar. 2021.

TESH, R. B. A Method for the Isolation and Identification of Dengue Viruses, using Mosquito Cell Cultures. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 28, n. 6, p. 1053-1059, nov. 1979.

VALLADA, E. P. **O Complexo *Culex pipiens* e sua importância na região neotropical**. 1972. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

VAN DEN HURK, A. F.; HALL-MENDELIN, S.; JANSEN, C. C.; HIGGS, S. Zika virus and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes: a tenuous link. **Lancet Infect Dis**. 2017 Oct;17(10):1014-1016. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30518-2. PMID: 28948917. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28948917/>. Acesso em 17 nov. 2023.

VIEIRA, C. J. S. P. *et al.* Detection of Ilheus virus in mosquitoes from southeast Amazon, Brazil. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 113, n. 7, p.424-427, 2019.

VIGLIETTA, M. *et al.* Vector Specificity of Arbovirus Transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 773211, dez. 2021.

VIVEIROS-ROSA S. G.; REGIS E. G. & SANTOS W. C. Vector competence of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Zika vírus transmission: an integrative review. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. e7, 2020.

VOGELS, C. B. F. *et al.* Vector competence of northern European *Culex pipiens* biotypes and hybrids for *West Nile virus* is differentially affected by temperature. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p.1-7, 7 jul. 2016.

WELLER, T. H. & COONS, A. H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 86, n. 4, p.789-794. 1954.

WILKINSON, D. A. *et al.* Habitat fragmentation, biodiversity loss and the risk of novel infectious disease emergence. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 15, n. 149, p. 20180403, dez. 2018.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA

CEUA



CERTIFICADO nº 03/2022

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo sobre o potencial de co-infecção e superinfecção de *Ilheus vírus* e *West Nile vírus* em *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (Diptera: Culicidae) da Região Amazônica", registro CEUA nº 28/2021, sob a responsabilidade de Joaquim Nunes Pinto Neto, está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas CEUA/IEC, observando que o referido projeto utilizará colônia de mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* pertencentes ao acervo do Laboratório de Entomologia Médica da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC).

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 03 de fevereiro de 2022.

Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
Secretária da CEUA/IEC

Gilmara Abreu da Silva
Coordenadora da CEUA/IEC