

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Zoologia
Programa de pós-graduação em Zoologia

ANA CAROLINA FELICIO ALVES

Diversidade de espécies e de hospedeiros de Culicidae (Diptera) em área de Mata Atlântica da região Sul do Brasil.

Curitiba
2023

ANA CAROLINA FELICIO ALVES

Diversidade de espécies e de hospedeiros de Culicidae (Diptera) em área de Mata Atlântica da região Sul do Brasil.

Projeto de Tese a ser desenvolvido no programa de pós-graduação em Zoologia da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia.

Orientação:

Prof. Dr. Mario A. Navarro da Silva

Coorientação:

Dra. Angela Maria Palacio-Cortés

Curitiba

2023

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, é considerada uma das regiões mais biodiversas do planeta. O bioma abriga mais de 20.000 espécies incluindo 384 espécies de mamíferos, 1.025 de aves, 517 de répteis e 719 de anfíbios. Principalmente durante o século XX, a área da Mata Atlântica passou por extensos períodos de desmatamento e fragmentação, e atualmente está restrita a 12% de sua área original (Marques & Grelle, 2021).

Áreas de mata são habitats para as mais diferentes espécies de vertebrados, e a presença destes representa uma importante fonte de alimento para organismos artrópodes que se alimentam de sangue. A hematofagia, ou seja, o hábito de se alimentar de sangue, surgiu de forma independente em pelo menos seis vezes nos artrópodes (Lehane, 2005; Freitas & Nery, 2020). Acredita-se que o hábito da hematofagia tenha se desenvolvido a partir de uma associação contínua e prolongada entre vertebrados e insetos que se adaptaram ao modo de vida sugador, ou que a evolução do hábito tenha evoluído a partir de artrópodes ancestrais morfológicamente adaptados a perfurar superfícies (Lehane, 2005; Ortega-Insaurralde & Barrozo, 2022). A evolução da hematofagia também influenciou o desenvolvimento de diferentes formas de alimentação, levando a evolução de organismos com diferentes aparatos bucais. Alguns organismos hematófagos apresentam aparelhos bucais adaptados para a realização da alimentação diretamente em capilares sanguíneos através da perfuração da pele, conhecidos como organismos solenófagos, como nas famílias Culicidae (Diptera) e Reduviidae (Hemiptera). Outros dípteros como flebotomíneos e tabanídeos, se adaptaram ao hábito alimentar telmófago, se alimentando de poças de sangue formadas por laceração na pele do hospedeiro (Doehl *et al.* 2017; Akhoundi *et al.* 2020; Keita *et al.* 2020). A evolução deste hábito alimentar também contribuiu para a especialização de características comportamentais, fisiológicas e morfológicas que permitem que a alimentação sanguínea aconteça.

A busca pelo hospedeiro vertebrado e o sucesso no repasto sanguíneo são os principais objetivos de organismos hematófagos, e envolve estratégias multissensoriais que incluem reconhecimento térmico, hídrico, olfativo, gustativo e visual. Em muitos hematófagos como mosquitos, percevejos e piolhos, estruturas sensoriais parecem ser moduladas de forma que detectam estímulos específicos, podendo atuar como receptores químicos, térmicos e mecânicos na busca do seu hospedeiro (Ortega-Insaurralde & Barrozo, 2022).

Entre os organismos hematófagos, a família Culicidae representa um dos grupos mais diversos. Existem 3.618 espécies de Culicidae descritas formalmente, distribuídas em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae, com três e 110 gêneros, respectivamente (Harbach, 2023). Os mosquitos que compõem essa família possuem distribuição cosmopolita, com a região biogeográfica neotropical sendo uma das mais bem representadas, com cerca de 30% das espécies (Wilkerson *et al.*, 2021; Harbach, 2023). A composição do ambiente como a fauna e a flora local, podem sustentar a manutenção da população desses organismos, o que pode ser observado na região neotropical em áreas de Mata Atlântica, onde os gêneros *Anopheles* Meigen, 1818, *Haemagogus* Williston, 1896, *Culex* Linnaeus, 1758, *Psorophora* Robineau-Desoidy, 1827 e *Wyeomyia* Theobald, 1901, são os mais registrados (Guedes e Navarro-Silva, 2014; Alencar *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2021; Araujo-Oliveira *et al.*, 2023).

A evolução da hematofagia nesta família, também envolveu adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, que possibilitaram a eficácia na busca do hospedeiro e a rápida ingestão de sangue (Lehane, 2005; Mullen & Durden, 2019; Wilkerson *et al.* 2021). A detecção sensorial no grupo se dá principalmente pelas sensilas, que são estruturas cuticulares distribuídas em apêndices como antenas, pernas, asas e peças bucais (Pezzi *et al.* 2018; Muller *et al.* 2019; Aiello *et al.* 2021; Dickerson *et al.* 2021).

As sensilas presentes em antenas e palpos maxilares abrigam os receptores olfativos em seu interior, permitindo que o inseto detecte a presença do hospedeiro, antes mesmo de visualizá-lo. As sensilas dos palpos maxilares abrigam ainda receptores gustativos, responsáveis pela detecção e discriminação das substâncias químicas (Benton, 2017; Wolff e Riffel, 2018). Um exemplo disso é a detecção de Dióxido de Carbono (CO₂) realizada pelas fêmeas de mosquitos, que permite a percepção de hospedeiros a longas distâncias, e em sinergia com os odores do vertebrado, podem aumentar a atração e orientação na busca da fonte de alimento (Kim *et al.* 2021).

A visão também é um importante método na busca do hospedeiro. Os olhos dos mosquitos são compostos por omatídeos que variam em números de 500 a 2.000. Cada omatídeo é composto por células fotorreceptoras que variam em organismos diurnos e noturnos. A visão desempenha um importante papel na busca por parceiros reprodutivos, locais de descanso e de oviposição, além de ser fundamental para o comportamento de forrageamento, influenciado pela luz solar nos períodos de

crepúsculo matutino e vespertino. Apesar de importante na busca do hospedeiro, acredita-se que a visão dos organismos culicídeos tenha maior eficácia na busca do hospedeiro quando associado a outros fatores, como a percepção química (McMeniman *et al.* 2014). Quando o hospedeiro é encontrado, o seu comportamento também pode determinar o sucesso da alimentação. Em mosquitos, o horário da alimentação está ligado também a fatores intrínsecos e extrínsecos. Muitas espécies apresentam preferência pela realização do repasto durante o período noturno, onde muitas vezes os hospedeiros escolhidos permanecem em longos períodos de repouso (Veronesi *et al.* 2012; Orlandin *et al.* 2017; Asigau *et al.* 2019).

Embora o sistema sensorial seja importante para a busca do hospedeiro, o sucesso do repasto também é influenciado pela eficiência do aparelho bucal, apresentando grande diversidade morfológica, resultado de adaptações as suas respectivas dietas. Machos e fêmeas desta família podem se alimentar fluidos vegetais, sendo este o único recurso alimentar para machos. Ambos utilizam extensões ou estruturas modificadas anteriormente à cabeça, que permitem realizar a ingestão da refeição e no caso das fêmeas, realizar a perfuração de tecidos e ingerir a refeição sanguínea com a ajuda de bombas de sucção.

O aparelho bucal dos culicídeos, conhecido como probóscide, é caracterizado pela presença de seis peças bucais, conhecido como aparelho bucal hexaqueta, formado por um lábio, um par de mandíbulas, um par de maxilas e a hipofaringe. Os machos da família Culicidae possuem mandíbulas e maxilas mais simples e relativamente mais fracas que o aparelho bucal das fêmeas. Em alguns casos, como em espécies de *Toxorhynchites* Theobald, 1901, machos e fêmeas não se alimentam de sangue, portanto, o aparelho bucal desse grupo não apresenta grande dimorfismo sexual (Wilkerson *et al.* 2020). Fêmeas de culicídeos geralmente se alimentam de sangue e possuem suas estruturas bucais modificadas para perfuração de tecidos, como estiletos especializados para a perfuração de tecidos. Também são encontradas estruturas sensoriais que localizam áreas adequadas para realizar a perfuração (Krenn & Aspöck 2012; Zahran *et al.* 2022; Barton *et al.* 2023).

Na perfuração, a hipofaringe é responsável pela liberação de saliva advinda de glândulas salivares, que contém diversos compostos com a finalidade de evitar respostas do hospedeiro que impeçam a sua alimentação, como a agregação plaquetária, contração muscular, a coagulação sanguínea e a inflamação dos tecidos (Arcà *et al.* 2017; Barton *et al.* 2023). As mandíbulas serrilhadas na sua extremidade,

perfuram a pele do hospedeiro, alcançando pequenos vasos sanguíneos, e na porção posterior do lábio, o alimento é ingerido pelo canal alimentar sendo bombeado por meio das bombas faríngea e cibária, atuando juntas na sucção do alimento (Lehane, 2005; Krenn & Aspöck 2012; Wayadande *et al.* 2019; Zahran *et al.* 2022). A interrupção da alimentação sanguínea ocorre principalmente quando há a distensão abdominal decorrente da ingestão, mas também pode envolver outros fatores fisiológicos como o tamanho do repasto sanguíneo, o estado inicial nutricional da fêmea, ou o início da produção de ovos (Farjana & Tuno, 2013).

A hematofagia nessa família é determinada intrinsecamente, pois as proteínas obtidas do sangue são essenciais para eficiência reprodutiva e para a produção de ovos (Takken e Verhulst, 2013). Em organismos que não se alimentam de sangue, a ingestão de açúcar, lhes confere vantagens metabólicas como o fornecimento de energia para o voo, se relacionando com a sobrevivência e o sucesso do acasalamento do inseto (Hall-Mendelin, *et al.* 2010). Uma das principais vantagens associadas a alimentação de açúcares, é em relação a velocidade com que a energia é fornecida, sendo a refeição de açúcar assimilada mais rapidamente que a refeição de sangue (Foster, 1995; Souza-Neto *et al.* 2007). Para mosquitos fêmeas de *Anopheles claviger* (Meigen, 1804) e *Culex pipiens* Linnaeus, 1758, a alimentação de açúcares florais são determinantes para a realização de mais ciclos gonotróficos, ou seja, maior potencial reprodutivo, resultado de um aumento na vida útil do inseto quando alimentado com açúcares. O mesmo pode ser observado em *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 e *Anopheles sargentii* (Theobald, 1907), que apresentam sobrevivência reduzida quando apenas a refeição de sangue lhes é fornecida (Souza-Neto *et al.* 2007; Barredo & DeGennaro, 2020).

Em todos os mosquitos anautógenos, ou seja, aqueles em que as fêmeas precisam de sangue para produzir ovos, ocasionalmente tendem a selecionar hospedeiros específicos, como aves, répteis, anfíbios e mamíferos, o que pode conferir benefícios de aptidão após a alimentação, e não ocorre de forma aleatória, sendo relacionada com ganhos nutricionais variados a partir de diferentes hospedeiros (Santos *et al.* 2019; Telang & Skinner, 2019; Al-Rashidi *et al.* 2022). Alguns trabalhos trazem, que as diferentes fontes de sangue atuam de formas distintas em culicídeos. O sangue de aves por exemplo, aumenta a fecundidade e fertilidade em *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 e *Culex coronator* (Dyar & Knab, 1906), quando comparado ao sangue de mamíferos, e isso poderia estar relacionado a composição

sanguínea, já que aves apresentam quantidades elevadas de proteínas em seu sangue por possuírem eritrócitos maiores e nucleados (Alto *et al.* 2014; Rucci *et al.* 2023). Já para *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), o sangue humano lhe confere maior produção de ovos, além de maiores taxas de sobrevivência e fecundidade (Fasomkusolsil *et al.* 2013; Cebrián-Camisón *et al.* 2020; Al-Rashidi *et al.* 2022).

Embora a hematofagia esteja fortemente relacionada a uma influência genética, a disponibilidade bem como o comportamento de animais hospedeiros também são determinantes para os padrões da alimentação sanguínea (Takken e Verhulst, 2013; Fikring e Harrington, 2021; Yan *et al.*, 2021). As espécies culicídeos, podem ser agrupadas de acordo com o seu local preferencial para busca do hospedeiro. Quando a busca por vertebrados ocorre predominantemente em ambientes silvestres, são consideradas espécies zoofílicas, se alimentando preferencialmente de sangue animal. Outras, se alimentam predominantemente de sangue humano, conhecidas como espécies antropofílicas, buscando humanos no interior ou no ambiente externo das moradias, podendo também se alimentar de animais domésticos, apresentando grande plasticidade em sua alimentação (Powell & Tabanhnick, 2013; Takken & Verhulst, 2013; Chikwendu *et al.*, 2019).

As espécies de *Toxorhynchites* spp., *Topomyia* (Leicester, 1908) e *Wyeomyia smithii* (Coquillett, 1901), realizam a postura de ovos sem a alimentação sanguínea. Em *Toxorhynchites* por exemplo, nutrição dos ovos na fase adulta é dependente de lipídios e proteínas que são obtidas e armazenadas durante a fase larval, já que suas larvas são predadoras vorazes e se alimentam principalmente de larvas de Chironomidae, Tipulidae e outras espécies de Culicidae (Zhou *et al.*, 2014; Borowczak, 2017; Donald *et al.*, 2020). Em alguns casos, a alimentação e obtenção de proteínas é dependente do comportamento de fitofagia, onde o alimento é basicamente fluidos vegetais, como o pólen, rico em proteínas (cerca de 60% da sua massa) e aminoácidos (Peach & Matthews, 2022).

Mosquitos alimentados com sangue geralmente buscam locais, normalmente sombreados, onde possam se manter em repouso durante o processo de digestão sanguínea (Tandina *et al.* 2018). Também apresentam aumento na sua taxa metabólica voltada para a digestão do sangue, demonstrando que o esforço alocado para a digestão sanguínea para a produção de ovos é relativamente caro (Gray e Bradley, 2003; Nouzova *et al.*, 2019). As propriedades do sangue de vertebrados podem influenciar diretamente nas taxas de alimentação, sobrevivência de adultos,

fecundidade, taxas de eclosão e período de desenvolvimento, e apesar da composição sanguínea ser semelhante entre os vertebrados, o custo metabólico para a sua digestão parece ser diferente (Lyimo e Ferguson, 2009; Phasomkusolsil *et al.* 2013; Khan *et al.*, 2021).

Sabemos que a digestão sanguínea tem seu tempo e custo energético influenciado por diversos fatores como a composição e fonte do sangue, o tempo do repasto e a temperatura do ambiente (Lehane, 2005). A refeição de sangue é fundamental para o sucesso da oogênese, que é o processo de desenvolvimento de ovos, passando por duas fases, uma pré-vitelogênica, que se inicia no estágio de pupa, com o desenvolvimento de células germinativas nos ovários, e quando adulto, a alimentação sanguínea estimula a liberação de hormônios que ativam a fase vitelogênica, na qual se inicia a produção de vitelogenina e outros componentes que são absorvidos pelo crescimento dos oócitos, até a completa maturação dos ovários (Swevers, 2019; Han *et al.* 2020; Harrison *et al.* 2022; Aird *et al.* 2023).

O trato digestivo é dividido em três regiões principais, o intestino anterior, médio e posterior. A região anterior é dividida em uma bomba faríngea com divertículos dorsais, com função principal de digestão mecânica do sangue, além do armazenamento temporário do alimento como água e açúcares (Strand, 2017; Yang *et al.* 2021). A região mais importante funcionalmente é o intestino médio, que consiste em uma região com células epiteliais cubóides distribuídos em uma camada única, onde ocorre a digestão e absorção de sangue e nutrientes. Essa porção intestinal também é responsável pela sintetização da Matriz Peritrófica (MP), que é uma estrutura extracelular que envolve o bolo alimentar, impedindo que as células epiteliais do intestino entrem em contato direto com o alimento (Godoy *et al.*, 2023).

O intestino médio é dividido em duas regiões distintas: o intestino médio anterior e o intestino médio posterior. A região do intestino médio anterior é responsável pela digestão e absorção de açúcares ingeridos, e a região posterior, responsável pela síntese de enzimas digestivas, além do armazenamento e transporte da alimentação sanguínea, e absorção dos metabolitos resultado da digestão do sangue (Baia-da-Silva, 2019; Wilkerson *et al.* 2020). O intestino médio dos insetos também abriga uma microbiota importante para o processo de digestão, que auxiliam na aquisição de nutrientes, na lise de glóbulos vermelhos do sangue e na digestão de proteínas, além de apresentar potencial de impedir a infecção por micróbios patogênicos (Gaio *et al.* 2011; Boissière *et al.* 2012). Em alguns casos, nos estágios

iniciais, a ausência da microbiota intestinal impede o desenvolvimento além do primeiro instar, mas se recolonizadas, o desenvolvimento segue normalmente (Coon *et al.* 2016). A redução da microbiota intestinal afeta ainda a maturação de oócitos, levando a inviabilidade de ovos (Gaio *et al.* 2011; Coon *et al.* 2016). Por fim, a região posterior do intestino, é uma região importante para os processos de excreção de resíduos alimentares e reabsorção de íons e água (Yang *et al.* 2021).

Grande parte do sangue de vertebrados é composta por proteínas, que quando digeridos, resultam em diferentes aminoácidos que estimulam a expressão de genes responsáveis pela produção de proteínas, incluindo a vitelogenina, responsável pelo desenvolvimento do embrião e da gema do ovo (AllenRucci *et al.* 2023). Para isso, digestão do sangue pode ser realizada de forma mecânica e química. A mecânica vai ocorrer já durante o repasto sanguíneo em uma região conhecida como armadura cibarial. Localizada no intestino anterior, logo abaixo do clipeo e na base da bomba faríngea, essa área possui dentes esclerotizados, que auxiliam na hemólise de parte do repasto sanguíneo. A presença de uma região especializada na digestão mecânica, reduz o gasto energético envolvido na liberação de enzimas proteolíticas, além de atuar como uma primeira linha de defesa contra alguns agentes infecciosos, como a microfilária (Coluzzi *et al.* 1982; Lyimo e Ferguson, 2009; Jatuwattana *et al.*, 2020; Rucci *et al.* 2023).

Já a digestão química envolve maior gasto de energia para os insetos. Esta ocorre por meio de enzimas proteolíticas secretadas no lúmen do intestino médio após as refeições sanguíneas (Lehane, 2005; Isoe *et al.*, 2009; Lyimo e Ferguson, 2009; Rivera-Pérez *et al.*, 2017; Harrison *et al.*, 2021). A refeição sanguínea induz a secreção de enzimas digestivas, sendo a tripsina a principal enzima secretada, responsável pela digestão de proteínas ingeridas. Nas primeiras horas após a refeição (0 a 12h) as concentrações de tripsina são baixas, resultado da digestão inicial de proteínas sanguíneas. Esta é seguida por uma fase tardia da digestão, ocorrendo ente 12 e 36 horas após a alimentação, com a produção de altos níveis de tripsina tardia (Isoe *et al.*, 2009; Gaio *et al.* 2011; Wilkerson *et al.* 2020).

Sabemos que o custo metabólico para sintetizar e absorver a refeição de sangue é alto, mas o custo energético da hematofagia pode ser ainda maior. Os organismos também precisam lidar com outros componentes decorrentes da digestão sanguínea, evitando o estresse oxidativo que esse processo pode gerar, buscando manter a homeostase interna do organismo (Champion & Xu, 2017). Além de enzimas

digestivas, mosquitos também precisam sintetizar enzimas que desempenham papel importante no metabolismo de excretas nitrogenadas. A digestão da hemoglobina libera aminoácidos no lúmen do intestino médio, e esse processo envolve a produção de subprodutos que podem afetar o mosquito. Um desses subprodutos é a amônia, que quando não mantida em níveis baixos, pode afetar a digestão sanguínea, a expressão de genes e proteínas, eliminação de resíduos e a reprodução (Mazzalupo *et al.*, 2016).

A digestão da hemoglobina também libera heme e ferro, importantes moléculas em muitos processos fisiológicos, como na sinalização em células epiteliais para o início da vitelogênese, mas que tem efeitos oxidantes e citotóxicos quando não estão ligados a proteínas (Bottino-Rojas *et al.* 2015; Whiten *et al.* 2017). Quando em grandes quantidades, o heme liberado na digestão pode ser convertido em derivados úteis, ou em alguns casos, é aprisionado na matriz peritrófica do intestino do inseto, sendo eliminados ao final da digestão (Peterson *et al.*, 2007; Sterkel *et al.* 2017).

Quando mosquitos se alimentam de sangue de mais de um hospedeiro, ocasionalmente podem entrar em contato com hospedeiros reservatórios de agentes etiológicos fazendo com que ocorra possíveis transmissões de patógenos. Grande parte do ciclo de transmissão de doenças é relacionado a espécies oportunistas, que se alimentam de uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo humanos. A identificação da alimentação sanguínea em fêmeas ingurgitadas é o principal método voltado para compreender os padrões de alimentação dos culicídeos e seu papel no ciclo de transmissão de agentes etiológicos (Brugman *et al.*, 2015). Para isso, a estimativa de diversidade desses insetos da área deve ser feita de forma que alcance grande representatividade das espécies, e apesar de vários métodos voltados para a amostragem de mosquitos adultos, seu desempenho pode ser variado de acordo com o comportamento de cada espécie (Nepomichene *et al.*, 2015).

Associado a isso, um dos maiores problemas é a possibilidade do surgimento de ciclos epizooticos, que são caracterizados pelo adoecimento ou morte em populações animais por alguma doença, que podem preceder a ocorrência desta em populações humanas (Brasil, 2019). Um exemplo disso, é a ocorrência da transmissão do ciclo silvestre do Vírus da Febre Amarela (YFA, do inglês *Yellow Fever Virus*), que embora no Brasil seja endêmico da região amazônica, surtos recorrentes têm ocorrido

em vários estados brasileiros desde 2016, como São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato grosso e no Paraná (Lima *et al.*, 2021; Brasil, 2023). A sua transmissão está associada a espécies da subfamília Culicinae, principalmente dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (Robineau-Desvoidy, 1827), considerados vetores primários do patógeno (Couto-Lima *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020; WRBU, 2023). No Brasil, *Aedes aegypti* também tem papel importante na transmissão desses patógenos, principalmente nos ciclos urbanos de transmissão do patógeno (Cunha *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020; Gabiane *et al.*, 2022).

Outra importante doença notificada em áreas de mata é a malária, causada pelo protozoário *Plasmodium vivax* em áreas de Mata atlântica. No Brasil, espécies do gênero *Anopheles* spp. são as principais vetoras do patógeno, sendo *Anopheles cruzii* (Dyar & Knab, 1908) e *Anopheles Bellator* (Dyar & Knab, 1908), as principais espécies vetoras em áreas de Mata Atlântica (Guedes e Navarro-Silva, 2014; Cerreti-Junior *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2021). A transmissão da malária muitas vezes envolve além de humanos, primatas não humanos, que desempenham importante papel no ciclo da doença (Ferreira *et al.*, 2021; Medeiros-Souza *et al.*, 2021). No Brasil, a maioria dos casos registrados para a doença estão concentrados na região amazônica sendo causada pelo *Plasmodium falciparum*, (Castro-Duarte *et al.*, 2021; Brasil, 2023), e na região de mata atlântica, apesar do número reduzido de casos e notificações, a letalidade ocasionada pela doença é maior que na região amazônica (Brasil, 2023).

Em área de mata, também tem sido registrado a ocorrência de outros agentes patogênicos negligenciadas, como o Vírus Oropouche, Mayaro, Rocio e Saint Louis, que tem o ciclo de transmissão intimamente relacionado com a presença de vertebrados comuns em áreas de Mata Atlântica, (Lorenz *et al.*, 2017). O vírus Oropouche é transmitido por mosquitos *Aedes serratus* (Theobald, 1901) e *Culex quinquefasciatus* entre mamíferos como marsupiais, preguiças e primatas, podendo também infectar aves. Já o vírus Mayaro é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Haemagogus*, sendo os mamíferos os principais hospedeiros. No Brasil, ambos são registrados principalmente na região amazônica. No estado do Paraná, o primeiro registo para ambos ocorreu no início do ano de 2023 na região oeste do estado, em casos importados do estado do Pará (Lopes *et al.* 2014, Paraná, 2023). O vírus Rocio foi detectado pela primeira vez no estado de São Paulo, e seu ciclo de transmissão na natureza envolve aves e *Psorophora ferox* (Von Humboldt, 1819)

sendo o principal vetor, com casos esporádicos em humanos (Saivich *et al.* 2021). Já o vírus causador da encefalite de Saint Louis, considerado endêmico das Américas, foi isolado no Brasil pela primeira vez em mosquitos da Bacia Amazônica, sendo detectado posteriormente em vários estados brasileiros, incluindo o estado do Paraná (Almeida *et al.* 2019).

Estudos de diversidade de Culicidae e seus hábitos alimentares podem fornecer informações essenciais para estabelecer novas perspectivas sobre as interações com vertebrados e suas especificidades alimentares além de potenciais riscos de transmissão de agentes etiológicos para o homem e animais. As informações geradas podem auxiliar no monitoramento entomológico e a prevenção de ocorrência de ciclos epizooticos, além de contribuir de forma significativa com informações sobre a Mata Atlântica.

OBJETIVO GERAL

- Compreender a diversidade de hospedeiros vertebrados utilizados por Culicidae (Diptera), a partir da alimentação sanguínea de mosquitos presentes no Bioma Mata Atlântica.

Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade de Culicidae no Bioma Mata Atlântica;
- Determinar as fontes sanguíneas de Culicidae;
- Investigar a presença de arbovírus em Culicinae a presença de *Plasmodium* spp. em Anophelinae spp. coletados;

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O projeto será desenvolvido no Parque Estadual Pico do Marumbi, na região da Base Mananciais da Serra, mantida pela Empresa Gestora de Águas e Resíduos do Estado do Paraná (SANEPAR), localizado no município de Piraquara, no estado do Paraná, a uma altitude de 1.032 metros. A área abriga o primeiro sistema de abastecimento do estado do Paraná, conhecido como Reservatório do

Carvalho. A área representa uma região de transição entre Mata de Araucárias e Mata Atlântica Tropical, com clima caracterizado como pluvial temperado úmido, segundo a escala de Köppen, com temperaturas médias anuais em torno de 21°C. Atualmente a área recebe visitas promovidas pelo Centro de Educação Ambiental Mananciais da Serra (CEAM), voltadas para a conservação, com foco no cuidado com a água (Anjos & Navarro-Silva, 2008; Araujo & Pinto, 2021; Piraquara, 2023).

Amostragem, armazenamento e identificação de mosquitos fêmeas

As coletas serão realizadas entre os meses de janeiro a abril, utilizando aspiradores de Nasci acoplados a uma bateria de 12V, o qual será usado para aspirar mosquitos em repouso na vegetação arbustiva ou que possam ser atraídos pela presença dos coletores. As coletas serão realizadas seguindo as trilhas da reserva, onde serão demarcados previamente quatro pontos de coleta. As coletas serão iniciadas diariamente no período da manhã (entre 10h e 12h) finalizadas no período da tarde (entre as 14h e 16h). Para a execução da amostragem de mosquitos, os coletores estarão equipados Equipamentos de Proteção Individual (EPI), como luvas, botas, roupas e acessórios que deverão cobrir a maior parte possível da superfície do corpo, além do uso de produtos repelentes, a fim de evitar que os mosquitos se alimentem do sangue de membros equipe de coleta.

A ordem de coleta dos pontos será sorteada, evitando a repetição da sequência de pontos inicial, intermediários e final. A área de estudo conta com pequenas trilhas que levam a caixas de captação de água, as quais serão exploradas para a realização das coletas. Em cada trilha, o trajeto será feito até o seu final, onde serão iniciadas as aspirações. A coleta será realizada fazendo o deslocamento desde o final da trilha, até a sua entrada. As aspirações serão feitas ao longo de todo trecho que leva as caixas de captação, com períodos de cerca de 10 minutos de coleta, após esse tempo, os mosquitos capturados serão retirados e armazenados em caixas térmicas, para manter os insetos em local úmido e fresco, evitando que ocorra a morte dos espécimes durante o transporte. Após a retirada, novamente será iniciada a aspiração, até que aspire todo o trecho da trilha.

Os procedimentos laboratoriais moleculares e de identificação serão realizados no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Chironomidae e Culicidae

(LAMFIC²) da Universidade Federal do Paraná. Em laboratório, os indivíduos serão separados individualmente em microtubos e identificados por ponto de coleta, sexo e para as fêmeas, também será feita a classificação de presença ou ausência de alimentação sanguínea. Após a separação, os mosquitos serão mortos por congelamento em nitrogênio líquido e armazenados em freezer sob temperatura de -80°C.

Os espécimes serão identificados até o nível de espécie, utilizando a bibliografia de Forattini (2002). As fêmeas ingurgitadas serão divididas em duas partes: (I) cabeça e (II) tórax e abdômen, com o auxílio de alfinetes e pinças entomológicas estéreis. As partes serão transferidas novamente para microtubos individuais, onde a parte da cabeça será utilizada para a identificação de agentes patogênicos, e a região do tórax e do abdome para a identificação do hospedeiro fonte do repasto sanguíneo.

Extração do DNA total a partir de fêmeas ingurgitadas

Para a extração do DNA será utilizado o kit DNeasy® Blood & Tissue Kit, da Quiagen, seguindo o protocolo do fabricante com algumas alterações. Serão adicionados separadamente em microtubos de 1,5mL o abdome das fêmeas com 40 µL de Buffer ATL. O abdome deve ser fortemente macerado, para que o sangue seja liberado na solução. Posteriormente, serão adicionados mais 140 µL do buffer ATL e 20 µL de proteinase K. A mistura deve ser homogeneizada e incubada a 56°C por cerca de 40 minutos, com homogeneizações adicionais durante a incubação. Posteriormente, deverá ser adicionado a amostra 200 µL de Buffer AL com homogeneização, seguido de incubação de 56°C por mais 10 minutos. Em seguida, deverá ser adicionado 200 µL de etanol (96 – 100%) na amostra, e em seguida o conteúdo homogeneizado será adicionado a uma coluna com filtro fornecida pelo kit, e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O fluido liberado deverá ser descartado, e a coluna deverá ser inserida em novo microtubo de 2mL, com a adição de 500 µL de Buffer AW1 e centrifugação de 8.000 rpm por um minuto. Novamente o fluido deve ser descartado, e a coluna adicionada a um novo microtubo de 2mL, com a adição de 500 µL de Buffer AW2. A amostra deve ser centrifugada por 3 minutos a 14.000 rpm. O fluido eliminado na centrifugação novamente deverá ser descartado, e a coluna deve ser inserida em novo microtubo

de 1.5mL devidamente identificado. O DNA será eluído adicionando 40 µL de Buffer AE ao centro da membrana da coluna, sendo incubado por 1 min em temperatura ambiente, seguido de nova centrifugação de 8.000 rpm por 1 min. O DNA deverá ser mantido a pelo menos 4°C, até a sua amplificação.

Identificação do hospedeiro vertebrado

O DNA extraído será amplificado para a identificação do hospedeiro por meio do protocolo Nested PCR desenvolvido por Alcaide *et al.* (2009), com algumas alterações, que utiliza primers universais de vertebrados, e tem como alvo um fragmento com cerca de 800pb do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI). Para a PCR será preparado uma solução contendo 1X o tampão da enzima (Sigma), 3,16 mM de MgCl₂ (1,5 mM já contido no tampão da enzima + 1,66 mM do MgCl₂ Termo Scientific), 0,5 mM de mix dNTP (Amresco), 10 µg de BSA (Albumina Sérica Bovina), 5% de DMSO, 0,66 µM de cada um dos primers M13BC-FW e BCV-RV1, 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Sigma) e um µL de DNA extraído com concentração entre 70 e 150 ng/µL, com volume final de 30 µL. As condições de amplificação serão de: desnaturação inicial de 4 minutos a 94 °C, seguida de 39 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 45 °C e 1 minuto a 72 °C, com extensão final de 7 minutos a 72 °C, em termociclador (Bio-Rad).

Em seguida, será realiza uma segunda PCR com volume final de 30 µL contendo 1X o tampão da enzima (Sigma), 5,66 mM de MgCl₂ (1,5 mM já contido no tampão da enzima + 4,16 mM do MgCl₂ Termo Scientific), 0,66 mM de mix dNTP (Amresco), 5 µg de BSA (Albumina Sérica Bovina), 5% de DMSO, 0,33 µM de cada um dos primers M13 e BCV-RV2, 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Sigma) e 1,0 µL do produto da primeira PCR. As condições de amplificação da segunda PCR seguirá o protocolo conhecido como Touchdown, que se inicia com desnaturação de 3 minutos a 94°C, seguido de 16 ciclos com redução de temperatura de 1°C por ciclo, se iniciando em 60°C e finalizando em 45°C, com 1 minuto de extensão a 72°C, e 40 segundos de Desnaturação a 94°C, seguido de 24 ciclos de 40 segundos a 94°C, 45°C e 72°C, com extensão final de 7 minutos a 72 °C. ao final, o fragmento amplificado poderá variar entre 750 e 900 pares de bases.

Os produtos da segunda PCR serão submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, com verificação da amplificação em transiluminador. As amostras com amplificação positiva serão submetidas a purificação e preparadas para o

sequenciamento. Para determinar as refeições de sangue, as amostras serão purificadas usando Kit de Purificação de PCR QIAquick (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente serão submetidos a reações de sequenciamento. As sequências obtidas serão enviadas para o sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Setor de Sequenciamento de DNA da Universidade de São Paulo (USP) com sequências do GenBank usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

As sequências obtidas serão editadas utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.5 e alinhadas utilizando MUSCLE, conforme implementado no MEGA 6. A identificação das sequências será realizada por meio de comparação com sequências já depositadas no GenBank (construído e distribuído pelo *National Center of Biotechnology Information* – NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov) e no *Barcode of Life Data System* (BOLD: <http://www.barcodinglife.org>), que são bibliotecas que armazenam referências das sequências de DNA para muitas espécies conhecidas, permitindo análises de similaridade entre sequências alvo disponibilizadas nas plataformas. Os hospedeiros vertebrados serão considerados identificados quando a similaridade da sequência for $\geq 98\%$.

Extração do RNA viral e detecção do arbovírus (PCR em tempo real)

O RNA viral será extraído utilizando o kit QIAamp Viral RNA (Qiagen®), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As cabeças das fêmeas adultas coletadas nas aspirações serão inseridas em microtubos e maceradas em 140 μ L de tampão fosfato salino (PBS) com ajuda de pistilo, para extração dos ácidos nucleicos. Em seguida, serão centrifugados a 13000 rpm durante 15 minutos à temperatura de 4 °C, a fim de obter 140 μ L do sobrenadante que, por sua vez, serão tratados conforme os procedimentos do kit. Posteriormente, será verificada a qualidade e quantificação do RNA extraído utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000. Para detecção viral, será utilizado o Kit Multiplex XGEN MULTI ZDC (XG-ZDC- MB), seguindo as instruções de uso do fabricante. Será utilizado 15 μ L de RNA viral extraído. em cada amostra, será utilizado um controle interno para validar o processo de extração do RNA, além de controles positivos dos arbovírus e um controle negativo para garantir o sucesso das análises. Os resultados serão visualizados por meio do termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen®).

Identificação de *Plasmodium* spp. em *Anopheles* spp.

Para a identificação da presença de *Plasmodium* spp. em mosquitos *Anopheles* spp., será utilizado a cabeça de fêmeas da subfamília Anophelinae, considerando que caso seja detectado a presença do material genético do *Plasmodium* nesta região, o mosquito provavelmente já é capaz de transmitir o vetor. A cabeça das fêmeas será macerada e o material genético será extraído utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue Kit, da Quiagen, seguindo o protocolo do fabricante, conforme descrito acima. Para a amplificação do material genético será utilizado Nested PCR, visando o gene de RNA ribossômico da subunidade pequena (SSU rRNA) de *Plasmodium*, de acordo com o protocolo de Singh *et al.* (1999) e aplicado por Chua, *et al.* (2017). Para a primeira reação de PCR, será utilizado um par de primers, sendo rPLU1 (5' TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA 3') e rPLU5 (5' CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC 3'). Na segunda PCR, os primers utilizados foram rPLU3 (5' TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT 3') e rPLU4 (5' TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC 3'). Os produtos de PCR serão purificados, clonados e sequenciados utilizando oligonucleotídeos plasmidiais e primers internos. As sequências obtidas serão enviadas para o sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Setor de Sequenciamento de DNA da Universidade de São Paulo (USP) com sequências do GenBank usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). As sequências obtidas serão editadas utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.5 e alinhadas utilizando MUSCLE, conforme implementado no MEGA 6. A identificação das sequências será realizada por meio de comparação com sequências já depositadas no GenBank (construído e distribuído pelo *National Center of Biotechnology Information* – NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov) e no *Barcode of Life Data System* (BOLD: <http://www.barcodinglife.org>), que são bibliotecas que armazenam referências das sequências de DNA para muitas espécies conhecidas, permitindo análises de similaridade entre sequências alvo disponibilizadas nas plataformas. Os plasmódios serão considerados identificados quando a similaridade da sequência for $\geq 98\%$.

Análise de dados

Os índices utilizados para a análise de diversidade dos dados serão os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H), o índice de dominância de Simpson (C) e o índice de equabilidade de Pielou (J). O índice de Shannon-Wiener (H), mede o grau de incerteza em prever a espécie de um indivíduo escolhido ao acaso. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, menor diversidade. A diversidade tenderá a ser mais alta, quanto maior o valor do índice. O índice de dominância de Simpson reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem a mesma espécie. O índice varia de 0 a 1 e quanto mais próximo de 1, maior será a probabilidade de os indivíduos pertencerem a mesma espécie, ou seja, maior dominância e menor a diversidade. Já o índice de Pielou, relaciona a uniformidade com o padrão de distribuição dos indivíduos entre as espécies. É um índice calculado a partir do índice de Shannon, e seus resultados variam entre 0 e 1, onde quando maior ou igual a 0,5, considera-se que há uma distribuição uniforme de todas as espécies consideradas na amostra e com alta equabilidade.

REFERÊNCIAS

- Aiello, B. R. *et al.* Spatial Distribution of Campaniform Sensilla Mechanosensors on Wings: Form, Function, and Phylogeny. **Current Opinion in Insect Science**, vol. 48, 1 Dec. 2021, pp. 8–17, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.06.002> Accessed 16 Aug. 2023.
- Airs, P. M. *et al.* Characterizing Oogenesis and Programmed Cell Death in the Eastern Tree Hole Mosquito *Aedes (Protomacleaya) Triseriatus*. **Frontiers in Insect Science**, vol. 2, 16 Jan. 2023, Disponível em: <https://doi.org/10.3389/finsc.2022.1073308>. Accessed 24 Aug. 2023.
- Akhoundi, M. *et al.* Who Bites Me? A Tentative Discriminative Key to Diagnose Hematophagous Ectoparasites Biting Using Clinical Manifestations. **Diagnostics**, vol. 10, no. 5, 15 May 2020, pp. 308–308, Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050308>. Accessed 23 Aug. 2023.
- Alcaide, M. *et al.* Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7092, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007092>. Accessed 23 Aug. 2023.
- Almeida, M. A. B. *et al.* Detection of Antibodies against Icoaraci, Ilhéus, and Saint Louis Encephalitis Arboviruses during Yellow Fever Monitoring Surveillance in Non-Human Primates (*Alouatta Caraya*) in Southern Brazil. **Journal of Medical Primatology**, vol. 48, no. 4, 29 Apr. 2019, pp. 211–217, Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jmp.12417>. Accessed 5 Sept. 2023.
- Almire, F. *et al.* Sugar Feeding Protects against Arboviral Infection by Enhancing Gut Immunity in the Mosquito Vector *Aedes Aegypti*. **PLOS Pathogens**, vol. 17, no. 9, 2 Sept. 2021, pp. e1009870–e1009870, Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009870>. Accessed 31 Aug. 2023.
- Al-Rashidi, H. S. *et al.* Effects of Blood Meal Sources on the Biological Characteristics of *Aedes Aegypti* and *Culex Pipiens* (Diptera: Culicidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 29, no. 12, 1 Dec. 2022, pp. 103448–103448, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103448>. Accessed 19 Aug. 2023.
- Alonso, D. P. *et al.* Host Feeding Patterns of *Mansonia* (Diptera, Culicidae) in Rural Settlements near Porto Velho, State of Rondonia, Brazil. **Biomolecules**, vol. 13, no. 3, 17 Mar. 2023, pp. 553–553, Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom13030553>. Accessed 31 Aug. 2023.
- Alto, B. A. *et al.* Reproductive Biology and Susceptibility of Florida *Culex Coronator* to Infection with West Nile Virus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2021, Disponível em: www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2013.1501. Accessed 24 Aug. 2023.

- Araujo-Oliveira, A. *et al.* Monthly Abundance and Diversity of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest Area of Rio de Janeiro, Brazil. Vol. 60, no. 3, 10 Mar. 2023, pp. 443–452, **Journal of Medical Entomology** Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjad022>. Accessed 11 July 2023.
- Araujo, B. R. & Pinto, A. P. Dragonflies (Insecta: Odonata) from Mananciais da Serra, a Tropical-Araucaria Forest ecotonal remnant in the southern Atlantic Forest, state of Paraná, Brazil. **Zoologia**, v. 38, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/zool/a/WfpmhMfJLPkQgVHPP5gTN5k/?format=html&lang=en>>. Acesso em: 26 set. 2023.
- Arcà, B. *et al.* Anopheline Salivary Protein Genes and Gene Families: An Evolutionary Overview after the Whole Genome Sequence of Sixteen Anopheles Species. **BMC Genomics**, vol. 18, no. 1, 13 Feb. 2017, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3579-8>. Accessed 17 Aug. 2023.
- Asigau, S. *et al.* Assessing the Blood Meal Hosts of *Culex Quinquefasciatus* and *Aedes Taeniorhynchus* in Isla Santa Cruz, Galápagos. **Parasites & Vectors**, vol. 12, no. 1, 1 Dec. 2019, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3835-7>. Accessed 16 Aug. 2023.
- Baia-da-Silva, D. C. *et al.* Microanatomy of the American Malaria Vector *Anopheles Aquasalis* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) Midgut: Ultrastructural and Histochemical Observations. **Journal of Medical Entomology**, vol. 56, no. 6, 19 July 2019, pp. 1636–1649, Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz114>. Accessed 1 Sept. 2023.
- Barredo, E. & Degennaro, M. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 473–484, 2020. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(20\)30040-4#secst0015](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(20)30040-4#secst0015). Acesso em: 9 out. 2023.
- Barton, S. *et al.* The Mouthparts of Female Blood-Feeding Frog-Biting Midges (Corethrellidae, Diptera). **Insects**, vol. 14, no. 5, 13 May 2023, pp. 461–461, Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects14050461>. Accessed 23 Aug. 2023.
- Benton, R. The Neurobiology of Gustation in Insect Disease Vectors: Progress and Potential. **Current Opinion in Insect Science**, vol. 20, 1 Apr. 2017, pp. 19–27, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.02.003>. Accessed 21 Aug. 2023.
- Boissière, A. *et al.* Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles Gambiae* and Interactions with Plasmodium Falciparum Infection. **PLOS Pathogens**, vol. 8, no. 5, 31 May 2012, pp. e1002742–e1002742, Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002742>. Accessed 4 Sept. 2023.
- Borowczak, R. The Evolutionary Consequences of the Transition to Non-Blood Feeding in the Pitcher Plant Mosquito *Wyeomyia Smithii*. **Uoregon.edu**, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1794/22715>. Acesso em 10 jan. 2023.
- Bottino-Rojas, V. *et al.* Heme Signaling Impacts Global Gene Expression, Immunity

and Dengue Virus Infectivity in *Aedes Aegypti*. **PLOS ONE**, vol. 10, no. 8, 14 Aug. 2015, pp. e0135985–e0135985, Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135985>. Accessed 25 Aug. 2023.

Brasil. Ministério Da Saúde. **Febre Amarela**. 2023, Disponível em: www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-amarela. Accessed 11 July 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. **Epizootia**. 2019, Disponível em: www.portalsinan.saude.gov.br/epizootia. Accessed 11 July 2023.

Castro-Duarte, A. M. R. *et al.* Complexity of Malaria Transmission Dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases** Vol. 1, 1 Jan. 2021, pp. 100032–100032, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100032>. Accessed 11 July 2023.

Cebrián-Camisión, S. *et al.* A Literature Review of Host Feeding Patterns of Invasive *Aedes* Mosquitoes in Europe. **Insects**, vol. 11, no. 12, 29 Nov. 2020, pp. 848–848, Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects11120848>. Accessed 24 Aug. 2023.

Ceretti-Junior, W., *et al.* Diversity Analysis and an Updated List of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Found in Cantareira State Park, São Paulo, Brazil. **Acta Tropica** Vol. 212, 1 Dec. 2020, pp. 105669–105669, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105669>. Accessed 12 July 2023.

Champion, C. J. & Xu, J. The Impact of Metagenomic Interplay on the Mosquito Redox Homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 105, 1 Apr. 2017, pp. 79–85, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.031>. Accessed 5 Sept. 2023

Chikwendu, J. I. *et al.* Effects of host blood on fecundity and longevity of female *Anopheles* Mosquitoes. **International Journal of Pathogen Research**. p 1-7, 2019. Disponível em: [10.9734/ijpr/2019/v3i230091](https://doi.org/10.9734/ijpr/2019/v3i230091). Acessado em 5 set. 2023.

Chua, T. H. *et al.* Phylogenetic analysis of simian *Plasmodium* spp. infecting *Anopheles balabacensis* Baisas in Sabah, Malaysia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0005991–e0005991, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005991>. Acesso em: 16 out. 2023.

Coon, K. L, *et al.* Gut Bacteria Differentially Affect Egg Production in the Anautogenous Mosquito *Aedes Aegypti* and Facultatively Autogenous Mosquito *Aedes Atropalpus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, vol. 9, no. 1, 30 June 2016, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1660-9>. Accessed 4 Sept. 2023.

Couto-Lima, D. *et al.* Seasonal Population Dynamics of the Primary Yellow Fever Vector *Haemagogus Leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) Is Mainly Influenced by Temperature in the Atlantic Forest, Southeast Brazil. **Memórias di Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 115, 1 Jan. 2020, Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200218>. Accessed 11 July 2023.

- Cunha, M. S. *et al.* Genomic Evidence of Yellow Fever Virus in *Aedes Scapularis*, Southeastern Brazil, 2016. **Acta Tropica**, Vol. 205, 1 May 2020, pp. 105390–105390, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105390>. Accessed 11 July 2023.
- Dickerson, B. H. *et al.* Functional Diversity from Generic Encoding in Insect Campaniform Sensilla. **Current Opinion in Physiology**, vol. 19, 1 Feb. 2021, pp. 194–203, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.11.004>. Accessed 16 Aug. 2023.
- Donald, C. L., *et al.* Toxorhynchites Species: A Review of Current Knowledge. **Insects**, vol. 11, no. 11, 30 Oct. 2020, p. 747. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects11110747>. Acesso em 10 Jan. 2023.
- Farjana, T. & Tuno, N. Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, vol. 50, no. 4, 1 July 2013, pp. 838–846, Disponível em: <https://doi.org/10.1603/me12146>. Accessed 5 Sept. 2023.
- Foster, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. **Annual Review of Entomology**, v. 40, n. 1, p. 443–474, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7810991/>. Acesso em: 9 out. 2023.
- Freitas, L. & Nery, M. N. Expansions and Contractions in Gene Families of Independently-Evolved Blood-Feeding Insects. **BMC Evolutionary Biology**, vol. 20, no. 1, 17 July 2020, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01650-3>. Accessed 14 Aug. 2023.
- Gabiane, G. *et al.* Aedes Mosquitoes in the Emerging Threat of Urban Yellow Fever Transmission. **Reviews in Medical Virology**, Vol. 32, no. 4, 6 Feb. 2022, Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmv.2333>. Accessed 11 July 2023.
- Gaio, A. O. *et al.* Contribution of Midgut Bacteria to Blood Digestion and Egg Production in *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). **Parasites & Vectors**, vol. 4, no. 1, 14 June 2011, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-105>. Accessed 25 Aug. 2023.
- Godoy, R. S. M. *et al.* The Larval Midgut of Anopheles, Aedes, and Toxorhynchites Mosquitoes (Diptera, Culicidae): A Comparative Approach in Morphophysiology and Evolution. **Cell and Tissue Research**, vol. 393, no. 2, 5 June 2023, pp. 297–320, Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-023-03783-5>. Accessed 4 Sept. 2023.
- Guedes, M. L. P. & Navarro-Silva, M. A. Mosquito Community Composition in Dynamic Landscapes from the Atlantic Forest Biome (Diptera, Culicidae). **Medical and Veterinary Entomology**, Vol. 58, no. 1, 1 Mar. 2014, pp. 88–94, Disponível: <https://doi.org/10.1590/s0085-56262014000100014>. Accessed 12 July 2023.
- Hall-Mendelin, S. *et al.* Exploiting mosquito sugar feeding to detect mosquito-borne pathogens. **Applied Biological Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11255–11259, 2010. Disponível em:

<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1002040107>. Acesso em: 9 out. 2023.

- Han, B. *et al.* Two Insulin Receptors Coordinate Oogenesis and Oviposition via Two Pathways in the Green Lacewing, *Chrysopa Pallens*. **Journal of Insect Physiology**, vol. 123, 1 May 2020, pp. 104049–104049, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104049>. Accessed 24 Aug. 2023.
- Harrison, R. E. *et al.* Ad Libitum Consumption of Protein- or Peptide-Sucrose Solutions Stimulates Egg Formation by Prolonging the Vitellogenic Phase of Oogenesis in Anautogenous Mosquitoes. **Parasites & Vectors** Vol. 15, no. 1, 12 Apr. 2022, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05252-4>. Accessed 27 July 2023.
- Harrison, R. E. *et al.* Whole blood and blood components from vertebrates differentially affect egg formation in three species of anautogenous mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13071-021-04594-9>. Acesso em: 5 set. 2023.
- Isoe, J. *et al.* Molecular Genetic Analysis of Midgut Serine Proteases in *Aedes Aegypti* Mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 39, no. 12, 1 Dec. 2009, pp. 903–912, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.008>. Accessed 25 Aug. 2023.
- Jatuwattana, W. *et al.* Systematic Studies of Anopheles (Cellia) Kochi (Diptera: Culicidae): Morphology, Cytogenetics, Cross-Mating Experiments, Molecular Evidence and Susceptibility Level to Infection with Nocturnally Subperiodic *Brugia Malayi*. **Acta Tropica**, Vol. 205, 1 May 2020, pp. 105300–105300, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105300>. Accessed 28 July 2023.
- Keita, M. L. *et al.* Tabanids as Possible Pathogen Vectors in Senegal (West Africa). **Parasites & Vectors**, vol. 13, no. 1, 1 Oct. 2020, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04375-w>. Accessed 23 Aug. 2023.
- Krenn, H. W. & Aspöck, H. Form, Function and Evolution of the Mouthparts of Blood-Feeding Arthropoda. **Arthropod Structure & Development**, vol. 41, no. 2, 1 Mar. 2012, pp. 101–118, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.asd.2011.12.001>. Accessed 16 Aug. 2023.
- Lehane, M. J. **The biology of blood-sucking in insects**. 2° ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.
- Lima, K. C. S. *et al.* Incidência de Febre Amarela no Brasil: Uma Revisão. **Revista Saúde dos Vales.**, Vol. 1, no. 1, Disponível em: revista.unipacto.com.br/index.php/rsv/article/view/110/107. Accessed 11 Jul 2023.
- Lorenz, C, *et al.* Impact of Environmental Factors on Neglected Emerging Arboviral Diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, no. 9, 27 Sept. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005959>.

Accessed 9 Aug. 2023.

- McMeniman, C. J. *et al.* Multimodal Integration of Carbon Dioxide and Other Sensory Cues Drives Mosquito Attraction to Humans. **Cell**, vol. 156, no. 5, 1 Feb. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.044>. Accessed 22 Aug. 2023.
- Medeiros-Sousa, A. R. *et al.* A Mathematical Model for Zoonotic Transmission of Malaria in the Atlantic Forest: Exploring the Effects of Variations in Vector Abundance and Acrodendrophily. **PLOS Neglected Tropical Diseases** Vol. 15, no. 2, 16 Feb. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008736>. Accessed 12 July 2023.
- Mullen, G. R.; Durden, L. A. **Medical and Veterinary Entomology**. Starkville: Academic Press. 3^o ed. 2019.
- Müller, J. N. *et al.* Does Antennal Sensilla Pattern of Different Populations of *Triatoma Maculata* (Hemiptera: Reduviidae) Reveal Phenotypic Variability? **Parasites & Vectors**, 1 Dec. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3856-2>. Accessed 16 Aug. 2023.
- Nepomichene, T. N. J. J. *et al.* Species Diversity, Abundance, and Host Preferences of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Two Different Ecotypes of Madagascar with Recent RVFV Transmission. **Journal of Medical Entomology** Vol. 52, no. 5, 10 Aug. 2015, pp. 962–969, Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv120>. Accessed 31 July 2023.
- Orlandin, E. *et al.* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Crepuscular Period in an Atlantic Forest Area in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 77, no. 1, 1 Mar. 2017, pp. 60–67, Disponível em: www.https://doi.org/10.1590/1519-6984.09815. Accessed 16 Aug. 2023.
- Paraná. Dados meteorológicos Históricos e Atuais. **Instituto de Desenvolvimento rural do Paraná – IDR-PR**. 2023. Disponível em: <https://www.idrparana.pr.gov.br>. Acesso em: 04 jan 2023.
- Peach, D. A. H. & Matthews, B. J. Sensory Mechanisms for the Shift from Phytophagy to Haematophagy in Mosquitoes. **Current Opinion in Insect Science**, vol. 52, 1 Aug. 2022, pp. 100930–100930, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100930>. Accessed 5 Sept. 2023.
- Peterson, T. M. L. *et al.* Nitric Oxide Metabolites Induced in *Anopheles Stephensi* Control Malaria Parasite Infection. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 42, no. 1, 1 Jan. 2007, pp. 132–142, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.037>. Accessed 4 Sept. 2023.
- Pezzi, M. *et al.* Ultrastructural Characterization of Sensilla and Microtrichia on the Antenna of Female *Haematopota Pandazisi* (Diptera: Tabanidae). **Parasitology Research**, vol. 117, no. 4, 10 Feb. 2018, pp. 959–970, Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5760-7>. Accessed 16 Aug. 2023.

Phasomkusolsil, S. *et al.* Maintenance of Mosquito Vectors: Effects of Blood Source on Feeding, Survival, Fecundity, and Egg Hatching Rates. **Journal of Vector Ecology**, vol. 38, no. 1, 23 May 2013, pp. 38–45, Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12006.x>. Accessed 23 Aug. 2023.

Piraquara Prefeitura Municipal. **Mananciais da Serra e Reservatório do Carvalho abrem para visitas.** Disponível em: <https://www.piraquara.pr.gov.br/noticia/mananciais-da-serra-e-reservat-rio-do-carvalho-abrem-para-visita-es>. Acesso em: 26 set. 2023.

Powell, J. R.; Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V 8, p. 11-17, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>, acesso em: 26 set 2023.

Rivera-Perez, C. *et al.* How Micronutrients Influence the Physiology of Mosquitoes. Vol. 23, 1 Oct. 2017, pp. 112–117, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.07.002>. Accessed 27 July 2023.

Rucci, K. A. *et al.* Effects of Blood Meal Source and Seasonality on Reproductive Traits of *Culex Quinquesciatus* (Diptera: Culicidae). **BioRxiv**, 2 July 2023, Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2023.06.30.546984>. Accessed 24 Aug. 2023.

Saivish M. V. *et al.* Rocio Virus: An Updated View on an Elusive Flavivirus. **Viruses**, vol. 13, no. 11, 16 Nov. 2021, pp. 2293–2293, Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13112293>. Accessed 5 Sept. 2023.

Santos, C. S. *et al.* Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera: Culicidae) In urban and forested habitats in southern Brazil. **PLoS ONE**. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13112293>, acesso em: 24 aug 2023.

Santos, et al. Combination of Surveillance Tools Reveals That Yellow Fever Virus Can Remain in the Same Atlantic Forest Area at Least for Three Transmission Seasons. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 114, 1 Jan. 2019, Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076>. Accessed 30 Aug. 2023.

Silva, N. I. O. *et al.* Recent Sylvatic Yellow Fever Virus Transmission in Brazil: The News from an Old Disease. Vol. 17, no. 1, 23 Jan. 2020, **Virology Journal**, Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>. Accessed 11 July 2023.

SINGH, B. *et al.* A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 687–692, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.687>. Acesso em: 16 out. 2023.

Souza-Neto, J. A. *et al.* Sugar Digestion in Mosquitoes: Identification and Characterization of Three Midgut α -Glucosidases of the Neo-Tropical Malaria Vector *Anopheles Aquasalis* (Diptera: Culicidae). **Comparative Biochemistry**

and **Physiology A-Molecular & Integrative Physiology**, vol. 147, no. 4, 1 Aug. 2007, pp. 993–1000, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.008>. Accessed 31 Aug. 2023.

Sterkel, M. *et al.* The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. **Trends in Parasitology**, vol. 33, no. 8, 1 Aug. 2017, pp. 633–644, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.008>. Accessed 4 Sept. 2023.

Swevers, L. An Update on Ecdysone Signaling during Insect Oogenesis. **Current Opinion in Insect Science**, vol. 31, 1 Feb. 2019, pp. 8–13, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.07.003>. Accessed 24 Aug. 2023.

Tandina, F. *et al.* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and mosquito-borne diseases in Mali, West Africa. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3045-8>. Acesso em: 17 set. 2023.

Telang, A & Skinner, J. Effects of Host Blood Meal Source on Reproductive Output, Nutrient Reserves and Gut Microbiome of West Nile Virus Vector *Culex Quinqüefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, vol. 114, 1 Apr. 2019, pp. 15–22, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.02.001>. Accessed 19 Aug. 2023.

Veronesi, R. *et al.* Seasonal Pattern of Daily Activity of *Aedes Caspius*, *Aedes Detritus*, *Culex Modestus*, and *Culex Pipiens* in the Po Delta of Northern Italy and Significance for Vector-Borne Disease Risk Assessment. **Journal of Vector Ecology**, vol. 37, no. 1, 1 May 2012, pp. 49–61, Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00199.x>. Accessed 16 Aug. 2023.

Wayadande, A. *et al.* Waveforms From Stylet Probing of the Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Measured by AC–DC **Electropenetrography**, **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 2, p. 353–368, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz188>. Acesso em 04 set. 2023.

Whiten, S. R. *et al.* Ironing out the Details: Exploring the Role of Iron and Heme in Blood-Sucking Arthropods. **Frontiers in Physiology**, vol. 8, 17 Jan. 2018, Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01134>. Accessed 25 Aug. 2023.

Wilkerson, R. C. *et al.* **Mosquitoes of the World**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, V 1, 2021

Wolff, G. H. & Riffell, J. A. Olfaction, Experience and Neural Mechanisms Underlying Mosquito Host Preference. **The Journal of Experimental Biology**, vol. 221, no. 4, 15 Feb. 2018, Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.157131>. Accessed 21 Aug. 2023.

Zhou, X. *et al.* Divergent and Conserved Elements Comprise the Chemoreceptive Repertoire of the Nonblood-Feeding Mosquito *Toxorhynchites Amboinensis*. **Genome Biology and Evolution**, vol. 6, no. 10, Oct. 2014, pp. 2883–2896. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326137/>. Acesso em 10 Jan.

2023.



ePROTOCOLO



Documento: **Projetodoutorado_AnaCarolinaFelicioAlves.pdf**.

Assinatura Simples realizada por: **Ana Carolina Felicio Alves (XXX.336.109-XX)** em 18/12/2023 19:14 Local: CIDADAO.

Inserido ao protocolo **21.494.700-5** por: **Ana Carolina Felicio Alves** em: 18/12/2023 19:14.



Documento assinado nos termos do Art. 38 do Decreto Estadual nº 7304/2021.

A autenticidade deste documento pode ser validada no endereço:
<https://www.eprotocolo.pr.gov.br/spiweb/validarDocumento> com o código:
79c165955285b06bd2d2c8e9cedf8e7e.