

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Transmissão vertical de arbovírus em populações de
campo de *Aedes aegypti* da cidade de Laranjeiras, Sergipe,
Brasil**

BELGRANO SANTIAGO DOS SANTOS REKOWSKY

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2017

BELGRANO SANTIAGO DOS SANTOS REKOWSKY

Transmissão vertical de arbovírus em populações de campo de *Aedes aegypti* da cidade de Laranjeiras, Sergipe, Brasil

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseli La Corte dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Roseli La Corte pela orientação, disposição para ajudar na resolução de contratempos e elucidação de dúvidas no decorrer deste trabalho.

Agradeço às professoras Luciene Barbosa e Sona Jain pela participação na banca e compreensão em relação aos prazos apertados.

Agradeço ao professor Silvio Dolabella pelos conselhos e auxílio nos experimentos.

Agradeço à professora Luciane Storti e equipe pelo apoio e acesso ao GMBio para realização dos experimentos.

Agradeço à equipe LEPaT, Lab Boys e Lab Girls, por todo o apoio e momentos de descontração.

Agradeço aos meus amigos do curso, que acompanharam essa jornada, por compartilharem sugestões e contribuições para este trabalho.

Finalmente, agradeço à minha família pela base que me foi propiciada, apoio incondicional e compreensão quanto as dificuldades enfrentadas no período de graduação.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão de diversos arbovírus como os vírus da dengue (DENV), zika (ZIKV), chikungunya e febre amarela. Estas doenças registram milhões de casos notificados anualmente no mundo todo. Devido a sua área de ocorrência, estima-se que mais de um terço da população mundial está passível de contato com este mosquito. A fêmea de *Ae. aegypti* é capaz de transmitir estes vírus verticalmente para sua prole na natureza, seja após infectar-se através do repasto sanguíneo em hospedeiro portando o vírus, ou mediante infecção artificial em experimentos conduzidos em laboratório. Esse mecanismo de transmissão apresenta significado epidemiológico, considerando a capacidade de resistência à dessecação dos ovos de *Ae. aegypti* e ressalta a importância do controle das formas imaturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência da transmissão vertical dos arbovírus da dengue e zika em populações de *Ae. aegypti* provenientes da cidade de Laranjeiras, Sergipe. Foram instaladas ovitrampas para obtenção de ovos do mosquito e manutenção de colônia em insetário, onde foram criadas duas gerações, para posterior realização de testes moleculares. Após as etapas de extração de RNA e confecção de cDNA, as amostras foram submetidas à PCR, visando a detecção dos arbovírus. Das amostras testadas para os arbovírus nenhuma apresentou resultado positivo para detecção de dengue e zika.

Palavras-chave: dengue, zika, RT-PCR, taxa mínima de infectividade.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	OBJETIVOS.....	10
	2.1. Objetivo Geral	10
	2.2. Objetivo Específicos.....	10
3	METODOLOGIA	11
	3.1. Coletas de campo	11
	3.2. Manutenção da colônia em insetário.....	11
	3.3. Testes moleculares	13
	3.4 Taxa Mínima de Infectividade (TMI).....	16
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	17
5	RESULTADOS	18
6	DISCUSSÃO.....	22
7	CONCLUSÃO.....	24
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, é um inseto díptero que pertence à família Culicidae (RICHARDS, 1960), sendo o principal vetor responsável pela transmissão de diversos arbovírus como o vírus da dengue (DENV), zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febre amarela (YFV). Devido a sua área de ocorrência, estima-se que mais de um terço da população mundial está passível de contato com este mosquito (WHO, 2016). Tendo origem no Velho mundo, atualmente *Ae. aegypti* apresenta distribuição cosmopolita, ocorrendo abundantemente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo sua disseminação ocasionada principalmente de forma passiva pelo homem (FORATTINI, 2002).

Essa espécie se utiliza preferencialmente de recipientes artificiais como criadouros, sejam eles utilizados para armazenamento de água para consumo e uso doméstico ou objetos abandonados pelo homem que venham a acumular água da chuva (MARTEIS et al., 2013). As condições das águas que proporcionam o desenvolvimento das formas juvenis de *Ae. aegypti* são dadas por limpidez, pequena quantidade de matéria orgânica em decomposição, locais sombreados, recipientes de paredes ou fundo escuro e baixa salinidade (CONSOLI, 1994).

As estimativas mundiais para casos de infecção por DENV chegam aos 100 milhões de casos anualmente (BHATT et al., 2013). Atualmente os quatro sorotipos do DENV se encontram em circulação no Brasil, que enfrenta epidemias anuais desde a década de 1990 e é considerado hiperendêmico (VALLE, 2016). No Brasil foram registrados mais 1.487.000 de casos prováveis de infecção por DENV em 2016 (SVS, 2016). As epidemias recentes de infecções por ZIKV que as Américas enfrentam vem ocorrendo desde 2014 (CUNHA, 2016). No ano de 2016 no Brasil, foram registrados mais de 211.000 casos prováveis de febre por ZIKV, dos quais aproximadamente 126.000 (59,7%) casos foram confirmados (SVS, 2016). Por não haver vacina para ZIKV até o presente momento, as medidas de prevenção recomendadas são adoção de proteção individual com roupas longas e repelentes, e intensificação do controle de vetores (MUSSO, 2016).

Arbovírus (do inglês, **Arthropod-Borne Virus**), são vírus que possuem em comum etapas de seu ciclo biológico ocorrendo em artrópode vetores e hospedeiros vertebrados. Os arbovírus que possuem importância médica estão incluídos em cinco famílias: *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (LOPES et al., 2014). Tanto DENV como ZIKV estão incluídos no gênero *Flavivirus*, que pertence à família *Flaviviridae*. Os flavivírus medem entre 40 a 60 nanômetros de diâmetro, possuindo capsídeo proteico envolto por um envelope lipídico onde se encontram as proteínas de membrana. Possuem material genético consistido de RNA de fita simples, com aproximadamente onze mil pares de bases (CHAMBERS et al., 1990; SANTOS et al., 2008).

A transmissão dos arbovírus ocorre após o período de incubação extrínseca, que apresenta duração variada entre os muitos arbovírus (HARDY et al., 1983). Este processo é caracterizado pela ingestão de sangue infectado e multiplicação do vírus no corpo do artrópode vetor até que alcance suas glândulas salivares, podendo ser então transmitido para o hospedeiro vertebrado durante a hematofagia (TJADEN et al., 2013). Trabalhos experimentais demonstram que a duração do período de incubação extrínseca ocorre em torno de 9 dias para DENV (ROHANI et al., 2009) e 14 dias para ZIKV (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

O período de incubação extrínseca está diretamente relacionado as condições ambientais de temperatura encontradas pela fêmea adulta (MEYER et al., 1990), sendo que sua duração apresenta extrema importância epidemiológica em relação à transmissão de arbovírus, em virtude de determinar o tempo necessário para que uma fêmea do mosquito possa sobreviver e ser capaz de infectar outro hospedeiro vertebrado (HARDY et al., 1983). Após ser infectado, o hospedeiro vertebrado passa pelo período de incubação intrínseca, que pode durar de dois dias até mais de uma semana, onde o vírus se multiplica causando viremia. (SHOPE & MEEGAN, 1997).

A eficácia apresentada por *Ae. aegypti* na capacidade de transmissão de diversos arbovírus se deve, além de sua comprovada competência vetorial ligada a características biológicas, ao forte sinantropismo e antropofilismo, sendo a hematofagia realizada no intradomicílio durante o período diurno (NATAL, 2002). Devido à agilidade e comportamento arredo durante o repasto sanguíneo, a fêmea de *Ae. aegypti* consegue escapar facilmente de reações à suas atividades hematofágicas, interrompendo o processo brevemente e retornando a outro ou ao

mesmo hospedeiro para terminar o repasto. Esse comportamento apresenta elevada importância epidemiológica, considerando o potencial de disseminação ocasionado por repastos curtos em diferentes hospedeiros (NEVES, 2005).

Quando ocorre o convívio próximo com humanos, fato comum para esta espécie, fêmeas de *Ae. aegypti* se alimentam exclusivamente de sangue humano (SCOTT et al., 1993), aparentemente utilizando os nutrientes provenientes do repasto sanguíneo tanto para síntese de reservas energéticas quanto para a reprodução com a maturação dos ovos dependentes de proteínas e aminoácidos (NAKSATHIT et al., 1999). Ao restringir sua dieta apenas à sangue humano, aumenta o contato que a fêmea apresenta com diferentes pessoas em seu ambiente, fator que favorece a disseminação dos arbovírus (CANYON et al., 1999).

O mecanismo de manutenção de arbovírus mais conhecido é a transmissão horizontal (MUSSO & GUBLER, 2016), onde o vetor infectado, ao realizar hematofagia, insere sua probóscide no hospedeiro vertebrado e expele o vírus que se encontrava em suas glândulas salivares (WEAVER & REISEN, 2010). A detecção de arbovírus em populações de campo de *Ae. aegypti* se mostrou uma potencial ferramenta para a previsão de epidemias com antecedência, podendo levar à intensificação de medidas de controle de vetores visando reduzir a transmissão dos vírus (CHOW et al., 1998).

Entretanto, a ocorrência de transmissão vertical, onde a prole do vetor já nasce infectada com o vírus é observada para um grande número de arbovírus como os vírus da dengue (MARTINS et al., 2012), zika (THANGAMANI et al., 2016), chikungunya (THAVARA et al., 2009; AGARWAL et al., 2014), febre amarela (FONTENILLE et al., 1997), do nilo ocidental (ANDERSON & MAIN, 2006; NELMS et al., 2013) e encefalite de Saint-Louis (FLORES et al., 2010). Nesta forma de transmissão, o vírus que infectar os ovários do vetor, deve persistir através dos estágios larvários e sobreviver à histólise que ocorre no estágio de pupa para infectar o adulto (HARDY et al., 1983). Esse mecanismo é favorecido pela capacidade de resistência à dessecação apresentada pelos ovos de *Ae. aegypti* após a oviposição (GRUNNILL & BOOTS, 2016).

A fêmea de *Ae. aegypti* é capaz de transmitir DENV verticalmente para sua prole mediante infecção artificial em experimentos laboratoriais com inoculação

intratorácica do vírus nos mosquitos, onde foi observada a passagem do vírus através de múltiplas gerações, com porcentagens de transmissão variando entre 2,8% para as gerações filial 1 e 8,6% para filial 2 e se mantendo constante em torno de 12,1% entre as gerações filial 3 e filial 7 (JOSHI et al., 2002). A transmissão vertical já foi observada na natureza através da detecção de DENV em indivíduos adultos que foram criados a partir de ovos ou formas imaturas coletadas em campo apresentando porcentagens estimadas de transmissão abaixo de 1,8% (GUEDES et al., 2010; LE GOFF et al., 2011; THONGRUNGKIAT et al., 2011; CRUZ et al., 2015).

Em experimentos realizados em laboratório, através de inoculação intratorácica, foram evidenciadas porcentagens de transmissão vertical de ZIKV em *Ae. aegypti* de 0,35% (THANGAMANI et al., 2016). A detecção do ZIKV sendo transmitido verticalmente foi observada ocorrendo naturalmente na natureza (SMART et al., 2017), sendo que em *Ae. aegypti* foi estimada porcentagem de transmissão de 0,18% para o total de indivíduos testados (FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016).

Devido a suas características, apesar de ter sua importância epidemiológica considerada como incerta (KUNO & CHANG, 2005) a transmissão vertical é o mecanismo mais aceito para a manutenção dos arbovírus no ciclo natural durante condições adversas nas quais as densidades populacionais de *Ae. aegypti* se encontrariam reduzidas, como variações climáticas sazonais bruscas ou campanhas de controle de vetores (CLEMENTS, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência da transmissão vertical de DENV e ZIKV em populações de *Ae. aegypti* provenientes da cidade de Laranjeiras, Sergipe.

2.2. Objetivo Específicos

- 1- Avaliar a taxa de infectividade de mosquitos adultos oriundos de ovos coletados em campo, para DENV e ZIKV.
- 2- Identificar os sorotipos de DENV em circulação que estão sendo transmitidos verticalmente.
- 3- Avaliar a persistência da transmissão vertical através das gerações.
- 4- Obter linhagem de mosquitos de campo livres de arbovírus para testes de laboratório.

3 METODOLOGIA

3.1. Coletas de campo

Para realização deste estudo foram realizadas coletas na cidade de Laranjeiras (10° 48' 12" Sul e 37° 10' 11" Oeste), município que possui extensão territorial de aproximadamente 162 Km² e população estimada de 29.400 habitantes (IBGE, 2016). No período entre 2015 e 2016, segundo dados obtidos junto à Secretaria Estadual da Saúde, foram notificados numerosos casos de infecção por DENV e alguns casos de microcefalia em Laranjeiras. Por não estarem realizando diagnóstico diferencial para ZIKV em Sergipe neste mesmo período, não foram notificados casos de infecção por este vírus, porém, em análise posterior as autoridades atribuíram os casos de microcefalia notificados ao ZIKV, evidenciando sua transmissão no município.

Com o objetivo de coletar ovos de *Ae. aegypti*, foram instaladas 90 armadilhas do tipo ovitrampa em residências escolhidas aleatoriamente na área do Centro e bairros contíguos, sendo priorizados locais sombreados e fora do alcance de crianças e animais domésticos. A armadilha do tipo ovitrampa consiste de vaso plástico preto com capacidade aproximada de um litro, com uma palheta de Eucatex de dimensões 15x5 cm em posição vertical fixada com clipe metálico. As ovitrampas foram preenchidas com meio litro de água e deixadas em campo para a oviposição. As armadilhas foram recolhidas na semana seguinte à instalação e levadas ao Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEPaT) do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe.

3.2. Manutenção da colônia em insetário

As palhetas ficaram armazenadas em temperatura ambiente para que secassem e posteriormente foi realizada a leitura para contagem dos ovos utilizando microscópio estereoscópico. Para análise das palhetas recuperadas foram utilizados o Índice de Positividade de Ovitrampa (IPO) e Índice de Densidade de Ovos (IDO) de acordo com MIYAZAKI et al., (2009).

Esses índices são representados pelas fórmulas:

$$\text{IPO} = \frac{\text{NAP}}{\text{NAE}} \times 100 \qquad \text{IDO} = \frac{\text{NO}}{\text{NAP}}$$

Onde, NAP é o número de armadilhas positivas, NAE é o número de armadilhas examinadas e NO é o número de ovos.

No insetário, a manutenção da colônia de *Ae. aegypti* ocorreu sob condições controladas de temperatura ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($65\% \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas. As palhetas foram selecionadas de acordo com o número de ovos presentes para que totalizassem aproximadamente mil ovos e, foram então imersas em água destilada em bandejas plásticas de dimensões 42x35x9 cm para que houvesse a eclosão dos ovos. As larvas foram alimentadas diariamente com ração para peixe Tetra Marine Granules®, durante os quatro estágios larvais, até atingirem a fase de pupa.

Durante a fase de pupa, os mosquitos da geração parental (P) foram retirados da bandeja e realocados para duas gaiolas estoques de dimensões 30x30x30 cm. Posteriormente foi realizada a triagem dos mosquitos adultos das gaiolas estoques, sendo os indivíduos identificados para espécie e sexo e realocados para as gaiolas definitivas em grupos de 100 mosquitos, na proporção de 50 machos e 50 fêmeas. Indivíduos de outras espécies foram retirados das gaiolas estoques e mantidos em gaiola separada para posterior descarte. Nas gaiolas definitivas foram mantidas refeições açucaradas, preparadas em tubo *erlenmeyer* com uma bola de algodão hidrofílico envolta em gaze com a extremidade imersa em solução de água destilada e 10% de açúcar refinado, e realizados esporadicamente repastos sanguíneos.

Os ciclos de repasto sanguíneo objetivando a oviposição das fêmeas e obtenção de ovos da primeira geração filial (F1) foram realizados três vezes por semana nas gaiolas da geração P através de alimentadores artificiais (adaptados de COSTA-DA-SILVA et al., 2013). Os alimentadores artificiais consistiram de tubos *falcon* preenchidos com glicerol aquecido a 60°C e revestidos com saco plástico fixado por bandas de elástico. As tampas dos tubos foram recortadas circularmente e revestidas com membrana Parafilm M®, onde foram depositados 1,5 a 2 mL de sangue aquecido em banho-maria a 37°C . Os tubos com glicerol foram acoplados as

tampas com sangue e os conjuntos posicionados sobre as gaiolas por 30 minutos. O sangue utilizado foi de origem comercial ou proveniente de ovelhas do sexo masculino da raça Santa Inês criados no Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Imediatamente após o repasto foram inseridos nas gaiolas sítios de oviposição, que consistiram de recortes circulares de papel filtro dobrados em formato de cones e inseridos em copos plásticos descartáveis de 50 mL e preenchidos até a metade com água destilada.

Os sítios de oviposição foram mantidos até o repasto seguinte, quando novos sítios foram inseridos nas gaiolas. Os papéis filtros contendo ovos foram retirados dos sítios e estocados em temperatura ambiente para secagem e posteriormente contagem dos ovos.

Os ovos provenientes da geração P foram imersos em água destilada para eclosão e as larvas criadas até indivíduos adultos, da maneira descrita acima. A eclosão dos ovos foi realizada em bandejas separadas de acordo com as gaiolas da geração P, dando origem a geração F1 correspondente. Os indivíduos da geração F1, foram transferidos para gaiolas respeitando a mesma proporção de sexo, através da sexagem de pupas por tamanho, e quando adultos receberam a mesma alimentação com refeições consistindo de solução de água destilada com 10% de açúcar refinado e repastos sanguíneos.

3.3. Testes moleculares

Para realização dos testes moleculares, após os ciclos de repasto sanguíneo, os mosquitos de cada gaiola foram aspirados e levados ao congelador e após 5 minutos foram retirados para separação dos mosquitos em *pools* de aproximadamente 25 indivíduos, separados em machos e fêmeas e acondicionados em tubos *ependorf* esterilizados de 1,5 ml. As perdas de mosquitos por morte foram contabilizadas quanto ao sexo e consideradas na hora da formação dos *pools*. Os tubos *ependorf* foram mantidos em *freezer* -80°C até a extração.

Os mosquitos separados em tubos *ependorf* de 1.5 mL foram suspensos em 300 µL de solução tampão fosfato salino (PBS) com pH = 7,4 e macerados utilizando

pistilos plásticos esterilizados por 20 segundos. Seguido de uma etapa de centrifugação a 5.600 rotações por minuto por 30 minutos, foram retirados 200 μL do sobrenadante e transferidos para um tubo *ependorf* de 1,5 mL novo e esterilizado. A etapa de extração de RNA foi realizada utilizando o kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit, sendo seguido o protocolo do fabricante. Após a extração, o RNA teve sua pureza e concentração determinados através da utilização de espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer e quando necessário, diluído para a concentração máxima de 100 ng/ μL para realizar a transcrição em DNA complementar (cDNA). O cDNA foi confeccionado através de transcrição reversa, utilizando o kit Applied Biosystems™ High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante, produzindo reações de 20 μL . As temperaturas usadas para a reação foram: 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos.

Para verificar o êxito da extração do RNA e confecção do cDNA, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) utilizando *primers* para detecção de mutações no gene de canal de sódio dependente de voltagem (KDR), presente em *Ae. aegypti* (DOLABELLA et al., 2016). Foram obtidas reações com volume final de 25 μL , contendo para cada reação: 5 μL de 2x PCR Buffer, deoxinucleotídeo trifosfatos (dNTP) a concentração de 200 μM , primer comum a concentração de 0,3 μM , e cada primer específico a concentração de 0,15 μM , Cloreto de Magnésio (MgCl_2) a concentração de 1,5 mM, Taq Polimerase a concentração de 1 U, e 2,5 μL de cDNA, sendo o volume final da reação completado com 13,2 μL de água Milli-q autoclavada. As temperaturas utilizadas para a reação foram: 5 minutos a 95 °C para desnaturação inicial, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C para desnaturação, 40 segundos a 60 °C para anelamento, 45 segundos a 72 °C para extensão e 5 minutos a 72 °C para extensão final.

As PCRs para arbovírus foram realizadas produzindo volumes finais de 25 μL . Os *primers* utilizados estão de acordo com LANCIOTTI et al., (1992) para DENV e FAYE et al., (2008) para ZIKV. A descrição dos *primers* e seus respectivos fragmentos amplificados para as reações se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados nas reações de amplificação dos arbovírus.

Vírus	Primer	Sequência	Posição genômica	Tamanho do fragmento (pb)
DENV ^a	D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134-161	511pb
	D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	616-644	
DENV1	TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586	482 (D1 e TS1)
DENV2	TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	119 (D1 e TS2)
DENV3	TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290 (D1 e TS3)
DENV4	TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392 (D1 e TS4)
ZIKV ^b	ZKENF	5'-GCTGGDGCRCGACACHGGRACCT-3'	1538-1558	364pb
	ZIKENR	5'-RTCACYGCCATYTGGRCTG-3'	1883-1902	

^a Lanciotti et al., 1992; ^b Faye et al., 2008.

Foram obtidas reações com volume final de 25 μ L, contendo para cada reação: 2,5 μ L de 1x PCR Buffer, deoxinucleotídeo trifosfatos (dNTP) a concentração de 200 μ M, cada primer a concentração de 0,3 μ M, Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) a concentração de 1,5 mM, Taq Polimerase a concentração de 1,25 U, e 2 μ L de cDNA, sendo o volume final da reação completado com 16 μ L de água Milli-q autoclavada. As temperaturas utilizadas para a reação foram: 10 minutos a 95 °C para desnaturação inicial, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 40 segundos a 55 °C para anelamento, 30 segundos a 72 °C para extensão e 10 minutos a 72 °C para extensão final. Para as reações de amplificação de KDR, foram utilizados como controles positivos, amostras de *Ae. Aegypti* provenientes de outro estudo, previamente extraídas e amplificadas, apresentando resultados positivos. Para padronização das PCRs para arbovírus foram utilizados controles positivos fornecidos pelo Laboratório Central de Sergipe (LACEN). O controle negativo utilizado para as reações foi água Milli-q autoclavada. Tanto para a confecção do cDNA quanto para as PCRs, foi utilizado termociclador Amplitherm TX96.

Os produtos da *PCR* foram visualizados em gel de agarose à concentração de 2%, preparado com 4 gramas de agarose dissolvidos em 200 mL de tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x. Para cada amostra foram utilizados 10 μ L do produto amplificado, 5 μ L de corante Promega Diamond™ Nucleic Acid Dye, e 1,5 μ L de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X). O gel foi corrido por 90 minutos a 80 volts, sendo posteriormente a leitura realizada através de Fotodocumentador para gel de eletroforese Loccus Biotecnologia™. Todas as etapas dos testes moleculares foram

realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia (GMBio) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe.

3.4 Taxa Mínima de Infectividade (TMI)

Para análise dos resultados obtidos nos testes moleculares foi utilizada a taxa mínima de infectividade (TMI) que considera apenas um indivíduo infectado presente no *pool*. A TMI é amplamente utilizada para estimar taxas de infectividade de arbovírus (AGARWAL et al, 2014; BERNARD et al, 2001; CHOMPOOSRI et al, 2016; MARTINS et al, 2012, THANGAMANI et al., 2016) podendo ser encontrada ocasionalmente em forma de proporção.

A TMI para DENV e ZIKV nos *pools* utilizados nos testes moleculares foi calculada de acordo com a formula:

$$TMI = \frac{\text{número de } pools \text{ positivos para determinado arbovírus}}{\text{número total de mosquitos testados}} \times 1.000$$

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Neste trabalho não foram realizados experimentos em seres humanos. As coletas foram realizadas em ações conjuntas com as campanhas dos agentes de endemia da Secretaria de Saúde de Laranjeiras. A entrada nas casas e instalação de ovitrampas só foram realizadas após autorização prévia verbal do morador e sempre acompanhadas por um agente de endemias.

A utilização de sangue de ovinos (*Ovis aries*) da raça Santa Inês na manutenção da colônia de *Ae. aegypti* foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe, registrada com nº 43/2016 e estando de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2008, do Decreto nº 6.899/2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5 RESULTADOS

O período de coleta ocorreu na segunda quinzena de setembro de 2016, sendo as ovitrampas distribuídas na primeira semana e recolhidas na semana seguinte. O Índice de Positividade de Ovitampa apresentou valor de 88%, sendo que das 42 palhetas recuperadas e recolhidas das ovitrampas, 37 estavam positivas apresentando ovos e 5 estavam negativas. A contagem de ovos totalizou 4013 ovos detectados nas palhetas positivas evidenciando Índice de Densidade de Ovos equivalente à 108 ovos por palheta.

Na realização da triagem das gaiolas estoque, foram obtidas oito gaiolas definitivas de indivíduos adultos de *Ae. aegypti* da geração P, proveniente dos ovos que foram recolhidos nas ovitrampas instaladas em campo, sendo seis (P1, P2, P5, P6, P7, P8) com aproximadamente cem mosquitos (50 machos e 50 fêmeas), uma gaiola (P3) com oitenta indivíduos (30 machos e 50 fêmeas) e uma gaiola (P4) com 50 mosquitos fêmeas. Durante a triagem, foram identificados 73 indivíduos, 20 machos e 53 fêmeas, de *Ae. albopictus* e posteriormente descartados.

Foram realizados de três a quatro ciclos de repastos sanguíneos em cada gaiola para a obtenção de ovos da geração F1. O número total de ovos variou de 200 a 660 por gaiola (Tabela 2) ao final dos ciclos.

Tabela 2 - Distribuição do número de ovos obtidos por gaiolas da geração parental (P), Laranjeiras, 2016.

Repasto	Número de ovos								Total
	P.1	P.2	P.3	P.4	P.5	P.6	P.7	P.8	
1º	28	0	0	0	0	0	0	0	28
2º	43	18	218	10	231	296	435	56	1307
3º	121	54	137	118	219	210	225	265	1349
4º	66	128	-	82	-	-	-	-	276
Total	258	200	355	210	450	506	660	321	2.960

Na contabilização de perdas por morte de indivíduos nas gaiolas, foram observados valores entre 1 a 12 perdas nas gaiolas da geração P, ocorrendo perdas em todas as gaiolas. A separação dos mosquitos da geração P para testes moleculares resultou em 35 *pools*, sendo 29 *pools* para as oito gaiolas definitivas e 6 *pools* com indivíduos machos que foram triados das gaiolas estoques, totalizando o número de 838 indivíduos. A quantidade de mosquitos por *pool* não ultrapassou o número de 25 indivíduos, sendo que o *pool* com menor número de mosquitos apresentou 16 indivíduos.

Da geração F1, foram obtidas oito gaiolas, cada uma proveniente separadamente da gaiola definitiva correspondente da geração P. Duas gaiolas (F1.1, F1.5) possuíam aproximadamente 50 mosquitos, devido a perdas na eclosão e mortalidade de larvas nas bandejas. Duas gaiolas (F1.2, F1.4) possuíam aproximadamente 100 mosquitos e quatro gaiolas (F1.3, F1.6, F1.7, F1.8) obtiveram números próximos ou superiores a 200 indivíduos devido ao grande número de larvas eclodidas. Foram realizados de quatro a cinco repastos sanguíneos em cada gaiola para obtenção da próxima linhagem. Na contagem de ovos foram observados valores entre 181 e 748 ovos por gaiola (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição do número de ovos obtidos por gaiolas da primeira geração filial (F1), Laranjeiras, 2017.

Repasto	Número de ovos								
	F1.1	F1.2	F1.3	F1.4	F1.5	F1.6	F1.7	F1.8	Total
1º	0	0	0	1	0	0	0	0	1
2º	270	171	47	40	21	197	330	142	1218
3º	0	43	68	1	196	415	92	31	846
4º	227	7	151	124	134	136	71	8	858
5º	105	42	295	210	119	-	-	-	771
Total	602	263	561	376	470	748	493	181	3.694

Na contabilização de perdas por morte de indivíduos nas gaiolas, foram observados valores entre 4 a 29 perdas nas gaiolas da geração F1, ocorrendo perdas em todas as gaiolas. A separação dos mosquitos da geração F1 para testes

moleculares resultou em 36 *pools* totalizando 789 indivíduos. A quantidade de mosquitos por *pool* não ultrapassou 25 indivíduos e o *pool* com menor número de mosquitos contabilizou 15 indivíduos.

Dentre todos os 71 *pools* obtidos, totalizando 1627 indivíduos adultos para os testes moleculares, 15 *pools* contendo 346 mosquitos, sendo 298 da geração P e 48 da geração F1, apresentaram resultados negativos quanto à amplificação utilizando *primers* para detecção de mutações no gene de canal de sódio, afim de verificar o êxito das etapas de extração de RNA e confecção do cDNA (Figura 1). Foram então excluídos da amostragem sendo eles: 9 *pools* provenientes das gaiolas definitivas P.5, P.6, P.7, P.8 da geração P, 3 *pools* dos indivíduos machos restantes das gaiolas estoque da geração P, 3 *pools* provenientes das gaiolas F1.1 e F1.2 da geração F1.

Os 56 *pools* com 1281 indivíduos adultos, sendo 540 da geração P e 741 da geração F1 com resultados positivos para extração de RNA e confecção do cDNA, foram submetidos a PCR para os arbovírus DENV e ZIKV onde não se obteve resultados positivos (Figuras 2 e 3). As linhagens livres de arbovírus DENV e ZIKV ocorreram nas gaiolas F1.3, F1.4, F1.5, F1.6, F1.7 e F1.8.

Figura 1: Eletroforese da PCR para KDR com 10 amostras testadas. M = peso molecular 100 pb, C+ = controles positivos, 1-10 = pools utilizados, C- = controle negativo.

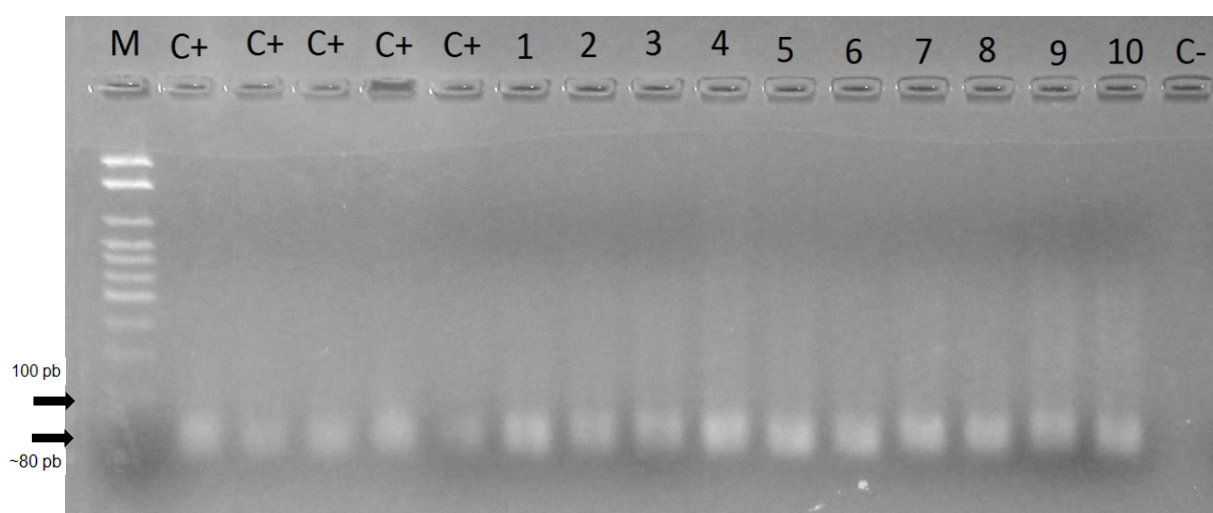


Figura 2: Eletroforese da PCR para DENV com 10 amostras testadas. M = peso molecular de 100 pb, D1-D4 = controles positivos, 1-10 = pools utilizados, C- = controle negativo.

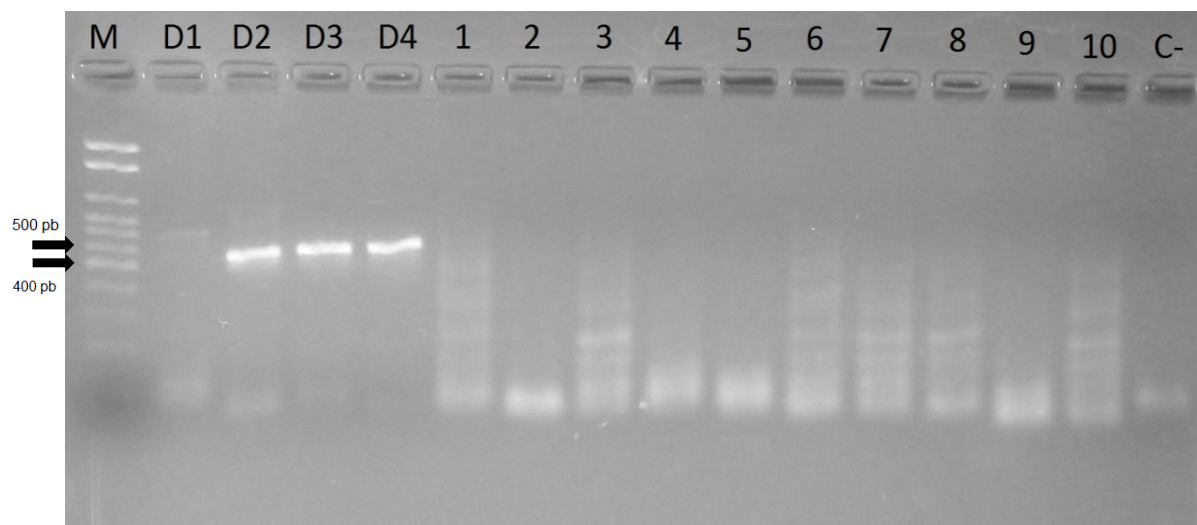
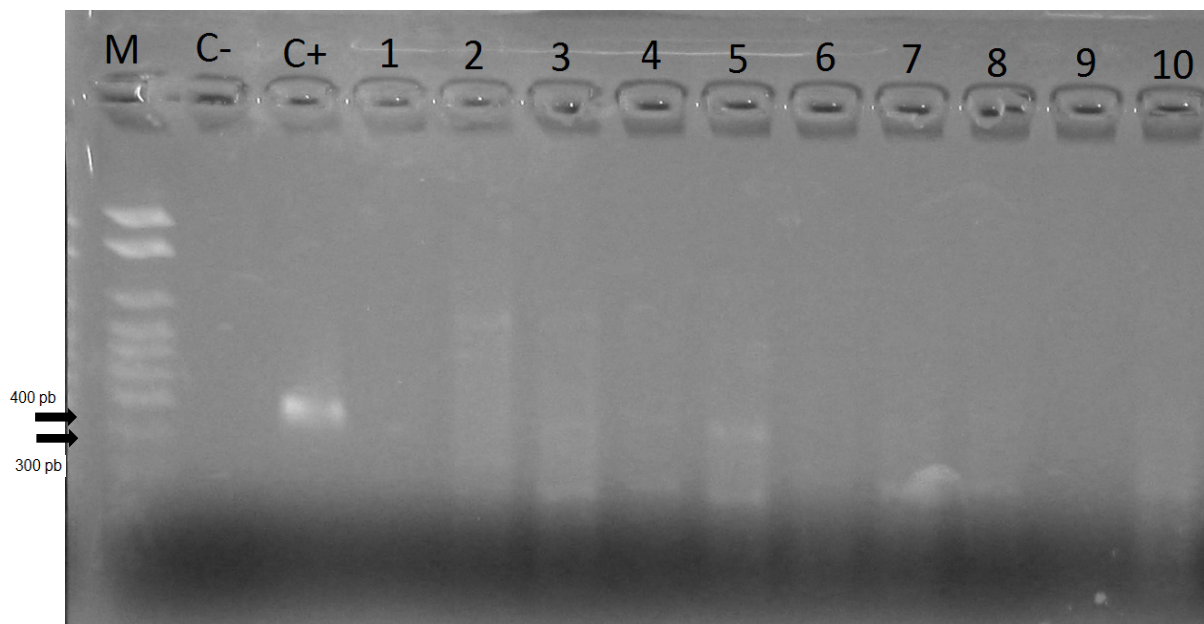


Figura 3: Eletroforese da PCR para ZIKV com 10 amostras testadas. M = peso molecular de 100 pb, C- = controle negativo, C+ = controle positivo, 1-10 = pools utilizados.



6 DISCUSSÃO

Apesar de não ser possível correlacionar o Índice de Positividade de Ovitampa e o Índice de Densidade de Ovos, encontrado nos domicílios em que foram instaladas as armadilhas, com o Levantamento de Índice Rápido de *Ae. aegypti* (LIRAA), os elevados valores observados (IPO = 88% e IDO = 108 ovos/ovitrampas) representam dados alarmantes com relação a densidade populacional de *Ae. aegypti* no bairro Centro de Laranjeiras.

A ocorrência de *Ae. albopictus* em Laranjeiras representa uma observação interessante, uma vez que a ocorrência desta espécie foi observada pela primeira vez no estado de Sergipe em amostras coletadas durante campanha de vigilância epidemiológica realizada no município de Areia Branca em 2012 (SANTANA et al., 2014). Em virtude de demonstrar elevada capacidade de utilizar criadouros artificiais em ambientes rurais (GOMES et al., 1999), esta espécie provavelmente já deve se apresentar amplamente distribuída no estado de Sergipe. Apesar de ser encontrado em menor densidade populacional e apresentar menor importância epidemiológica na transmissão de arbovírus em relação a *Ae. aegypti*, deve ser monitorado mais atentamente pelos programas de vigilância epidemiológica.

As variações observadas quanto ao rendimento entre o primeiro repasto e os demais (Tabelas 2 e 3) se devem, provavelmente, ao primeiro ciclo gonotrófico das fêmeas, onde a atividade de ovoposição observado é extremamente reduzido durante as primeiras 48 horas após o primeiro repasto em relação aos outros. A pequena variação observada do segundo repasto em diante pode decorrer da estabilização da atividade de oviposição observada após o primeiro ciclo gonotrófico (GOMES et al., 2006). Outra possível explicação para as variações observadas na quantidade de ovos obtidas nos mesmos repastos em gaiolas diferentes, seria o número de fêmeas realizando hematofagia no alimentador artificial adaptado. Tendo em vista que não há como controlar este processo, apenas é possível estimular a biologia alimentar das mesmas através de exalação de CO₂ nas gaiolas durante a alimentação.

Neste estudo, não foi detectada transmissão vertical de DENV e ZIKV ocorrendo nas amostras analisadas. Em estudo que analisou a infectividade para DENV em indivíduos de *Ae. aegypti* coletados em campo, a ocorrência de transmissão

vertical acontecendo naturalmente para este vírus não foi observada para os indivíduos em fase larvária coletados (CHOW et al., 1998). Em estudo realizado avaliando a ocorrência de transmissão vertical de DENV através de infecção artificial realizada em laboratório, foi observada proporção de 1 mosquito infectado a cada 2073 testados, resultando em valor médio de TMI inferior a 0,5, sugerindo que este fenômeno tem ocorrência pouco frequente (JOUSSET, 1981).

Em estudo realizado com infecção artificial de ZIKV em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* visando demonstrar o mecanismo de transmissão vertical, foram encontrados resultados positivos somente para a primeira espécie, com valor de TMI igual a 3,4 e proporção de 1 mosquito infectado a cada 290 testados. Não foram encontrados resultados positivos para os 803 indivíduos da segunda espécie que foram utilizados nos testes. No estudo em questão foi realizada uma possível estimativa da TMI para *Ae. albopictus*, onde após não encontrar nenhum *pool* positivo dentre todos 803 mosquitos testados, foi estipulada uma TMI menor que 1,24 com proporção menor que 1 indivíduo infectado a cada 803 analisados (THANGAMANI et al., 2016).

No presente trabalho, que também não encontrou *pools* positivos para DENV e ZIKV, a TMI poderia ser estipulada de modo semelhante ao realizado por THANGAMANI et al., (2016). Assim, ao analisar todos os 1281 mosquitos, a TMI seria menor que 0,78 com proporção menor que 1 mosquito infectado a cada 1281 analisados. Considerando a possível TMI apenas para os mosquitos da geração P, seria encontrado valor menor que 1,85 com proporção menor que 1 mosquito infectado para cada 540 testados.

A ausência de transmissão vertical ocorrendo nas amostras analisadas no presente trabalho, pode decorrer da diminuição de casos de infecção por DENV e também provavelmente de ZIKV, registrados em 2016 em relação ao ano anterior, demonstrada por dados divulgados pela Secretaria Estadual de Saúde (SES, 2017). Baixo índice de transmissão horizontal possivelmente resultaria em menos fêmeas infectadas que poderiam, portanto, estar transmitindo esses arbovírus para suas proles.

A baixa taxa mínima de infectividade de transmissão vertical observada para arbovírus evidenciam que a importância epidemiológica deste mecanismo de

transmissão pode não apresentar relevância em situações de endemias e epidemias, onde a densidade de vetores e a transmissão horizontal ocorrem com abundância (ADAMS & BOOTS, 2010). Porém a transmissão vertical permanece como mecanismo de persistência dos arbovírus em períodos interepidêmicos ou de condições climáticas adversas (CLEMENTS, 2012).

7 CONCLUSÃO

Apesar da transmissão vertical ter sido demonstrada ocorrendo naturalmente para DENV e ZIKV, em um grande número de estudos para a primeira e pequeno número para a segunda, no presente trabalho, este mecanismo de transmissão não foi evidenciado ocorrendo nas amostras da população de *Ae. aegypti* coletada no bairro Centro da cidade de Laranjeiras, Sergipe.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, Ankita et al. Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2990, 2014.

ANDERSON, John F.; MAIN, Andy J. Importance of vertical and horizontal transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* in the Northeastern United States. **Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 11, p. 1577-1579, 2006.

BERNARD, Kristen A. et al. West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 679, 2001.

BHATT, Samir et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

CANYON, D. V.; HIL, J. L. K.; MULLER, R. Effect of diet on biting, oviposition, and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 36, n. 3, p. 301-308, 1999.

CHRISTOPHERS, S. et al. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. **Aedes aegypti (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure.**, 1960.

CHOMPOOSRI, Jakkrawarn et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 227, 2016.

CHOUIN-CARNEIRO, Thais et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004543, 2016.

CLEMENTS, Alan N. **The biology of mosquitoes, Volume 3 Transmission of viruses and interactions with bacteria.** Cabi, 2012.

CONSOLI, Rotraut AGB; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Editora Fiocruz, 1994.

COSTA-DA-SILVA, André Luis et al. Glytube: a conical tube and parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53816, 2013.

CRUZ, Lucinéia Claudia de Toni Aquino et al. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 18-25, 2015.

CUNHA, Rivaldo V. Brazil's triple epidemic: dengue, chikungunya and zika; challenges to society and opportunities for science, technology and innovation. **Policy in Focus**, v. 13, p. 27-29, 2016.

FAYE, Oumar et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96-101, 2008.

FERREIRA-DE-BRITO, Anielly et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 655-658, 2016.

FLORES, Fernando Sebastián et al. Vertical transmission of St. Louis encephalitis virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Córdoba, Argentina. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 999-1002, 2010.

FONTENILLE, Didier et al. First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 533-535, 1997.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia Vol. 2**. Edusp, 1996.

GOMES, Adriana dos Santos; SCIAVICO, Célia J.; EIRAS, Álvaro Eduardo. Periodicity of oviposition of females of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae) in laboratory and field. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 327-332, 2006.

GOMES, Almério C. et al. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 95, 1999.

GRUNNILL, Martin; BOOTS, Michael. How important is vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae)?. **Journal of medical entomology**, v. 53, n. 1, p. 1-19, 2016.

GUEDES, D. R. D. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal of vector borne diseases**, v. 47, n. 2, p. 67, 2010.

HARDY, James L. et al. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annual review of entomology**, v. 28, n. 1, p. 229-262, 1983.

JOSHI, Vinod; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 158-161, 2002.

JOUSSET, Françoise-Xavière. Geographic *Aedes aegypti* strains and dengue-2 virus: susceptibility, ability to transmit to vertebrate and transovarial transmission. In: **Annales de l'Institut Pasteur/Virologie**. Elsevier Masson, 1981. p. 357-370.

KUNO, Goro; CHANG, Gwong-Jen J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 608-637, 2005.

LANCIOTTI, Robert S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LE GOFF, Gilbert et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. **Parasite**, v. 18, n. 3, p. 277-280, 2011.

LEQUIME, Sebastian; PAUL, Richard E.; LAMBRECHTS, Louis. Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 5, p. e1005548, 2016.

LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo et al. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 787-796, 2014.

MARTEIS, Letícia Silva et al. Identificação e distribuição espacial de imóveis chave de *Aedes aegypti* no bairro Porto Dantas, Aracaju, Sergipe, Brasil entre 2007 e 2008. **Cad Saúde Pública**, v. 29, p. 368-78, 2013.

MARTINS, Victor Emanuel Pessoa et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41386, 2012.

MEYER, R. P.; HARDY, J. L.; REISEN, W. K. Diel changes in adult mosquito microhabitat temperatures and their relationship to the extrinsic incubation of arboviruses in mosquitoes in Kern County, California. **Journal of medical entomology**, v. 27, n. 4, p. 607-614, 1990.

MIYAZAKI, Rosina D. et al. Monitoramento do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae), por meio de ovitrampas no Campus da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**, p. 392-397, 2009.

MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

NAKSATHIT, Amara T.; EDMAN, John D.; SCOTT, Thomas W. Utilization of human blood and sugar as nutrients by female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 36, n. 1, p. 13-17, 1999.

NATAL, Delsio. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002.

NELMS, Brittany M. et al. Experimental and natural vertical transmission of West Nile virus by California *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Journal of medical entomology**, v. 50, n. 2, p. 371-378, 2013.

NEVES, David Pereira et al. **Parasitologia humana**. 11^a ed. cap. 43, p. 363, São Paulo: Atheneu, 2005.

ROHANI, A. et al. The effect of extrinsic incubation temperature on development of dengue serotype 2 and 4 viruses in *Aedes aegypti* (L.). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 40, n. 5, p. 942, 2009.

SANTANA, Antônio César S. et al. Primeira Ocorrência de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Estado de Sergipe. **EntomoBrasilis**, v. 7, n. 3, p. 227-229, 2014.

SANTOS, Norma S. O.; ROMANOS, Maria T. V.; WIGG, Marcia D. **Introdução à virologia humana**. 2ª ed. Cap. 10, p. 127, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

SCOTT, Thomas W. et al. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 5, p. 922-927, 1993.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico ano ii nº 8, dados de 2016 e 2017, SERGIPE, 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS), MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 38 - 2016 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016.

SHOPE, Robert E.; MEEGAN, James M. Arboviruses. In: **Viral Infections of Humans**. Springer US, 1997. p. 151-183.

SMARTT, Chelsea T. et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. **Journal of medical entomology**, 2017.

VALLE, Denise; PIMENTA, Denise Nacif; AGUIAR, Raquel. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 419-422, 2016.

THANGAMANI, Saravanan et al. Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1169-1173, 2016.

THAVARA, Usavadee et al. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 40, n. 5, p. 951, 2009.

THONGRUNGIAT, Supatra et al. Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, n. 1, p. 147-152, 2011.

TJADEN, Nils Benjamin et al. Extrinsic incubation period of dengue: knowledge, backlog, and applications of temperature dependence. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. e2207, 2013.

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and severe dengue fact sheet, 2016.