



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CLAUDIA GABRIELLE SANTOS DE ABREU**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REPRODUTIVA, BUSCA POR FONTE  
SANGUÍNEA E TRANSMISSÃO VERTICAL EM *Culex quinquefasciatus*, APÓS  
EXPOSIÇÃO AO VÍRUS ZIKA**

**RECIFE**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CLAUDIA GABRIELLE SANTOS DE ABREU**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REPRODUTIVA, BUSCA POR FONTE  
SANGUÍNEA E TRANSMISSÃO VERTICAL EM *Culex quinquefasciatus*, APÓS  
EXPOSIÇÃO AO VÍRUS ZIKA**

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dra. Mônica Crespo  
Coorientador(a): Dra. Elisama Helvecio

**RECIFE**

**2024**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Abreu, Claudia Gabrielle Santos de .

Avaliação da capacidade reprodutiva, busca por fonte sanguínea e transmissão vertical em *Culex quinquefasciatus*, após exposição ao vírus Zika / Claudia Gabrielle Santos de Abreu. - Recife, 2024.

57 p. : il., tab.

Orientador(a): Mônica Maria Crespo Costa

Orientador(a): Elisama Helvecio

Coorientador(a): Elisama Helvecio

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

1. culicidae. 2. fecundidade. 3. fertilidade. 4. transmissão transovariana. 5. infecção viral. I. Costa, Mônica Maria Crespo. (Orientação). II. Helvecio, Elisama . (Orientação). III. Helvecio, Elisama. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

CLAUDIA GABRIELLE SANTOS DE ABREU

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REPRODUTIVA, BUSCA POR FONTE  
SANGUÍNEA E TRANSMISSÃO VERTICAL EM *Culex quinquefasciatus*, APÓS  
EXPOSIÇÃO AO VÍRUS ZIKA.**

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Mônica Maria Crespo Costa (Orientador)  
Instituto Aggeu Magalhães/FioCruz Pernambuco

---

Dr. Gabriel Bezerra Faierstein (Examinador Externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/FioCruz Pernambuco

---

Msc. Luisa Maria Inácio da Silva (Examinador Externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/FioCruz Pernambuco

---

Dra. Heverly Suzany Gouveia de Menezes (Suplente)  
Instituto Aggeu Magalhães/FioCruz Pernambuco

*Aos meus amigos e amigas, da igreja, do teatro, colegas da faculdade, dedico o meu trabalho de conclusão de curso por todo suporte, apoio, amizade, compreensão em momentos difíceis e por todas as vezes que eu achava não ser possível finalizar esse ciclo e fui acolhida por vocês.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, que sempre foi e sempre será meu escudo e fortaleza, socorro bem presente na hora da angústia, sem Ele eu não conseguiria.

À minha família, em especial, à minha mãe Claudete Lopes, que com sua força e garra me ensinou a lutar pelo que quero, por todo amor, apoio e principalmente pela alimentação preparada com carinho para eu levar para a faculdade, também ao meu pai, José Alves de Abreu (*in memoriam*), que me deu a vida, e sempre me disse para eu seguir os meus sonhos, ao meu padrasto, Luis Pessoa, o qual seus conselhos foram essenciais em diversos momentos dessa caminhada e também a minha irmã Clênia Cristina, que em vários momentos esteve presente e me ajudou, me ouviu e acolheu minhas lágrimas.

Ao meu noivo, Manoel Marinho, que apesar de não estarmos juntos desde o começo deste trabalho, chegou em um momento crucial e esteve comigo em momentos difíceis, o qual nunca esquecerei de tamanho cuidado, carinho e amor.

Aos meus amigos e amigas da Igreja da família, da Rede Videira, da Supervisão e Ministério Incensários, por serem alívio em dias difíceis, por todas orações para que o experimento desse certo, à minha líder e amiga, Mayrla Barbosa por todas as orações, acolhimento e incontáveis horas escutando meus áudios, à todas as líderes da Supervisão Graça, principalmente pelos momentos de comunhão e de partilha, à cada uma das minhas queridas lideradas e amigas da Rede Videira, por todo suporte, amizade, e compreensão em períodos de ausência e aos queridos líderes e amigos, em especial à Susani Cavalcanti, bem como à todos os membros do Ministério Incensários por toda parceria, apoio e compreensão nessa trajetória.

Às minhas amigas da graduação, Juliana Paes, Rayanne Barbosa e Laudiceia Luna, que ao passarmos por esses anos juntas, dividimos momentos de alegrias e tristezas, trabalhos e provas e entendemos que a graduação vai muito além da universidade, agradeço o suporte, orações e pelos momentos nos quais a nossa união foi essencial.

Aos meus amigos, em especial à Aldrey Ramos, Briany Barbosa e Vinícius De Moraes, por me ensinarem sobre a verdadeira amizade, por todos os momentos de comunhão e descontração que ajudaram a manter a saúde mental e me equilibrar entre a rotina de graduação, estágio e TCC. Agradeço ainda por toda compreensão durante períodos ausentes, que foram necessários diversas vezes para finalização deste trabalho.

Aos meus amigos do teatro, Adriano Portela, Camylla Herculano, Laerte Augusto, Madu Melo e Marina Amorim, que por muitas vezes me ouviram e aconselharam durante a trajetória desse trabalho, sendo essenciais em momentos que achei que não chegaria até a conclusão, também agradeço à minha querida turma do sábado pela manhã, e a todos os amigos e colegas não mencionados aqui mas que compõem a Cobogó das Artes e que contribuíram para as melhores risadas e momentos únicos o qual tornaram os dias mais leves durante esses anos.

À orientadora, Dra. Mônica Crespo, pela orientação, direcionamentos, confiança, auxílio nos trabalhos muitas vezes laboriosos no infectório, todos os infinitos conhecimentos que me

foram ensinados e essenciais para a finalização deste trabalho científico, agradeço ainda por todo acolhimento e empatia para além da pesquisa, o qual para mim, como ser humano e não apenas como pesquisadora, foram cruciais para a continuidade deste trabalho.

À coorientadora, Dra. Elisama Helvecio, por toda orientação na parte molecular, laboratorial e escrita deste trabalho, principalmente por todas as horas de disponibilidade, ensinamentos, treinamentos presenciais e até online, pelas horas incontáveis de bancada, por todas as PCR's e extrações que fizemos juntas, por inúmeras conversas e conselhos durante o caminho que me fizeram crescer como profissional e cientista.

Aos pesquisadores doutores, Constância Ayres, Larissa Krokovsky, Duschinka Guedes, Marcelo Paiva, Ana Paula de Araújo que também contribuíram de forma crucial para a realização deste trabalho, desde auxílio em ensaios antes de apresentações, fornecimento de material para os experimentos e correção de resumos, agradeço pelas incontáveis e valiosas contribuições.

Ao Dr. George Diniz, por sua importante contribuição e auxílio na parte estatística para a organização dos resultados desse estudo.

Ao colaborador e amigo, Rafael Alves, por suas contribuições no infectório e insetário durante longas horas, pelos momentos de descontração que tornaram os dias mais agradáveis. Agradeço ainda às minhas amigas também pesquisadoras, feitas no laboratório, Maria Eduarda, Maria Julia Couto, que foram essenciais em momentos em que precisei de ajuda no laboratório, por cada auxílio no infectório e nos períodos de bancada

Ao pesquisador Derciliano Cruz por todo material cedidos e emprestados durante a realização desse trabalho e pelas tardes com momentos de descontração, em que tornaram a rotina cansativa mais agradável e a colaboradora e amiga Elisângela Dias por todas as contribuições científicas e pessoais à minha vida, por todas as caronas e conversas que agregaram em minha vida de forma significativa tanto profissional quanto pessoal.

Às colaboradoras e técnicas Maria da Conceição da Silva, Andréa das Neves Souza e Rosineide Barros pelas contribuições e pelos treinamentos no laboratório e no insetário, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À querida amiga, Eliane, por suas contribuições para a manutenção e limpeza das instalações do departamento que foram importantes para o andamento dessa pesquisa, bem como, pelas inúmeras conversas e conselhos que levarei para a minha vida.

A todos que compõem o Departamento de Entomologia da FIOCRUZ Pernambuco, pelo aprendizado e por todas as trocas, agradeço também ao Instituto Aggeu Magalhães, todo suporte físico e estrutural disponibilizado.

À Banca Examinadora deste trabalho, por todas as relevantes contribuições.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) o qual financiou este projeto.

***“As investigações científicas revelam  
novas maneiras com as quais Deus  
trabalha e nos trazem revelações mais  
profundas do totalmente desconhecido”  
Maria Mitchell***

## RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus que representa um grave problema de saúde pública, pois sua infecção em humanos pode desencadear sérias complicações neurológicas, como Síndrome de Guillain-Barré (SGB), manifestação rara, e microcefalia, condição diagnosticada em recém-nascidos no Brasil e associada à infecção materna. Espécies do gênero *Aedes* são as principais incriminadas como vetoras, entretanto, *Culex quinquefasciatus*, espécie predominante nas Américas, é apontada como vetor potencial desse arbovírus. Assim, este trabalho se propôs a caracterizar a capacidade reprodutiva, incluindo fecundidade e fertilidade, bem como a busca por fonte sanguínea e transmissão vertical de *Cx. quinquefasciatus*, colônia de laboratório (CqSLab), após exposição ao ZIKV, em fêmeas expostas e em seus descendentes. Os ensaios de exposição oral ao ZIKV foram realizados em sistemas de alimentação artificial, com sangue de coelho desfibrinado. A infecção foi verificada através de RT-qPCR. A fecundidade e fertilidade observadas entre as fêmeas da geração parental e entre as suas descendentes não foram alteradas pela exposição ao ZIKV. O número médio de ovos na parental foi de 87,88 ovos para o grupo não exposto ao ZIKV (NE); 68,00 para o grupo exposto, não infectado (ENI); 80,21 para o grupo exposto infectado (EI) e 75,90 para o grupo exposto disseminado (ED). A fertilidade nos mesmos grupos foi de 67,69% no NE; 64,70% no ENI; 75,38% no EI e 79,80% no ED. Entre as fêmeas descendentes, a fecundidade e fertilidade foram de 117,87 e 79,58% no grupo controle (não exposto ao ZIKV - C); e 127,46 e 78,66%, no grupo teste (exposto ao ZIKV-T), respectivamente. Na geração F1, foi observada alteração significativa, com relação ao percentual de fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo (98,67% no grupo C e 68% no T). A taxa de transmissão vertical foi de 20,95%, o que corresponde ao percentual de *pools* positivos entre os avaliados. Entre esses, 64,52% eram fêmeas e 35,48% eram machos. Os achados deste trabalho contribuem para uma melhor compreensão sobre a interação vírus-vetor, sobretudo por agregar informações sobre a espécie *Cx. quinquefasciatus*, na perspectiva de esclarecer a transmissão local do ZIKV.

**Palavras-chave:** Culicidae; Fecundidade; Fertilidade; Transmissão transovariana; Infecção viral.

## ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that represents a serious public health problem, as its infection in humans can trigger serious neurological complications, such as Guillain-Barré Syndrome (GBS), a rare manifestation, and microcephaly, a condition diagnosed in recently born in Brazil and associated with maternal infection. Species of the genus *Aedes* are the main ones incriminated as vectors, however, *Culex quinquefasciatus*, a predominant species in the Americas, is identified as a potential vector of this arbovirus. Thus, this work aimed to characterize the reproductive capacity, including fecundity and fertility, as well as the search for a blood source and vertical transmission of *Cx. quinquefasciatus*, laboratory colony (CqSLab), after exposure to ZIKV, in exposed females and their descendants. Oral exposure tests to ZIKV were carried out in artificial feeding systems, with defibrinated rabbit blood. Infection was verified using RT-qPCR. The fecundity and fertility observed among females of the parental generation and among their descendants were not altered by exposure to ZIKV. The average number of eggs in the parental was 87.88 eggs for the group not exposed to ZIKV (NE); 68.00 for the exposed, non-infected group (ENI); 80.21 for the infected exposed group (EI) and 75.90 for the disseminated exposed group (ED). Fertility in the same groups was 67.69% in NE; 64.70% in ENI; 75.38% in EI and 79.80% in ED. Among female offspring, fecundity and fertility were 117.87 and 79.58% in the control group (not exposed to ZIKV - C); and 127.46 and 78.66%, in the test group (exposed to ZIKV-T), respectively. In the F1 generation, a significant change was observed in relation to the percentage of females that underwent the blood meal (98.67% in group C and 68% in T). The vertical transmission rate was 20.95%, which corresponds to the percentage of positive pools among those evaluated. Among these, 64.52% were females and 35.48% were males. The findings of this work contribute to a better understanding of the virus-vector interaction, especially by adding information about the species *Cx. quinquefasciatus*, with a view to clarifying the local transmission of ZIKV.

**Keywords:** Culicidae; Fecundity; Fertility; Transovarian transmission; Viral infection.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição anual dos casos suspeitos de síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika notificados no Brasil entre 2015 e a SE 31/2023.....**20**
- Figura 2** - Fêmea de *Culex quinquefasciatus* ovipositando em superfície aquática.....**25**
- Figura 3** - Infecção oral – Fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, colônia CqSLab, se alimentando com sangue de coelho desfibrinado, contendo cultivo de células com vírus Zika, em alimentador artificial., constituído de placa de Petri, revestida com membranas tipo parafilm M (Bemis).....**33**
- Figura 4** - Potes de postura individuais com ovos (jangadas) de fêmeas *Culex quinquefasciatus*, colônia CqSLab, expostas ao vírus Zika.....**36**
- Figura 5** – Ovos (jangada) de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, colônia CqSLab, expostas ao vírus Zika.....**37**
- Figura 6** - Alimentação de fêmeas da geração F1 de *Culex quinquefasciatus* (descendentes da geração exposta ao vírus Zika), com sangue de coelho desfibrinado, em um pequeno alimentador artificial, constituído por pequena placa em acrílico, revestida com parafilme e bolsa térmica.....**37**
- Figura 7** - Cubas para desenvolvimento larval, individualizadas para os descendentes (geração F1) de cada fêmea parental de *Culex quinquefasciatus*, previamente exposta ao vírus Zika.....**38**
- Figura 8** - Número médio de ovos postos no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* expostas ao vírus Zika (ZIKV): Não exposto (NE), Exposto Não Infectado (ENI), Exposto Infectado (EI) e Exposto Disseminado (ED).....**40**
- Figura 9** - Percentual médio de eclosão de larvas (fertilidade) no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* expostas ao vírus Zika (ZIKV): Não exposto (NE), Exposto Não Infectado (ENI), Exposto Infectado (EI) e Exposto Disseminado (ED).....**41**
- Figura 10** - Número médio de ovos (fecundidade), no primeiro ciclo gonadotrófico de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus Zika (ZIKV).....**42**

**Figura 11** - Número médio de larvas que eclodiram (fertilidade) no primeiro ciclo gonadotrófico de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus Zika (ZIKV).....**43**

**Figura 12** - Percentual de indivíduos de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus Zika (ZIKV), que realizaram a busca por fonte sanguínea, em alimentador artificial, com sangue livre de partículas virais.....**44**

## LISTA DE ABREVIACOES

**$\mu$ L** Microlitro

**$\mu$ m** Micrmetro

***Ae.*** *Aedes*

**CDC** Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA

**Cecal** Centro de Criação de Animais de Laboratório

***Cx.*** *Culex*

***CqSLab*** Colônia de *Culex quinquefasciatus* mantida em laboratório

***DENV*** *Dengue virus* (vírus Dengue)

**ESPIN** Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional

**IAM** Instituto Aggeu Magalhães

**LACV** *La Crosse virus* (vírus Encefalite La Crosse)

**LAVITE** Laboratório de Virologia e Terapia Experimental

***mL*** Mililitro

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**PFU** Unidade formadora de placa

**PNCD** Programa Nacional de Controle da Dengue

**PrC** Proteína do capsídeo

**PrE** Proteína do envelope

**PrM** Proteína pr-membrana

**RNA** *Ribonucleic acid* (cido ribonucleico)

**rpm** Rotação por minuto

**RT-PCR** *Reverse transcription Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)

**SCZ** Síndrome Congnita associada  infecção pelo vírus Zika

**SE** Semana epidemiológica

**SGB** Síndrome de Guillain-Barré

**TV** Transmissão vertical

**UNICAMP** Universidade Estadual de Campinas

**WNV** *West Nile virus* (Vírus Oeste do Nilo)

**ZIKV** *Zika virus* (vírus Zika)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Vírus Zika</b>	<b>17</b>
2.1.1 Histórico de distribuição e Epidemiologia	17
2.1.2 Características genotípicas e estruturais do ZIKV	20
2.1.3 Caracterização da febre Zika	20
2.1.4 Transmissão, prevenção e controle	21
<b>2.2 <i>Culex quinquefasciatus</i></b>	<b>23</b>
<b>2.3 Capacidade vetorial</b>	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	<b>29</b>
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Propagação do Vírus Zika em Células Vero</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Amostras de mosquitos e infecção oral</b>	<b>30</b>
4.2.1 Infecção oral	31
<b>4.3 Extração de RNA e RT-qPCR</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Avaliações de custo biológico</b>	<b>34</b>
<b>4.5 Análise Estatística</b>	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Taxas de infecção e disseminação do vírus Zika em <i>Cx. quinquefasciatus</i></b>	<b>38</b>
<b>5.2 Fecundidade e Fertilidade das fêmeas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> expostas ao ZIKV – geração parental</b>	<b>38</b>
<b>5.3 Fecundidade e fertilidade na geração descendente de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> expostas ao ZIKV – geração F1</b>	<b>41</b>

<b>5.4 Busca por fonte sanguínea na geração F1 de <i>Culex quinquefasciatus</i></b>	<b>43</b>
<b>5.5 Taxa de transmissão transovariana do vírus Zika na geração F1</b>	<b>44</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, causam doenças que são responsáveis por epidemias recorrentes no Brasil e em várias partes do mundo. Entre esses, estão as Zika, dengue e chikungunya, arboviroses que podem desencadear complicações graves, o que ressalta sua grande importância para saúde pública (PINEDA *et al.*, 2016; KAKDE U, KHATIB MN, 2024; GIRALDO *et al.*, 2023).

Nesse contexto, destaca-se a infecção pelo vírus Zika (ZIKV) em humanos, que pode evoluir para complicações neurológicas, como Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma manifestação rara em que o paciente é acometido em seu sistema nervoso periférico, e microcefalia, condição diagnosticada em recém-nascidos, efeito consequente da infecção materna. A introdução desse arbovírus no país ocorreu já em 2013, provavelmente durante a Copa das Confederações (FARIA *et al.*, 2016) e trouxe grande impacto, entre 2015 e 2016. Nesse período, houve um aumento significativo de casos de microcefalia na região Nordeste do país (BRASIL, 2016) e associado à infecção materna pelo ZIKV (BRASIL, 2016).

Espécies de mosquito do gênero *Aedes* são as principais incriminadas na transmissão do ZIKV (LEDERMANN *et al.*, 2014; DIAGNE *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2016; MAIN *et al.*, 2018; ELIZONDO; QUIROGA *et al.*, 2019; GOMARD *et al.*, 2020). Entretanto, outras espécies de culicídeos estão presentes em ambientes urbanos e podem ter papel importante nesse ciclo de transmissão. *Culex quinquefasciatus*, por exemplo, além de vetor de outros arbovírus, como Saint Louis (FORATTINI, 2002); Nilo Ocidental (SARDELIS *et al.*, 2001); Rift Valley; Sindbis (TURELL, 2012) e Oropouche (ROSA *et al.*, 1996), é uma espécie altamente antropofílica e predominante nas Américas (KRAMER; CIOTA, 2015). Seu alto grau de antropofilia favorece a rápida circulação de patógenos entre as populações humanas. Nesse sentido, Ayres (2016) levantou a possibilidade do envolvimento dessa espécie no processo de transmissão do ZIKV e, desde então, estudos investigaram essa hipótese, corroborando (GUO *et al.*, 2016; GUEDES *et al.*, 2017; ELIZONDO-QUIROGA *et al.*, 2018; PHUMEE *et al.*, 2019; AYRES *et al.*, 2019) ou não encontrando evidências que suportem essa possibilidade (AMRAOUI *et al.*, 2016; WEGER; LUCARELLI *et al.*, 2016; GUERBOIS *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2016; HEITMANN *et al.*, 2017; ELIZONDO; QUIROGA *et al.*, 2018; MAIN *et al.*, 2018; AZAR *et al.*, 2019).

Considerando a indisponibilidade de vacinas comercialmente, uma das principais

formas disponíveis de reduzir a circulação do ZIKV é através do controle de seus vetores. Para isso, é fundamental conhecer as espécies envolvidas e compreender o processo de transmissão desse arbovírus, sendo esta uma das prioridades de saúde pública. Há de se considerar que o conhecimento sobre essa dinâmica de transmissão ainda apresenta lacunas, sobretudo pelos resultados discordantes obtidos em estudos envolvendo *Cx. quinquefasciatus* (FERNANDES *et al.*, 2017; GUEDES *et al.*, 2017). Portanto, o presente estudo foi proposto com a perspectiva de agregar informações sobre essa espécie, que possam contribuir para a compreensão dos processos de transmissão local do ZIKV. Esse conhecimento poderá vir a dar suporte aos gestores em saúde para a definição e implementação de estratégias de controle vetorial mais efetivas e direcionadas, sobretudo em áreas com infraestrutura sanitária precária, onde o mosquito *Cx. quinquefasciatus* é altamente abundante.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As principais dificuldades enfrentadas pelos gestores em saúde, no controle das arboviroses, são a falta de vacinas, para a maioria delas, a diversidade de patógenos e o pouco conhecimento sobre a interação desses com seus hospedeiros invertebrados. (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Nesse sentido, a efetividade limitada do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), uma das mais importantes arboviroses, no quesito controle vetorial, pode ter contribuído não apenas para a permanência do vírus Dengue (DENV), mas também para a rápida disseminação de novos arbovírus no Brasil, como o Zika (ZIKV), introduzido no país em 2013 (FARIA *et al.*, 2016). Assim, é fundamental conhecer o potencial de disseminação desse arbovírus e os vetores envolvidos nesse processo, para que, de fato, sejam estabelecidas medidas de controle eficazes e direcionadas às espécies vetoras (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

### 2.1 Vírus Zika

Arbovírus emergente da família *Flaviviridae*, o vírus Zika (ZIKV) representa um grave problema de saúde pública, pois pode desencadear complicações neurológicas, como Síndrome de Guillain-Barré (SGB), manifestação rara, e microcefalia (BRASIL *et al.*, 2019; SMOOTS *et al.*, 2020), condição diagnosticada em recém-nascidos no Brasil e associada à infecção materna.

#### 2.1.1 Histórico de distribuição e epidemiologia do vírus Zika

O ZIKV teve a sua primeira detecção de infecção em humanos no ano de 1964, em Uganda. Ele foi isolado pela primeira vez em 1947, também em Uganda, a partir de amostras de um macaco rhesus febril. Já em 1948, foi identificado na espécie de mosquito *Aedes africanus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Após ser isolado na Nigéria, em 1968 (FAGBAMI, 1979), casos foram identificados em outros países da África, como República Central Africana, Serra Leoa, Gabão, Egito e Tanzânia (HAYES, 2009) e no Sudeste Asiático (OLSON *et al.*, 1981).

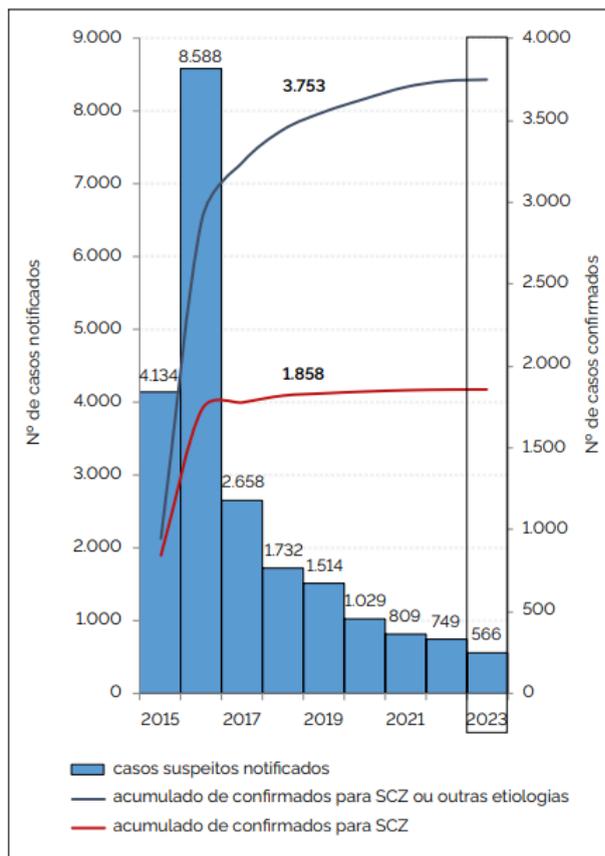
Por pelo menos cinco décadas, o ZIKV circulou no Sudeste Asiático, até sua primeira detecção fora da África e Ásia, que só ocorreu em 2007, nas Ilhas de Yap, Estados Federados da Micronésia (HAYES, 2009). Em outubro de 2013, na Polinésia Francesa, ocorreu um surto

causado por arbovírus, o qual foi identificado e relatado, em 2014, como sendo um surto causado por ZIKV (CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014). O primeiro registro de internação grave causada pelo ZIKV ocorreu nesse período, quando se diagnosticou Síndrome de Guillain-Barré em um paciente, sete dias após a suspeita de infecção (OEHLER et al., 2014). A partir de então, o vírus se dispersou para outras ilhas do Pacífico, como Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (MUSSO, 2015).

No Brasil, o ZIKV foi provavelmente introduzido durante a Copa da Confederações, em 2013 (FARIA et al., 2016). Só em 2015, sua transmissão autóctone, que é a transmissão local, foi identificada, quando o país vivenciou um aumento significativo de casos de microcefalia na região Nordeste, os quais foram associados à infecção materna por esse arbovírus (BRASIL, 2016). Em 11 de novembro do mesmo ano (Portaria MS nº 1813/2015), o Ministério da Saúde declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN). Nesse período, pesquisadores iniciaram um cuidadoso protocolo de investigação. Mulheres grávidas do Estado da Paraíba, diagnosticadas com microcefalia fetal, que incluíam anomalias cerebrais graves, foram examinadas e seus exames para o ZIKV foram negativos. Porém, os resultados das análises do líquido amniótico mostraram a presença do ZIKV, momento em que os primeiros diagnósticos de transmissão intrauterina foram notificados (OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016).

Ainda em 2015, o ZIKV foi identificado na Colômbia e Suriname, de onde se dispersou para outros países da América do Sul e Central (ENFISSI et al., 2016). Embora o ESPIN tenha terminado oficialmente em 30 de julho de 2017, o país ainda registra novos casos de Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ) e mortes relacionadas com a doença (Brasil. Ministério da Saúde). Em torno de 21 mil casos suspeitos de SCZ foram notificados ao Ministério da Saúde, entre 2015 e a semana epidemiológica (SE) 31 de 2023. Desses, 1.858 foram confirmados para SCZ (**Figura 1**) (BRASIL, 2023).

**Figura 1** - Distribuição anual dos casos suspeitos de síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika notificados no Brasil entre 2015 e a SE 31/2023.



Fonte: Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde. Vol. 54, Nº16, 2023.

No mesmo período, na região Nordeste, 11.607 casos suspeitos de síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ) foram notificados, sendo 3.295 (15,1%) apenas em Pernambuco (**Tabela 1**). Desses, 374 (20,1%) foram confirmados. Embora em menor quantidade, casos de Síndrome Congênita associada à infecção pelo ZIKV (SCZ) são notificados ainda hoje. Em 2023, um total de 566 casos suspeitos foram notificados, desses, 508 (90%) permanecem em investigação para SCZ (BRASIL, 2023).

**Tabela 1** - Distribuição dos casos notificados, em investigação e confirmados para a síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika por região. Em destaque Região Nordeste e o Estado de PE - Brasil, no período de 2015 à SE 31/2023.

Regiões	Casos notificados		Casos em investigação		Casos confirmados para SCZ	
	n	%	n	%	n	%
Norte	1.417	6,5	745	25,2	60	3,2
<b>Nordeste</b>	<b>11.607</b>	<b>53,3</b>	<b>972</b>	<b>32,8</b>	<b>1.414</b>	<b>76,1</b>
<b>Pernambuco</b>	<b>3.295</b>	<b>15,1</b>	<b>65</b>	<b>2,2</b>	<b>374</b>	<b>20,1</b>
Sudeste	6.183	28,4	1.015	734,3	235	12,6
Sul	974	4,5	153	5,2	13	0,7
Centro-Oeste	1.598	7,3	75	2,5	136	7,3
Brasil	21.779	100,0	2.960	100,0	1.858	100,0

Fonte: Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde. Vol. 54, Nº16, 2023

Nota: Brasil (2023). Tabela criada pela autora.

### 2.1.2 Características genotípicas e estruturais do vírus Zika

Pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, o ZIKV é constituído por três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (PrC), proteína pré-membrana (PrM) e proteína do envelope (PrE); e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Assim como outros vírus da família, possui genoma de RNA linear de fita simples e sentido positivo, com tamanho de 10,7 kb. (SAXENA *et al.*, 2016).

De origem africana, de acordo com a abordagem filogenética, o ZIKV divergiu para três linhagens, ao longo de sua dispersão pelo globo. São elas, a linhagem africana, a asiática, que se originou por volta de 1940, na dispersão e estabelecimento do vírus no Sudeste asiático (PINTO JUNIOR *et al.*, 2015), e a linhagem americana, que se originou no processo de migração e estabelecimento no continente americano, já em 2015 (ABUSHOUK; NEGIDA; AHMED, 2016; KAZMI *et al.*, 2020).

### 2.1.3 Caracterização da febre Zika

A suspeita de infecção pelo vírus Zika pode ser através dos sintomas de pessoas que vivem ou passam um curto período em áreas onde o vírus Zika é transmitido e/ou com

presença dos mosquitos vetores (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022). Para que essa infecção possa ser detectada em um pequeno período, se faz necessário um diagnóstico molecular específico e rápido para o ZIKV (SAXENA *et al.*, 2016).

Grande parte das pessoas infectadas pelo vírus Zika não desenvolvem sintomas, pois estudos apontam que 80% dos infectados são assintomáticos e, entre aqueles que apresentam sintomatologia, normalmente essa começa de 3 a 15 dias após infecção (HABY; PINART; ELIAS; REVEIZ; 2018). Alguns sintomas característicos da febre Zika são: febre, dores nas articulações e musculares, erupção cutânea, conjuntivite, mal-estar e dores de cabeça. O diagnóstico de infecção pelo ZIKV deve ser confirmado por exames de sangue e de outros fluidos corporais, já que esses sintomas são comuns a outras doenças. Quando a infecção ocorre durante o período de gravidez, é recomendado que exames laboratoriais específicos sejam feitos de forma precoce. (BRASIL, 2023).

Até o momento, não há vacina ou qualquer medicamento específico que esteja disponível para tratar ou prevenir a infecção pelo ZIKV. Contudo, a ingestão de líquidos, repouso e tratamento dos sintomas com analgésicos são recomendados. Medicamentos como paracetamol também podem ser úteis para o alívio das dores e da febre. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022). Outras recomendações, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, como os medicamentos anti-inflamatórios não esteroides e aspirinas, precisam ser evitados até que o diagnóstico seja confirmado, devido ao risco de sangramento a infectados pelo vírus da dengue.

#### 2.1.4 Transmissão, prevenção e controle do vírus Zika

O ZIKV é transmitido em ciclos silvestres ou urbanos, principalmente por mosquitos infectados do gênero *Aedes*, em regiões tropicais e subtropicais (DIAGNE *et al.*, 2015; FERREIRA-DE-BRITO *et al.*, 2016; RICHARD; PAOAAFAITE; CAO-LORMEAU, 2016; DÍAZ-QUIÑONEZ *et al.*, 2016), sendo as espécies *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *A. polynesiensis*, *Ae. vittatus*, *Ae. unilineatus* e *Ae. hensilli*, as principais incriminadas (AGUMADU; RAMPHUL, 2018). Adicionalmente, outras espécies de culicídeos estão presentes em ambientes urbanos e podem ter papel importante nesse ciclo de transmissão (AYRES, 2016).

As medidas de prevenção e controle da infecção pelo ZIKV estão diretamente associadas à redução das fontes de reprodução dos mosquitos (criadouros) e do contato entre humanos e estes possíveis vetores. A redução do contato é possível através da utilização de

telas para o fechamento de janelas e entradas, redes mosquiteiras, repelente de insetos etc. (SAXENA et al., 2016). Gestantes devem tomar maiores precauções, pois os resultados de um estudo envolvendo mulheres grávidas no Estado do Rio de Janeiro mostraram que 42% dos recém-nascidos vivos, de mulheres positivas para o vírus Zika, apresentaram imagem cerebral anormal ou achados clínicos anormais, dos quais, quatro estavam com microcefalia (BRASIL et al., 2016). Estima-se ainda que de 5 a 15% dos recém-nascidos de mulheres infectadas pelo ZIKV durante o processo de gestação vão apresentar evidentes complicações relacionadas ao vírus (MUSSO; KO AL; BAUD, 2019).

Além da transmissão vetorial horizontal (entre vetores e hospedeiros vertebrados), estudos apontam a transmissão vertical (TV) do ZIKV como importante mecanismo de manutenção desse arbovírus no ambiente (MANUEL; MISSÉ; POMPON, 2020; LAI et al., 2020; PHUMEE, et al., 2019). Trata-se de uma estratégia evolutiva dos arbovírus para se manter no ambiente durante condições ambientais desfavoráveis ou em intervalos de epidemias, quando a transmissão entre vetores e hospedeiros é escassa (DAHIYA, et al., 2022). Ocorre após a ingestão de partículas virais durante o repasto sanguíneo das fêmeas. Após atravessar as barreiras de infecção e de escape do intestino, o vírus se dissemina, contaminando os ovários. Através da TV, ocorre a transferência do patógeno para gerações subsequentes do mosquito (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017).

Um estudo publicado em 2020 afirma que o ZIKV pode ser transmitido verticalmente em *Ae. albopictus*. A taxa de transmissão vertical (TV) nos ovos da geração F1, primeira geração descendente da parental, foi de 2,06% e já nos adultos foi de 1,87%. Embora com o número baixo da taxa de transmissão vertical, esse mesmo estudo mostrou que essas fêmeas infectadas por essa via transmitiram o ZIKV de forma horizontal para camundongos. (LAI et al., 2020). Em estudo com colônia de laboratório, Phumee et al (2019) detectaram RNA do ZIKV em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, até a geração F6, e em machos, até a geração F2 (PHUMEE, et al., 2019). Desse modo, é consenso que a transmissão horizontal do ZIKV é a protagonista das recentes epidemias, contudo, a TV tem relevante implicação epidemiológica, considerando seu papel na manutenção da sobrevivência do ZIKA em períodos inter-epidêmicos (MANUEL; MISSÉ; POMPON, 2020), o que pode potencializar o risco de futuras epidemias (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017).

Embora necessite ser investigado com maior profundidade, estudos sugerem que a via de transmissão do ZIKV não se limita à transmissão via mosquitos infectados, apontando para

outras vias, como por exemplo, transfusão de sangue, já que a presença do RNA do ZIKV foi detectada no sangue de pacientes até 2 meses (58 dias) depois do começo dos sintomas (YANIV *et al.*, 2016). Um trabalho feito por pesquisadores do Brasil, com aproximadamente mil e oitocentas amostras de doações de sangue do hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), mostrou prevalência de 0,16% do RNA do ZIKV, testando amostras em um formato de mini-pool individual e utilizando a RT-qPCR, sugerindo que a transmissão via transfusão de sangue pode ocorrer, mesmo em locais onde o vírus circula em números baixos (MAGNUS *et al.*, 2018).

A transmissão via urina contaminada também foi colocada como uma possibilidade, já que, após um período de infecção pelo ZIKV, estudos clínicos mostram que vírions ainda infecciosos podem ser excretados, logo, o ZIKV também já foi detectado em urina de seres humanos (DU *et al.*, 2019). O *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* se mostraram suscetíveis a infecções pelo vírus quando se reproduzem em um ambiente onde há urina infectada com o vírus Zika, pois as larvas e pupas dessas espécies de mosquitos podem ser infectadas durante o processo de crescimento neste ambiente aquático contaminado com urina, o que vai resultar em fêmeas adultas que vão se infectar com o ZIKV (DU *et al.*, 2019).

Pesquisadores sugerem ainda que o ZIKV pode ser transmitido por via sexual, devido à detecção no esperma. Foy *et al.*, em 2011 mostraram evidências clínicas e sorológicas para transmissão via sexual entre cientistas americanos que se infectaram pelo ZIKV durante seus trabalhos no Senegal em 2008, ao voltar para casa um dos cientistas transmitiu esse arbovírus a sua esposa. Um caso de transmissão de homem para homem também já foi relatado, onde um homem que havia viajado recentemente para uma região onde a transmissão do ZIKV estava acontecendo de forma ativa e seu parceiro masculino que não viajou, o que indica a transmissão do vírus Zika através do sexo anal (DECKARD *et al.*, 2016).

## **2.2 *Culex quinquefasciatus***

*Culex quinquefasciatus* Say, 1823 é uma espécie de mosquito pertencente à família Culicidae, também conhecido como pernilongo ou muriçoca. São considerados trópicos cosmopolitas, ou seja, sua distribuição ocorre amplamente pelo globo, abrangendo porções meridionais da África, Ásia, Oceania e das Américas. Neste último, o *Culex quinquefasciatus* é encontrado do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. (FARAJOLLAHI *et al.*, 2011). Dotados de hábitos noturnos, indivíduos do gênero *Culex* são atraídos para se alimentar

quando, próximos aos seus abrigos e criadouros, encontram-se o seu hospedeiro. Entretanto, algumas espécies podem se alimentar durante o dia. Eles apresentam preferência alimentar por mamíferos e, principalmente, o homem. Algumas espécies brasileiras têm, também, preferência alimentar por aves. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994)

O *Cx. quinquefasciatus* divide território com o *Ae. aegypti*, contudo, as diferenças biológicas e atuação em horários diferentes faz com que o *Cx. quinquefasciatus* ocupe nicho diferente. Os indivíduos da espécie *Cx. quinquefasciatus* são altamente antropofílicos, estão sempre nos ambientes urbanos, colocam seus ovos em água rica em matéria orgânica, principalmente em águas provindas de residências como fossas, ralos e poços o que também difere do *Ae. aegypti*, que tem preferência por águas mais limpas e transparentes. Entretanto reservatórios temporários também são utilizados por espécies de *Culex*, como latas de bebidas, copos e até mesmo recipientes de animais. Os meses mais quentes e chuvosos favorecem o acúmulo de água no solo e nos recipientes e aumenta seus locais de procriação (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Os ovos de *Cx. quinquefasciatus* não resistem a ambientes extremamente secos, são depositados diretamente na água e de modo agrupado, em um formato que se assemelha a uma balsa ou jangada (Figura 2). Essa estrutura configura resistência e proteção contra, por exemplo, ataques de inseticidas (MATTINGLY, 1963).

**Figura 2** - Fêmea de *Culex quinquefasciatus* ovipositando em superfície aquática.



Fonte: EOL - Enciclopédia da Vida. Acesso em: 25 fev. 2024.

Seu ciclo de vida é composto por 4 fases: ovo, larva, pupa e adulto. O seu estágio larval é dividido em 4 estádios: L1, L2, L3 e L4. Na fase adulta, apresentam corpo de tamanho médio de meio centímetro, de cor parda (FORATTINI, 1962). O período entre a oviposição e a eclosão das larvas é de aproximadamente 48 horas. Durante os quatro estádios de desenvolvimento, as larvas se alimentam de forma constante. Seu corpo é dividido em

cabeça, corpo, tórax, segmentos abdominais anteriores e posteriores, lobo anal e sifão respiratório, o qual rompe a tensão superficial e entra em contato com o ar atmosférico para a respiração. Já as pupas possuem corpo em formato de vírgula e não se alimentam, de modo que toda sua reserva adquirida durante o período larval é utilizada para sua transformação em adultos. Dependendo da variação de temperatura e de outros aspectos, o tempo nessa fase é de 48 horas, aproximadamente. Nos adultos, os machos vão se diferenciar das fêmeas em algumas características como antenas plumosas e palpos longos. Também no último segmento, na extremidade do abdome, está projetada a genitália masculina, a fêmea adulta possui antenas pilosas e palpos curtos (FORATTINI, 1962).

*Cx. quinquefasciatus* é considerado o principal vetor da *Wuchereria bancrofti*, patógeno causador da filariose bancroftiana no Brasil. O hábito noturno do *Cx. quinquefasciatus* facilita o contato com as microfilárias de pessoas infectadas com *Wuchereria bancrofti*, o que torna esse culicídeo mais eficaz que outros mosquitos, já que é durante a noite o período de aumento da microfilaremia periférica. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Além disso, essa espécie é vetor de vários arbovírus, como Saint Louis (FORATTINI, 2002); Nilo Ocidental (SARDELIS et al., 2001); Rift Valley; Sindbis (TURELL, 2012) e Oropouche (ROSA et al., 1996). Em 2016, *Cx. quinquefasciatus* foi apontada como potencial vetor do ZIKV (AYRES, 2016), considerando ser uma espécie altamente antropofílica e predominante nas Américas (KRAMER; CIOTA, 2015).

Alguns estudos corroboraram com a hipótese apontada por Ayres (2016), pois encontraram evidências de que *Cx. quinquefasciatus* é competente para transmitir ZIKV (GUO et al., 2016; GUEDES et al., 2017; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2018; PHUMEE et al., 2019; AYRES et al., 2019). Guo et al., 2016, por exemplo, detectaram o RNA do vírus na saliva do mosquito *Cx. pipiens quinquefasciatus*, além de ter detectado transmissão de mosquitos dessa espécie para camundongos, em experimentos de laboratório. Guedes et al. (2017), além de terem encontrado ZIKV na glândula salivar, em experimentos de laboratório, encontraram espécimens de *Cx. quinquefasciatus* naturalmente infectados com ZIKV em Recife, Pernambuco (GUEDES et al., 2017). Outros trabalhos não encontraram evidências do envolvimento dessa espécie na transmissão do ZIKV (AMRAOUI et al., 2016; WEGER; LUCARELLI et al., 2016; GUERBOIS et al., 2016).

### 2.3 Capacidade vetorial

A capacidade vetorial inclui parâmetros importantes na incriminação de espécies vetoras e vai além da competência vetorial. É conceituada como a habilidade de uma espécie para transmitir um patógeno (GARRET-JONES, 1964). A ela, estão associados fatores ambientais, aspectos do comportamento, do desempenho biológico do vetor e a própria competência vetorial, no entanto, esta última, isoladamente, não retrata a capacidade vetorial em um determinado contexto epidemiológico, considerando que se limita ao conjunto de fatores intrínsecos ao vetor, definida como “a razão entre o número de fêmeas de mosquitos potencialmente infectantes em um hospedeiro e o número desses indivíduos que de fato infectam hospedeiros susceptíveis, uma vez transcorrido o correspondente período de incubação extrínseco (PIE)” (ALMEIDA, 2011).

Uma espécie considerada de alta competência, por exemplo, pode não ter capacidade vetorial se o PIE do vírus for maior que sua longevidade, ou se sua taxa de picadas for baixa. Por outro lado, uma espécie classificada como de baixa competência pode ser responsável por uma epidemia em um determinado tempo e espaço, como a da febre amarela, descrita na Nigéria, em 1987, causada por uma população de *Ae. aegypti* pouco competente (MILLER et al., 1989). Desse modo, além da competência vetorial, é importante considerar o comportamento e desempenho biológico das espécies envolvidas em diferentes sistemas de transmissão de patógenos, pois esses podem alterar a estimativa de ocorrência e dimensão de um surto (MAYTON et al., 2019).

Em várias partes do mundo, estudos estão voltados à investigação sobre a competência vetorial de *Ae. aegypti* para a transmissão do ZIKV e têm relatado o seu papel como vetor primário desse arbovírus (DIAGNE et al., 2015; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; RICHARD; PAOAAFAITE; CAO-LORMEAU, 2016; DÍAZ-QUIÑONEZ et al., 2016). A maioria das investigações limita-se a um aspecto da capacidade vetorial: a competência vetorial para transmissão (AGHA et al., 2017; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2019; GLORIA-SORIA et al., 2020; GOMARD et al., 2020; HEITMANN et al., 2017; SEVERINI et al., 2018; VEGA-RÚA et al., 2014), de modo que são poucos os estudos sobre a capacidade vetorial em relação ao ZIKV, o que deixa lacunas no conhecimento sobre sua dinâmica de transmissão (CRESPO et al., 2023).

Nesse sentido, é fundamental que a capacidade vetorial seja explorada mais profundamente, tal quanto a competência vetorial, para que se entenda como arboviroses

surtem e se estabelecem em um território, a fim de desenvolver novas abordagens de controle (KRAMER; CIOTA, 2015). Após uma alimentação com sangue infectado o mosquito desenvolve uma resposta imunológica que leva a expressão de vários genes. Essa comunicação de genótipos mosquito-vírus determina a competência do vetor (KRAMER; CIOTA, 2015). Porém, a reação do mosquito ao microrganismo patogênico pode gerar impacto sobre parâmetros importantes de seu desempenho biológico, que, combinados com a competência vetorial, antropofilia e abundância, podem determinar o seu potencial de transmissão (KRAMER; CIOTA, 2015).

Capacidade reprodutiva, que inclui fecundidade e fertilidade; a longevidade; a busca por fonte sanguínea e sobrevivência da prole são algumas das características que compõem o *fitness* (ou desempenho biológico) de uma espécie e que podem sofrer impacto após interação com organismos patogênicos (BARKER, 2009). Um estudo publicado em 2007, por exemplo, mostrou que, após serem infectadas com Vírus do Oeste do Nilo (WNV), fêmeas de *Culex tarsalis* tiveram seu comportamento de alimentação sanguínea modificado (STYER; MEOLA; KRAMER, 2007). As fêmeas infectadas obtiveram taxas maiores de alimentação sanguínea, comparadas com aquelas que foram expostas ao mesmo vírus, mas não foram infectadas. Também nesse trabalho, fêmeas de *Cx. tarsalis* apresentaram uma menor fecundidade (parâmetro que representa o número de ovos) quando infectadas com o Vírus do Oeste do Nilo (WNV), em relação a fêmeas não infectadas. Assim, a infecção por WNV reduziu a produção de ovos, mas aumentou a taxa de alimentação sanguínea. Diferentemente, o parâmetro relacionado à sobrevivência não foi afetado (STYER; MEOLA; KRAMER, 2007).

Em investigação com o vírus da Encefalite La Crosse (LACV), pesquisadores demonstraram que a infecção afetou o comportamento da alimentação de mosquitos *Ae. triseriatus* e *Ae. albopictus*, reduzindo a taxa de busca pelo hospedeiro. Contudo, no mesmo estudo, em um experimento de realimentação, as fêmeas de *Ae. triseriatus*, infectadas com LACV, buscaram a fonte sanguínea mais vezes em 24 horas, em comparação aos não infectados, o que possivelmente resulta em um incremento na capacidade vetorial, pelo aumento da probabilidade de infecção e transmissão (JACKSON, BREWSTER, PAULSON; 2012).

Estudos desenvolvidos com esse tipo de abordagem, para *Culex quinquefasciatus* e ZIKV, até o momento, não foram publicados, exceto pela recente publicação, ainda em preprint, que avaliou parâmetros da capacidade reprodutiva, longevidade, sobrevivência e busca

por fonte sanguínea na geração parental dessa espécie, após exposição ao ZIKV (CRESPO *et al.*, 2023). Alguns outros, realizados com a espécie *Ae. aegypti*, também abordaram parâmetros como fecundidade, fertilidade e sobrevivência após infecção com o ZIKV (SILVEIRA *et al.*, 2018). Os pesquisadores encontraram resultados diferentes, demonstrando que o impacto da infecção por um patógeno sobre aspectos do desempenho biológico não apenas pode variar entre diferentes espécies de mosquitos e linhagens de vírus, mas, sobretudo, entre populações de uma mesma espécie, de diferentes localizações geográficas (PADILHA *et al.*, 2018; PETERSEN *et al.*, 2018; RESCK *et al.*, 2020). Nesse contexto, a sobrevivência e fecundidade de fêmeas de *Ae. aegypti* de uma população coletada no Rio de Janeiro foi reduzida pela infecção com o ZIKV, linhagem ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/201 (PETERSEN *et al.*, 2018). Utilizando a mesma linhagem do vírus e uma população de *Ae. aegypti* da Polinésia Francesa, Padilha *et al.* (2018) relataram não haver impacto da infecção por ZIKV em *Ae. aegypti*, com relação à fecundidade e fertilidade.

Desse modo, é de extrema importância que os estudos desenvolvidos com a perspectiva de compreender sobre a dinâmica de transmissão de arbovírus e sua influência no desempenho biológico do vetor, sobretudo na sua interação com o patógeno, que pode diretamente influenciar na sua competência vetorial e conseqüentemente, na capacidade vetorial (SEVERSON; BEHURA, 2016).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar aspectos da capacidade reprodutiva, de repasto sanguíneo e transmissão transovariana em *Culex quinquefasciatus*, colônia de laboratório, em relação ao vírus Zika.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o custo biológico da exposição ao ZIKV, em *Culex quinquefasciatus* de laboratório, considerando-se os parâmetros de fecundidade e fertilidade, no primeiro ciclo gonadotrófico.
- Avaliar a busca por fonte sanguínea em indivíduos da geração descendente (F1) do grupo de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* de laboratório expostas ao ZIKV;
- Avaliar a fecundidade e fertilidade, no primeiro ciclo gonadotrófico, em indivíduos descendentes (F1) de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* de laboratório, expostas ao ZIKV.
- Estimar a taxa de transmissão transovariana em indivíduos descendentes (F1) de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* de laboratório, expostas ao ZIKV.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Propagação do Vírus Zika em células Vero

As amostras de ZIKV que foram usadas no presente projeto de pesquisa são da linhagem ZIKV BRPE243/2015 (DONALD et al., 2016), pertencente à coleção de vírus do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do IAM. A preparação dos estoques do arbovírus que foi usado nos ensaios de alimentação artificial está descrita em Guedes *et al.* (2017). Para determinar o título do estoque do vírus na infecção artificial via oral, em unidade formadora de foco por mililitros (FFU/ml), as titulações também foram realizadas conforme descrito no protocolo Guedes *et al.* (2017). O vírus foi cultivado em células Vero e armazenados no *deep freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. O título viral foi de  $9 \times 10^6$  e  $1,5 \times 10^5$  FFU/ml, respectivamente nos dois experimentos, calculado através de ensaio de placa em células Vero.

### 4.2 Amostras de mosquitos e infecção oral

Para as avaliações de desempenho biológico, foi utilizada uma colônia de *Culex quinquefasciatus* mantida em laboratório (colônia CqSLab). A colônia CqSLab foi fundada em 2011 e originou-se dos municípios de Ipojuca, Olinda e Jaboatão (Região Metropolitana do Recife). Os mosquitos foram mantidos no insetário do Departamento de Entomologia, sob condições controladas de temperatura ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar (50 a 90%) e fotoperíodo 14:10 h (C/E). As larvas e pupas foram mantidas em cubas plásticas, que medem 45,5 x 28 x 7,7 cm, com aproximadamente 2 litros de água potável e ração para gatos (Friskies®), a qual foi administrada a cada dois dias, na quantidade de aproximadamente 0,10 mg por larva. Para a manutenção dos adultos, foram utilizadas gaiolas contínuas em tela e alumínio, com dimensões de 40 x 30 x 30 cm. Os mosquitos foram alimentados diariamente em solução de sacarose a 10%. A alimentação sanguínea foi feita semanalmente, com sangue de coelho desfibrinado, em alimentador artificial, constituído por placa de Petri, revestida com Parafilme, M (Bemis) e bolsas térmicas pré-aquecidas em banho-maria. O sangue foi fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL).

#### 4.2.1 Infecção oral

Os procedimentos de infecção oral foram realizados no infectório do Departamento de Entomologia do IAM, onde as etapas para a manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas dentro das normas internacionais de biossegurança e bioproteção. O procedimento de infecção oral seguiu o protocolo descrito em Guedes *et al.* (2017) e Carvalho-Leandro *et al.* (2012). As fêmeas foram expostas ao vírus através de alimentador artificial, em sangue de coelho desfibrinado, fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), Fiocruz-RJ. O alimentador foi constituído por uma placa de Petri plástica, revestida com duas membranas tipo parafilm M (Bemis) (Figura 3). Para manter a temperatura do sangue em torno de 37°C, bolsas térmicas foram pré-aquecidas por 4 minutos em banho-maria e colocadas sobre as placas de Petri, já disponibilizadas sobre as gaiolas de contenção possibilitando o repasto sanguíneo durante uma hora. As bolsas térmicas foram trocadas após meia hora de exposição, para manutenção da temperatura do sangue. As fêmeas que não se alimentaram adequadamente, ou seja, se alimentaram de forma parcial, ou não se alimentaram, foram descartadas do estudo. Foi incluído em cada ensaio o grupo controle, que consiste em mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais, 200 fêmeas e 100 machos para o grupo controle e 300 fêmeas e 150 machos para o grupo teste, onde foram expostas ao ZIKV. Foram separadas em gaiolas individuais, 30 fêmeas do grupo controle e 50 do grupo teste. Os mosquitos foram alimentados com idade de 7 a 10 dias de emergência e foram mantidos em jejum durante 24h antes do experimento. Dois experimentos de infecção oral foram realizados.

**Figura 3** - Infecção oral – Fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, CqSLab, se alimentando com sangue de coelho desfibrinado, contendo cultivo de células com vírus Zika, em alimentador artificial



Fonte: Acervo da autora, 2023.

### 4.3 Extração de RNA e RT-qPCR

Os procedimentos referentes à extração de RNA e RT-PCR quantitativa das amostras de mosquitos estão descritos em GUEDES *et al.* (2017). Quatorze dias após a exposição (dpe), os mosquitos foram coletados e dissecados para a separação de cabeça (CA) e tórax/abdome (TA) e colocados em um microtubo livre de DNase/RNase de 1,5 mL contendo 300 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de diluente de mosquito para posterior extração do RNA. Em seguida, as amostras foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ . Cada amostra foi macerada com pistilos estéreis e a extração de RNA foi feita com  $100\mu\text{L}$  da solução homogeneizada, pelo método Trizol (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, descrito a seguir.

Após a centrifugação breve dos inóculos, os tubos foram colocados no gelo, separados e identificados em microtubos de 1,5 mL e adicionado  $200\mu\text{L}$  em cada tubo. Por cerca de 10s as amostras foram agitadas no vórtex e deixadas 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período,  $100\mu\text{L}$  de clorofórmio foram adicionados em cada tubo, agitados por 15s e incubados a temperatura ambiente por aproximadamente 3 minutos. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a  $4^\circ\text{C}$  a 12.000 rpm. Ao término da centrifugação, as amostras formam fases distintas no tubo, a fase aquosa,

interfase e fase orgânica, duas pipetagens de 100µL da fase aquosa, foram transferidas para outro tubo eppendorf contendo 250µL de Isopropanol para a precipitação do RNA. Para a homogeneização, os novos tubos contendo a fase aquosa foram invertidos manualmente por 10 vezes e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Mais uma centrifugação foi feita a 4° C por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi removido por inversão dos tubos e adicionados 300µL de etanol 75% para a lavagem do RNA e os tubos foram vortexados por 2 segundos. Os tubos foram centrifugados mais uma vez por 5 minutos, a 4°C e a 12.000 rpm. O etanol foi removido por inversão e foi feita a secagem com papel absorvente e, após isso, o pellet foi colocado para secar por 15 a 20 minutos a 37°C na estufa. Na última etapa, o RNA foi ressuscitado em 30µL de água Ultra-Pure (Invitrogen) e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo, para verificação da pureza, armazenado a -80°C para a posterior realização da RT-qPCR.

Os *primers* que foram utilizados para os ensaios de detecção de partículas virais de ZIKV ao longo do período de incubação nas espécies estudadas estão descritos em Lanciotti *et al.*, (2008) (Quadro 1).

**Quadro 1** – Lista de *primers* e sonda utilizados neste estudo e suas respectivas sequências.

<i>Primers</i> e sonda	Sequência (5' ----- 3')
<b>Zika1087</b>	<b>CCG CTG CCC AAC ACA AG</b>
<b>Zika1163c</b>	<b>CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT</b>
<b>Zika1108FAM</b>	<b>AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA</b>

**Fonte:** Quadro organizado pela autora com base nos dados informados por Lanciotti *et al.*, (2008).

Para o vírus ser detectado, foi feita a RT-qPCR, em um sistema QuantStudio™ 5 da Applied BioSystems, com o QuantiNova Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). A RT-qPCR foi feita em um volume de reação de 10µL, contendo 3,5µL de RNA extraído, e QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix no volume de 5µL e concentração final de 1x, 0,1 µL do QuantiNova Probe RT Mix e concentração final de 1x, 0,05 µL do ROX Reference Dye e concentração final de 1x, 0,08µL dos dois *primers* e concentração final de 0.8µM, 0,4µL da sonda FAM e concentração final de 1µM, para cada poço. A ciclagem da RT-qPCR foi feita em 1 ciclo de 15 minutos a 45°C, 1 ciclo de 5 minutos a 95°C e 45 ciclos

de 5 segundos a 95°C e 45 ciclos de 45 segundos a 60°C. A quantidade de RNA do vírus em cada poço foi estimada comparando-se com a curva padrão, que foi sintetizada a partir de transcritos do RNA, conforme está descrito em Kong *et al.* 2006, com modificações na respectiva sequência do vírus utilizado, nesse caso o ZIKV. Comparou-se essa curva padrão com os valores do limite do ciclo (Ct), sendo positivas amostras abaixo de 38,5.

Os resultados obtidos da RT-PCR quantitativa também foram usados para estimar as taxas de infecção e disseminação do ZIKV em *Culex quinquefasciatus*. A taxa de infecção das amostras de mosquitos foi calculada pelo número de indivíduos que apresentaram intestinos positivos, dividido pelo total de mosquitos analisados. A taxa de disseminação é calculada pelo número de cabeças positivas dividido pelo total de intestinos positivos.

#### **4.4 Avaliações de custo biológico**

Após 24h da exposição, em cada experimento, 50 fêmeas expostas ao vírus e 30 expostas ao sangue livre de partículas virais (grupo controle) foram transferidas, através de sugadores automáticos, para gaiolas individuais, com volume de aproximadamente 500 cm<sup>3</sup>, contendo algodões embebidos em água e solução de sacarose. Em cada experimento, haviam 80 gaiolas para observação. No quarto dpe, recipientes com água foram colocados no interior das gaiolas individuais para a oviposição (Figura 4). Os ovos obtidos do primeiro ciclo gonadotrófico foram contados e colocados para eclosão das larvas, a fim de determinar a fecundidade (número médio de ovos) e taxa de fertilidade (percentual médio de larvas eclodidas) (Figura 5). As fêmeas expostas à infecção foram coletadas e armazenadas à -80°C no 14° dia para as avaliações das taxas de infecção e disseminação. Essa avaliação foi feita também entre as fêmeas que morreram antes do 14° dpe, as quais foram coletadas diariamente e armazenadas à -80°C.

As larvas descendentes das fêmeas expostas, após contadas, foram transferidas para cubas de criação, sendo uma cuba para descendentes de cada fêmea parental. Após o desenvolvimento larval, parte dos adultos dessa geração (aqui chamada geração F1) foram transferidos para gaiolas, em grupos de  $\pm$  15 fêmeas e 15 machos, misturando-se os descendentes das várias fêmeas parentais. Entre o 7° e o 10° dias da primeira emergência, a cada grupo de 15 fêmeas, foi oferecida alimentação sanguínea artificial, em sangue livre de partículas virais, para avaliação da busca por fonte sanguínea, a qual foi calculada pelo percentual de fêmeas que procuraram o ingurgitamento nos primeiros 30 minutos de

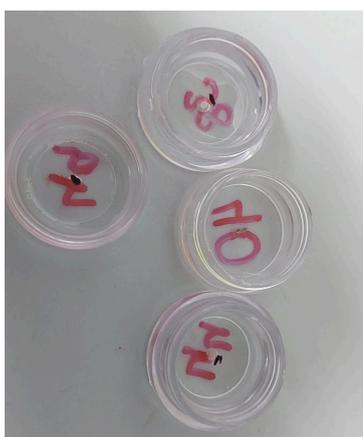
exposição. No quarto dia após alimentação, foram colocados recipientes com água no interior das gaiolas F1, para a oviposição e avaliação da fecundidade e fertilidade nessa geração(Figura 6).

Outra parte dos adultos que emergiram das cubas de F1 foi isolada para avaliar a possibilidade de transmissão vertical. Essa coleta foi feita entre o 5º e 7º dia de emergência, em *pools* de 2 a 5 indivíduos, e armazenadas à -80°C, para posterior processamento e avaliação da taxa de transmissão vertical do ZIKV em *Culex quinquefasciatus* (Figura 7).

Os experimentos com a geração F1 foram realizados com grupos de 15 fêmeas. No total, foram seis réplicas de 15 fêmeas para os grupos não expostos ao ZIKV – grupo Controle e oito para os grupos expostos a esse vírus – grupo Teste. Assim, na tabela abaixo, o “N” apresentado refere-se ao número de réplicas avaliadas.

Como os experimentos com essa geração de mosquitos foram realizados com 15 fêmeas agrupadas em cada gaiola, não foi possível relacionar cada uma delas ao seu grupo de ovos. Por isso, essas amostras de F1 não foram classificadas utilizando-se os critérios de desenvolvimento da infecção e disseminação, como feito com a parental.

**Figura 4** - Recipientes de postura individuais com jangadas *Culex quinquefasciatus*, CqSLab, expostas ao vírus Zika.



Fonte: Acervo da autora, 2023.

**Figura 5** - Jangada de *Culex quinquefasciatus*, CqSLab, expostas ao vírus Zika.



Fonte: Acervo da autora, 2023.

**Figura 6** - Alimentação de fêmeas da geração F1 de *Culex quinquefasciatus*, com sangue de coelho desfibrinado, em um pequeno alimentador artificial, constituído por pequena placa em acrílico, revestida com parafilme e bolsa térmica.



Fonte: Acervo da autora, 2023.

**Figura 7** - Cubas para desenvolvimento larval, individualizadas para os descendentes (geração F1) de cada fêmea parental de *Culex quinquefasciatus*, previamente exposta ao vírus Zika.



Fonte: Acervo da autora, 2023.

#### 4.5 Análise Estatística

A apresentação dos resultados obtidos foi feita por meio de gráficos e tabelas, incluindo o uso de medidas descritivas como média, mediana e desvio padrão. As suposições de homogeneidade e normalidade das variáveis envolvidas foram testadas aplicando-se o teste de Bartlett, Shapiro Wilk, Kolmogorov-Smirnov. Para as comparações entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student ou Teste de Mann Whitney. Para as comparações entre diversos grupos, quando observados os pressupostos de normalidade e homogeneidade das médias, foi utilizado o ANOVA, com correção de Teste de Tukey, quando não, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

## 5 RESULTADOS

Foram realizados dois experimentos de alimentação artificial para exposição das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* ao ZIKV. Nestes, foram avaliadas a fecundidade e fertilidade na geração exposta ao ZIKV, bem como os mesmos parâmetros na geração descendente (F1). Foram avaliados ainda, na F1, a busca por fonte sanguínea e taxa de transmissão vertical do ZIKV.

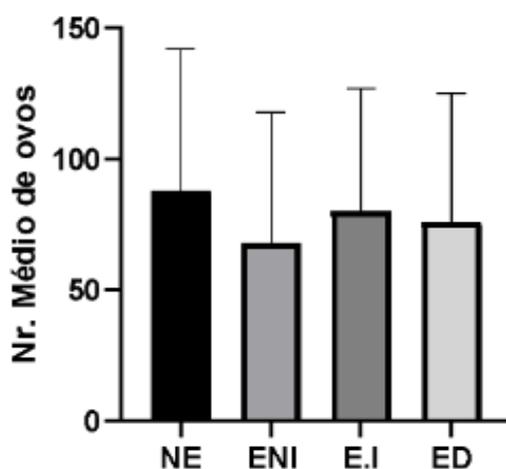
### 5.1 Taxas de infecção e disseminação do vírus Zika em *Cx. quinquefasciatus*

A partir dos resultados das análises moleculares, as amostras individuais de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* utilizadas nos experimentos foram divididas em quatro grupos a serem avaliados e comparados de acordo com os seguintes critérios: fêmeas que não foram expostas ao ZIKV – grupo controle ou Não Exposto (NE); fêmeas que foram expostas ao ZIKV, mas não foram infectadas - grupo Exposto Não Infectado (ENI); fêmeas que foram expostas ao ZIKV e foram infectadas - grupo Exposto e Infectado (EI); e fêmeas que foram expostas ao ZIKV, que foram infectadas, com disseminação viral – grupo Exposto Disseminado (ED). Foi obtida uma Taxa de Infecção de 77,32%, ou seja taxa dos intestinos positivos divididos pelo total de fêmeas expostas, N=97 (Ct médio = 36,308) e Taxa de Disseminação de 25,33%, ou seja taxa do número de cabeças positivas pelo número de intestinos positivos.

### 5.2 Fecundidade e Fertilidade das fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* expostas ao ZIKV – geração parental

Os resultados obtidos com relação à fecundidade (número médio de ovos) da geração parental, mostraram não haver diferença significativa entre os quatro grupos avaliados ( $p = 0,22$ ). Embora não apresentando diferenças significativas estatisticamente, observou-se que as fêmeas classificadas nos grupos ENI e ED apresentaram leve redução no número médio de ovos postos (68,00 ovos e 75,90 ovos, respectivamente) em relação ao grupo não exposto (NE) com média de 87,88 ovos (Figura 8, Tabela 2).

**Figura 8** - Número médio de ovos postos no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* expostas ao vírus Zika (ZIKV), em duas repetições.



Fonte: A autora, 2024. Legenda: Não exposto (NE), Exposto Não Infectado (ENI), Exposto Infectado (EI) e Exposto Disseminado (ED)

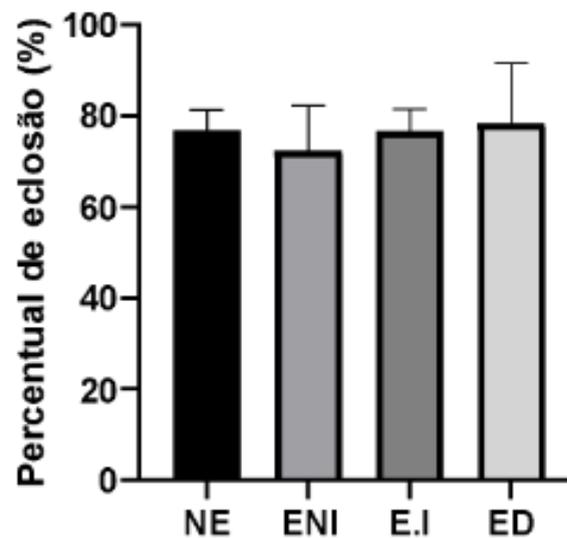
**Tabela 2** - Número médio e mediano de ovos obtidos no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* expostas ao vírus Zika (ZIKV).

Grupos	Fecundidade (n.º de ovos)		
	Média	Mediana	Desvio Padrão
NE	87,88	106	54,48
ENI	68,00	92,00	49,98
EI	80,21	95,00	47,07
ED	75,90	98,00	49,25

Fonte: A autora, 2024. Legenda: : Não exposto (NE), Exposto Não Infectado (ENI), Exposto Infectado (EI) e Exposto Disseminado (ED)

O percentual de eclosão das larvas no primeiro ciclo gonadotrófico, fertilidade, também não foi diferente entre os quatro grupos avaliados,  $p=0,98$  (Figura 9, Tabela 3).

**Figura 9** - Percentual médio de eclosão de larvas (fertilidade) no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* expostas ao vírus Zika (ZIKV).



Fonte: A autora, 2024. Legenda: : Não exposto (NE), Exposto Não Infectado (ENI), Exposto Infectado (EI) e Exposto Disseminado (ED)

**Tabela 3** - Percentual médio e mediano de eclosão de larvas (fertilidade), no primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* expostas ao vírus Zika (ZIKV).

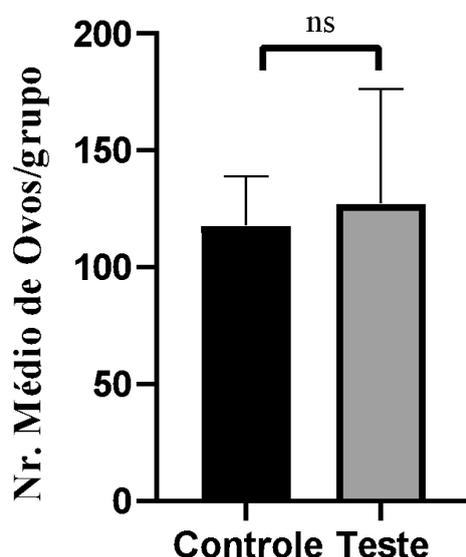
Grupos	Fertilidade (taxa de eclosão) %		
	Média	Mediana	Desvio Padrão
NE	67,69	67,49	26,14
ENI	64,70	64,70	68,03
EI	75,38	76,69	14,55
ED	79,80	78,57	10,95

Fonte: A autora, 2024. Legenda: Não exposto (NE), Exposto Não Infectado (ENI), Exposto Infectado (EI) e Exposto Disseminado (ED)

### 5.3 - Fecundidade e fertilidade na geração descendente de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* expostas ao ZIKV – geração F1

Os resultados obtidos com relação à fecundidade (número médio de ovos) da geração F1, mostraram não haver diferença significativa entre os dois grupos avaliados ( $p = 0,41$ ). Embora não apresentando diferenças significativas estatisticamente, observou-se que as fêmeas classificadas do grupo Teste apresentaram discreto aumento no número médio de ovos postos (127,46) em relação ao grupo controle (117,87) (Figura 10, Tabela 4).

**Figura 10** - Número médio de ovos (fecundidade), no primeiro ciclo gonadotrófico de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus Zika (ZIKV).



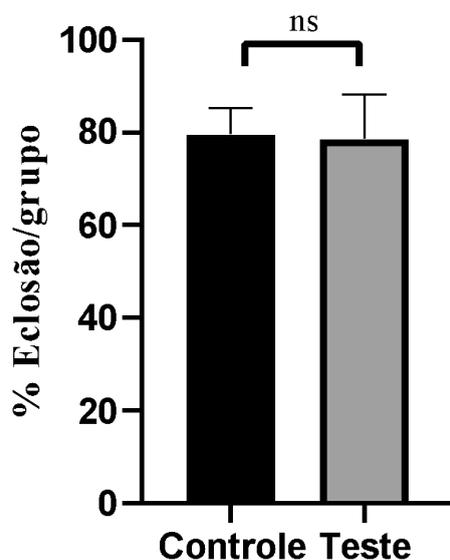
Legenda: ns= não significativo

**Tabela 4** - Número médio e mediano de ovos (fecundidade), no primeiro ciclo gonadotrófico de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus ZIKV.

Grupos	Número de grupos avaliados (N)	Fecundidade (n.º de ovos)		
		Média	Mediana	Desvio Padrão
Controle	6	117,87	118,18	21,33
Teste	8	127,46	143,43	48,97

O percentual de eclosão das larvas no primeiro ciclo gonadotrófico, fertilidade, entre os descendentes (F1), também não foi diferente entre os dois grupos avaliados ( $p=0,95$ ) (Figura 11 e Tabela 5)

**Figura 11** - Número médio de larvas que eclodiram (fertilidade) no primeiro ciclo gonadotrófico de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus Zika (ZIKV).



Legenda: ns= não significativo

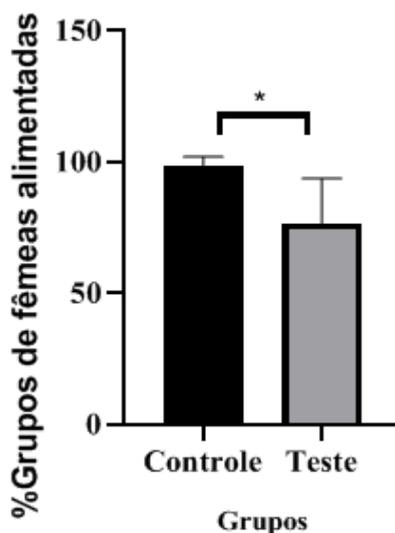
**Tabela 5** - Percentual médio e mediano de larvas que eclodiram (fertilidade) no primeiro ciclo gonadotrófico de *Cx. quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus Zika.

Grupos	Fertilidade (n.º de larvas que eclodiram)			
	Número de grupos avaliados (N)	Média	Mediana	Desvio Padrão
Controle	6	79,58	77,97	5,74
Teste	8	78,66	80,95	9,74

#### 5.4 – Busca por fonte sanguínea na geração F1 de *Culex quinquefasciatus*

Com relação à busca por fonte sanguínea, verificou-se que o percentual de indivíduos que se alimentou nos primeiros 30 minutos de exposição ao sangue de coelho desfibrinado, em alimentador artificial, reduziu significativamente ( $p < 0,0117$ ) entre os descendentes (geração F1) de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* expostas ao ZIKV (Figura 12 e Tabela 6).

**Figura 12** - Percentual de indivíduos de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao vírus Zika (ZIKV), que realizaram a busca por fonte sanguínea, em alimentador artificial, com sangue livre de partículas virais.



Legenda: \* $p < 0,0117$

**Tabela 6** - Percentual de indivíduos de *Culex quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao ZIKV, que realizaram a busca por fonte sanguínea, em alimentador artificial, com sangue livre de partículas virais.

Grupos	Busca por fonte sanguínea		
	N	Nº de fêmeas alimentadas	%
Controle	6	84	98,67%
Teste	9	85	68%

Fonte: A autora, 2024. Legenda: N = número de grupos analisados.

### 5.5 – Taxa de transmissão transovariana do vírus Zika na geração F1

Com relação à taxa de transmissão vertical, nossos resultados mostraram que o percentual de *pools* de mosquitos que foi positivo para o vírus Zika foi de 20,95%. Essa taxa foi calculada dividindo-se o número de *pools* positivos (31) pelo número de *pools* avaliados (148) (Tabela 6).

Foi possível relacionar cada *pool* de mosquitos descendentes à condição de infecção da fêmea parental, uma vez que as larvas de F1 foram colocadas transferidas para cubas identificadas a respeito de qual fêmea havia depositado sua progênie. Desse modo, observou-se que dos 31 *pools* positivos para transmissão vertical, 77,45% são descendentes das fêmeas com o “status” de Exposto Infectado, 16,13% Exposto Disseminado e 6,45% Exposto Não Infectado. Também foi possível relacionar cada *pool* de mosquitos com o sexo, pois foram separados em machos e fêmeas. Entre os *pools* positivos, 64,52% eram de fêmeas e 35,48% de machos (Tabela 7).

**Tabela 7-** Percentual de *pools* de 2 a 5 indivíduos de *Cx. quinquefasciatus* descendentes (geração F1) de fêmeas expostas ao ZIKV, que estavam positivos para o vírus Zika separados por sexo e condição de infecção.

	Transmissão Vertical (Pools)	
	Positivos (n)	Porcentagem
<b>Número de pools positivos</b>		
Fêmeas	20	64,52%
Machos	11	35,48%
Total	31	-
<b>Número de pools positivos por condição de infecção</b>		
EI	24	77,42%
ED	5	16,13%
ENI	2	6,45%
Total	31	-

Legenda:EI: Exposto Infectado. ED: Exposto Disseminado, ENI: Exposto Não Infectado.

## 6 DISCUSSÃO

Reduzir o contato entre hospedeiro e vetor, até o momento, é a única maneira disponível para controlar a circulação do vírus Zika (ZIKV), arbovírus reemergente, de grande importância para saúde pública, especialmente no Brasil. O processo de transmissão desse arbovírus é extremamente dinâmico, condição resultante da alta adaptabilidade das espécies vetoras, em diferentes ambientes e a diferentes linhagens de arbovírus (FREIRE *et al.*, 2015). Essa plasticidade confere grande desafio para os gestores em saúde, que precisam contar com o conhecimento científico, que possa dar suporte à elaboração de estratégias de controle. Esse conhecimento inclui, sobretudo, a identificação das espécies envolvidas e sua capacidade vetorial (AYRES, 2016).

Este trabalho investigou o impacto da exposição ao ZIKV, em fêmeas da espécie *Cx. quinquefasciatus* e em seus descendentes, avaliando parâmetros da capacidade reprodutiva (fecundidade e fertilidade) e busca por fonte sanguínea, aspectos importantes, diretamente relacionados à capacidade vetorial de uma espécie para transmitir um patógeno. Estudos demonstram que a infecção de mosquitos por arbovírus pode alterar esses aspectos e impactar no seu potencial de transmissão (CRESPO *et al.*, 2023; PADILHA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2018; STYER; MEOLA; KRAMER, 2007; SYLVESTRE; GANDINI; MACIEL-DEFREITAS, 2013).

Importante ressaltar que, conforme relatado por Crespo *et al.* (2023), para a realização da exposição oral ao vírus, é necessário que o sangue a ser ingerido seja misturado com células infectadas ou não infectadas com o ZIKV. Neste trabalho, essa mistura ocorreu na proporção de 1:1. Ressalta-se que essa diluição do sangue com cultivo celular, com ou sem o ZIKV, pode ter reduzido o número de ovos postos, independentemente da infecção (CRESPO *et al.*, 2023). Isso pode explicar o menor número médio de ovos postos observado na geração parental, que ingeriu a mistura com cultivo, com relação à F1, que ingeriu sangue puro, sem cultivo celular.

Os resultados aqui apresentados mostram que a fecundidade e fertilidade das fêmeas expostas ao ZIKV, avaliadas no primeiro ciclo gonadotrófico, não foram alteradas pela exposição. Do mesmo modo, a exposição ao vírus não alterou a fecundidade e fertilidade entre as fêmeas da geração F1. De um modo geral, esses resultados divergem dos encontrados na maioria dos poucos estudos que se propuseram a avaliar esses mesmos parâmetros, com outras espécies dos gêneros *Culex* e *Aedes* expostas a arbovírus, em laboratório, o que pode estar relacionado com as espécies e linhagens dos vetores e arbovírus avaliados (PADILHA *et al.*,

2018; SILVEIRA et al., 2018; STYER; MEOLA; KRAMER, 2007; SYLVESTRE; GANDINI; MACIEL-DEFREITAS, 2013).

Em estudo publicado em 2007, fêmeas de *Cx. tarsalis* foram infectadas com o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e a infecção afetou negativamente a fecundidade, pois os mosquitos infectados colocaram um número de ovos significativamente menor, em relação aos não infectados (STYER, MEOLA; KRAMER, 2007). No mesmo estudo, a infecção pelo WNV diminuiu cerca de 20% a taxa de eclosão dos ovos de fêmeas de *Cx. tarsalis* infectadas, em relação àquelas não infectadas pelo vírus (STYER, MEOLA; KRAMER, 2007). Por outro lado, em experimentos realizados com fêmeas de *Ae. aegypti* de laboratório, infectadas com ZIKV ou chikungunya (CHIKV), Resck et al (2020) não encontraram alteração na fecundidade das fêmeas (RESCK et al. 2020). Os mesmos autores relataram ainda haver impacto do CHIKV sobre viabilidade dos ovos das fêmeas infectadas, apontando para fatores como especificidade vírus-vetor, carga viral e perfil de disseminação do vírus, o que torna a compreensão dos processos de transmissão extremamente difícil (CIOTA et al., 2017).

Diferente do encontrado neste trabalho com *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab), Petersen et al. (2018) verificaram que a infecção por ZIKV reduziu a significativamente a fecundidade de uma linhagem de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro. Utilizando a mesma cepa viral e outras linhagens de *Ae. aegypti*, Padilha et al. (2018) não verificaram impacto do ZIKV sobre a fecundidade e fertilidade. Crespo et al. (2023) relataram haver impacto desse arbovírus sobre a fertilidade de *Ae. aegypti*, mas não em *Cx. quinquefasciatus*. Ressalta-se que, nos três estudos aqui citados, a cepa do vírus foi a mesma (ZIKV/H. sapiens/Brazil/PE243/201), porém, os mosquitos foram de origens diferentes (Rio de Janeiro, Recife e Polinésia Francesa, respectivamente) (CRESPO et al., 2023; PADILHA et al., 2018; PETERSEN et al., 2018). Mais uma vez, as diferenças aqui relatadas podem remeter ao grau de especificidade que há entre cepas virais e linhagens de mosquitos de regiões geográficas diferentes, o que pode determinar o quanto uma espécie pode ser mais ou menos capaz para transmitir determinado vírus (ALTO et al., 2020).

Aqui, demonstramos que parâmetros importantes da capacidade reprodutiva de *Cx. quinquefasciatus*, colônia de laboratório (CqSLab), não foram afetados pela infecção com o ZIKV, mesmo entre as fêmeas onde houve disseminação. Segundo Li et al. (2017), o ZIKV chega aos ovários de *Ae. aegypti* já no segundo dia pós infecção e, surpreendentemente, parece não afetar a produção de ovos na espécie e linhagem estudadas. Nesse contexto, Zink et al. (2015), estudando a interação do WNV com *Cx. pipiens*, sugeriram que a associação do

vírus à regulação de vias imunes pode desencadear vantagens decorrentes do sucesso da interação vetor-parasito. Relataram ainda ter encontrado bactérias de muitos gêneros na microbiota de fêmeas expostas ao WNV, em quantidade superior aos encontrados no intestino das não expostas, independentemente de ter ocorrido a infecção, sugerindo haver interação desses microrganismos com o arbovírus, o que pode conferir melhor desempenho biológico ao vetor (ZINK et al., 2015).

Segundo Ciota et al. (2013), o custo biológico, por sua vez, decorre do processo adaptativo, que desencadeia alta replicação viral e maior ativação do sistema imunológico. Essa resposta imune do hospedeiro invertebrado modula e determina o desenvolvimento da infecção. Esses pesquisadores utilizaram uma cepa de WNV, a qual já estava em processo de adaptação à colônia de *Cx. pipiens* de laboratório, por sucessivas exposições, e verificaram diminuição na sobrevivência das fêmeas expostas, mesmo entre as que não desenvolveram a infecção. Porém, quando se utilizou a cepa de WNV selvagem, em experimentos de exposição com a mesma colônia de laboratório, esse impacto não ocorreu (CIOTA et al., 2013). Isso pode explicar os resultados aqui encontrados, com relação aos parâmetros da capacidade reprodutiva, os quais não foram alterados, nas duas gerações avaliadas, ambas no primeiro ciclo gonadotrófico.

Nas avaliações de busca por fonte sanguínea, os resultados aqui obtidos mostraram uma redução significativa, de aproximadamente 30%, nas descendentes de fêmeas expostas ao ZIKV, com 68% das fêmeas alimentadas, em relação ao grupo controle (não exposto) onde o percentual foi de 98,67%. Até o momento, não há disponível na literatura qualquer estudo que tenha avaliado esses parâmetros da capacidade vetorial em descendentes de fêmeas de mosquitos expostas a arbovírus. Desse modo, resguardando o fato de que esta análise foi feita com indivíduos de uma geração subsequente à exposição ao ZIKV, com cautela, discutimos com os resultados encontrados por Styer, Meola e Kramer (2007). Esses autores relataram ter observado aumento na alimentação sanguínea de fêmeas de *Cx. tarsalis* que foram infectadas com vírus do Oeste do Nilo (WNV), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (STYER, MEOLA; KRAMER, 2007).

Adicionalmente, Jackson, Brewster e Paulson (2012), mostraram que a infecção de fêmeas de *Ae. triseriatus* e *Ae. albopictus* pelo vírus La Crosse, não alterou o seu estado de alimentação sanguínea (JACKSON, BREWSTER, PAULSON; 2012). Do mesmo modo, Crespo et al, estudando a mesma colônia aqui avaliada (CqSLab), não encontraram efeito da infecção por ZIKV na busca por fonte sanguínea de mosquitos expostos (CRESPO et al.,

2023). Aqui, embora tenha havido redução na busca por fonte sanguínea, na geração F1, é provável que isso não implique na redução de sua capacidade vetorial para transmissão, já que é uma espécie altamente abundante e antropofílica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O desenvolvimento de investigações mais robustas com relação a esse parâmetro, incluindo quantidade de sangue ingerida e taxa de picada, por exemplos, são necessárias, para uma melhor estimativa de impacto sobre a capacidade vetorial.

Avaliar a geração descendente das fêmeas expostas ao ZIKV foi um objetivo que se baseou no processo de transmissão transovariana, já relatado em estudos anteriores (LAI *et al.*, 2020; (PHUMEE *et al.*, 2019). A hipótese de que o processo adaptativo possa acumular custo biológico ao longo das gerações, conforme colocado por Ciota *et al.* (2013), é outra que aponta para esse custo biológico acumulado sobre o hospedeiro invertebrado. Ainda não é possível afirmar que esse processo já possa ter se manifestado em apenas uma geração seguinte à exposição e sem reexposição, porém, sobretudo com relação à busca por fonte sanguínea, a exposição contínua a uma mesma cepa viral, por várias gerações, bem como a avaliação do custo biológico nos demais ciclos gonadotróficos, são um caminho a ser seguido, na perspectiva de compreensão desse complexo processo de interação vetor parasito.

Em relação às avaliações de transmissão vertical, encontrou-se uma taxa de transmissão de 20,95% (31 *pools* positivos/148 analisados). Esses resultados corroboram com Phumee *et al.* (2019), que apontaram para o potencial *Cx. quinquefasciatus* da Tailândia para transmitir o ZIKV, já que detectaram RNA do ZIKV até a geração F6, em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, verificando maior taxa de infecção pelo ZIKV nas primeiras gerações, (29,2% para F1 e 24,2%, para F2). Na geração F7, o RNA do vírus foi indetectável. Entre os machos, o RNA do vírus só foi detectável até a geração F2 (PHUMEE *et al.*, 2019).

Comparando-se os resultados encontrados neste trabalho com estudos desenvolvidos com *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, verifica-se taxas de transmissão vertical maiores em *Cx. quinquefasciatus*. A exemplo, estudo analisou a transmissão do ZIKV em fêmeas de *Ae. albopictus* da cepa Foshan e encontrou que, nessa espécie, as fêmeas podem transmitir o vírus para a geração F1, com taxa de 2,06% entre os ovos e de 1,87%, em mosquitos adultos (LAI *et al.*, 2020). Em outro estudo, desenvolvido na Flórida, foram realizados dois experimentos, onde os mosquitos da geração parental ingeriram uma alimentação de sangue infeccioso, com 7 log 10 PFU/mL e obtiveram taxas de infecção vertical de 3,2%, para *Ae. aegypti*, e de 0%, para *Ae. albopictus*. No segundo experimento, as taxas foram de 1,1%, em *Ae. aegypti* e 0,3%, em *Ae. albopictus*, com 6 log 10 PFU/mL de sangue infectado com ZIKV. (ZIMLER; ALTO

*et al.*, 2023). Neste trabalho, obtivemos concentrações do vírus semelhantes, de  $9 \times 10^6$  e  $1,5 \times 10^5$  PFU/ml, respectivamente em ambos os experimentos.

Podemos sugerir que os resultados encontrados com relação à transmissão vertical são forte indício da participação de *Cx. quinquefasciatus* na transmissão do ZIKV, pela possível contribuição desta espécie para a manutenção desse arbovírus na natureza e, sobretudo, por serem as fêmeas a maioria dos indivíduos infectados. Ainda assim, não sabemos qual o real papel das gerações subsequentes no processo de transmissão, sendo necessário seguir com as investigações para avaliação da capacidade desses descendentes para transmitir o ZIKV.

Em síntese, nas condições e com as linhagens aqui avaliadas, foi possível inferir sobre o potencial da espécie *Cx. quinquefasciatus* para transmitir o ZIKV, considerando que a interação com esse arbovírus não altera sua capacidade reprodutiva. Importante ressaltar a necessidade de realizar mais experimentos, para confirmar estes resultados. Sem dúvidas, não é possível extrapolar para condições de campo, porém, essa linha de investigação, que avalia aspectos da capacidade vetorial, abre caminho para elucidação de aspectos importantes da interação vetor-patógeno.

## 7 CONCLUSÕES

- a. A exposição de *Cx. quinquefasciatus* ao ZIKV não alterou a fecundidade e fertilidade das fêmeas expostas, como também entre aquelas da geração subsequente (geração F1);
- b. A exposição de *Cx. quinquefasciatus* ao ZIKV não influenciou na busca por fonte sanguínea entre as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* expostas, mas reduziu esse parâmetro entre os indivíduos descendentes (F1);
- c. O ZIKV é transmitido verticalmente em *Cx. quinquefasciatus* e as fêmeas se mostraram maioria entre os descendentes infectados.

**REFERÊNCIAS**

- ABUSHOUK, A. I.; NEGIDA, A.; AHMED, H. An updated review of Zika virus. *Journal of Clinical Virology*, v. 84, 1 dez. 2016.
- AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P. K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Reviews in Medical Virology*, 30 ago. 2017.
- AGUMADU, V. C.; RAMPHUL, K. Zika Virus: A Review of Literature. *Cureus*, v. 10, n. 7, p. e3025, 22 jul. 2018.
- ALTO, B. W.; CIVANA, A.; WIGGINS, K.; EASTMOND, B.; SHIN, D. Effect of Oral Infection of Mayaro Virus on Fitness Correlates and Expression of Immune Related Genes in *Aedes aegypti*. *Viruses*, v. 12, n. 7, p. 719, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v12070719>
- AYRES, C. F. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. *The Lancet Infectious Diseases*, New York, v. 16, n. 3, p. 278-279, Mar. 2016.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, Informe epidemiológico n. 25, 2016b.
- BRASIL. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. 80 p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Com previsão de aumento de casos, Ministério coordena ações de enfrentamento das arboviroses. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/dezembro/com-previsao-de-aumento-d-e-casos-ministerio-coordena-aco-es-de-enfrentamento-das-arboviroses>. Acesso em: 02 mar. 2024.
- BRASIL, P.; SEQUEIRA, P. C.; FREITAS, A. D.; ZOGBI, H. E.; CALVET, G. A.; SOUZA, R. V. de; SIQUEIRA, A. M.; MENDONÇA, M. C. L.; NOGUEIRA, R. M. R.; FILIPPIS, A. M. B. de; SOLOMON, T. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *The Lancet*, [S.l.], v. 387, n. 10026, p. 1482, 2016. ISSN 0140-6736. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30058-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673616300587>. Acesso em: 02 mar. 2024.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5).
- CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D. Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*, New York, v. 384, n. 9954, p. 1571-1572, nov. 2014.
- CENTROS DOS EUA PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). Centro Nacional para Doenças Infecciosas Zoonóticas e Emergentes (NCEZID), Divisão de Doenças

Transmitidas por Vetores (DVBD). Vírus Zika. Disponível em: <http://www.cdc.gov/zika>. Acesso em: 31 jan. 2024.

CIOTA, A. T. et al. Effects of Zika Virus Strain and Aedes Mosquito Species on Vector Competence. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 7, p. 1110-1117, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2307.161633>

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p.

CRESPO, M. et al. Exposure to Zika and chikungunya viruses impacts aspects of the vectorial capacity of Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. *bioRxiv*, v. 2023, n. 02.13.526953, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2023.02.13.526953>.

DAHIYA, N. et al. Zika virus vertical transmission in mosquitoes: A less understood mechanism. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 59, n. 1, p. 37-44, jan.-mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0972-9062.331411>.

DECKARD, D. T. et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 14, p. 372-374, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6514a3>.

DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 10, p. e0005048, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005048>.

DU, S. et al. Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nature Communications*, v. 10, p. 1324, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09256-0>.

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

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

FORATTINI, O. P. *Entomologia médica*. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. 662 p., v. 1.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 5, p. 880-882, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>.

GIRALDO, M. I.; GONZALEZ-OROZCO, M.; RAJSBAUM, R. Pathogenesis of Zika Virus Infection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 18, p. 181-203, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-034739>.

GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect.*, v. 6, n. 8, e69, 9 ago. 2017. Disponível em: DOI: 10.1038/emi.2017.59.

GUO, X. X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerging Microbes & Infections*, v. 5, p. 1-5, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emi.2016.102>.

HABY, M. M. et al. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 96, n. 6, p. 402-413D, jun. 2018. Disponível em: <https://bit.ly/3Eg1COC>.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. *Emerging infectious diseases*, New York, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, set. 2009.

JACKSON, B. T.; BREWSTER, C. C.; PAULSON, S. L. La Crosse virus infection alters blood-feeding behavior in *Aedes triseriatus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 49, n. 6, p. 1424-1429, nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/me12023>.

KAKDE, U.; KHATIB, M. N. Neurological Complications in Dengue Among Males of the Adult Age Group. *Cureus*, v. 16, n. 1, p. e51586, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.51586>.

KAZMI, S. et al. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, v. 27, 1 dez. 2020.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 138, n. 1-2, p. 123-130, dez. 2006.

KOPPOLU, V.; SHANTHA RAJU, T. Zika virus outbreak: a review of neurological complications, diagnosis, and treatment options. *Journal of NeuroVirology*, v. 24, p. 255-272, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13365-018-0614-8>.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, ago. 2008.

LAU, M. J.; ROSS, P. A.; HOFFMANN, A. A. Infertility and fecundity loss of *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* hatched from quiescent eggs is expected to alter invasion dynamics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 2, p. e0009179, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009179>.

LAI, Z. et al. Vertical transmission of zika virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 14, n. 10, e0008776, 15 out. 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008776.

- LI, C.-X. et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerging Microbes & Infections*, v. 6, n. 4, p. 1-8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emi.2017.12>
- LUSTIG, Y. et al. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. *Euro Surveillance*, v. 21, n. 26, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30269>.
- MAGNUS, M. M. et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 40, n. 3, p. 250-254, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.01.011>.
- MANUEL, M.; MISSÉ, D.; POMPON, J. Highly Efficient Vertical Transmission for Zika Virus in *Aedes aegypti* after Long Extrinsic Incubation Time. *Pathogens*, v. 9, n. 5, p. 366, maio 2020.
- MATTINGLY, P. F. The urban mosquito hazard today. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 29, Suppl, p. 135-139, 1963.
- MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, New York, v. 21, n. 10, p. 1887, out. 2015.
- MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 2, p. 359-361, fev. 2015. doi: 10.3201/eid2102.141363. Erratum in: *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 552, mar. 2015. PMID: 25625872; PMCID: PMC4313657.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, Stockholm, v. 19, n. 9, p. 20720, mar. 2014.
- OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Infecção intrauterina pelo vírus Zika causa anomalia cerebral fetal e microcefalia: ponta do iceberg? 05 de janeiro de 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/uog.15831>.
- OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Infecção intrauterina pelo vírus Zika causa anomalia cerebral fetal e microcefalia: ponta do iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 47, n. 1, p. 6-7, jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/uog.15831>.
- OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, v. 75, n. 3, p. 389-393, jan. 1981.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Plano Estratégico de Resposta ao Zika - revisado para julho de 2016 a dezembro de 2017. Genebra: OMS, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>. Acesso em: 25 fev. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Vírus Zika: Ficha informativa (Dezembro de 2022). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>. Acesso em: 25 fev. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Vírus Zika: Ficha informativa (Dezembro de 2022). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>. Acesso em: 31 jan. 2024.

PADILHA, K. P. et al. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro*, v. 113, n. 10, p. 1-6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170348>

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

PHUMEE, A. et al. Vertical transmission of Zika virus in *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. *Scientific Reports*, v. 9, p. 5257, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41727-8>.

PINEDA, C. et al. Chikungunya in the region of the Americas. A challenge for rheumatologists and healthcare systems. *Clinical Rheumatology*, v. 35, n. 10, p. 2381-2385, out. 2016.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. Vírus Zika: Revisão para Clínicos. *Acta Médica Portuguesa*, v. 28, n. 6, p. 760, 3 dez. 2015.

RESCK, M. E. B. et al. Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

RIOS, F. G. F. et al. Arbovirus detection in synanthropic mosquitoes from the Brazilian Amazon and in mosquito saliva using Flinders Technology Associates cards. *Microbes and Infection*, v. 25, n. 3, p. 105046, mar.-abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.105046>.

SAXENA, S. K. et al. Surto do vírus Zika: uma visão geral da terapêutica e tratamento experimental. *VirusDisease*, v. 27, p. 111–115, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13337-016-0307-y>.

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

SILVEIRA, I. D. et al. Reduction on *Aedes aegypti* lifespan but no effects on mosquito fecundity and oviposition success. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1-8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02964>

- SONG, B. H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, v. 308, p. 50-64, jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>.
- SMOOTS, A. N. et al. Population-Based Surveillance for Birth Defects Potentially Related to Zika Virus Infection - 22 States and Territories, January 2016-June 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 69, n. 3, p. 67-71, jan. 2020. DOI: 10.15585/mmwr.mm6903a3. PMID: 31971935; PMCID: PMC7367037.
- SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058607>
- YE, G. et al. Transmission competence of a new mesonivirus, Yichangvirus, in mosquitoes and its interference with representative flaviviruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 11, p. e0008920, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008920>.
- ZINK, S. D. et al. Exposure to West Nile virus increases bacterial diversity and immune gene expression in *Culex pipiens*. *Viruses*, Basel, v. 7, n. 10, p. 5619-5631, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v7102883>