



KAREN MONTEIRO MOY

ESTUDO DA POPULAÇÃO DE *Aedes albopictus* NA CIDADE DE
BELÉM

Belém
2017

KAREN MONTEIRO MOY

ESTUDO DA POPULAÇÃO DE *AEDES ALBOPICTUS* NA CIDADE DE
BELÉM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção de grau Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marcelo Rodriguez Málaga
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA.

Belém
2017

KAREN MONTEIRO MOY

ESTUDO DA POPULAÇÃO DE *Aedes albopictus* NA CIDADE DE
BELÉM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade
Biologia da Universidade Federal Do Pará, como requisito para a
obtenção de grau Bacharel em Biologia.

Data da Defesa: 13 de Abril de 2017

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marcelo Rodriguez Málaga
Departamento de Parasitologia, UFPA

Avaliador: Dr^a Ana de Nazaré Martins da Silva
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Avaliador: Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Laboratório de Virologia, UFPA

Belém
2017

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”
(Thomas Huxley)

A Deus, por ser a base de tudo em minha vida, aos meus pais e familiares pelo apoio contínuo e ao meu orientador por todo o incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela coragem e determinação que me concedeu nos momentos em que pensei em desistir, pela saúde e força para superar as dificuldades durante os anos de universitária e durante estes anos de vida e por todas as bênçãos que tem me concedido até hoje;

A toda a minha família e em especial aos meus pais (Katia e Charles) por todo o amor, apoio e incentivo incondicional para concluir mais esta fase da minha vida, por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, aos meus irmãos (Charles Jr. e Henrique) pelo amor e carinho;

Ao meu namorado (Rafael) pelo incentivo e apoio em todos os momentos durante estes anos, pelo conforto nos momentos de tristeza, pelo ombro amigo nos momentos de dificuldade e pelo companheirismo nos momentos de vitórias e por todo o amor, carinho, respeito e atenção durante estes anos;

A Universidade Federal do Pará por me proporcionar a oportunidade de realizar o curso;

Ao meu Orientador Dr. Sérgio Marcelo Rodriguez Málaga, pelo incentivo, apoio e dedicação durante estes anos no laboratório e por todos os conhecimentos repassados até hoje que levarei por toda a vida;

A todos do Laboratório de Parasitologia da UFPA, pelo companheirismo, experiências e competência, que faziam o trabalho do dia-a-dia mais tranquilo e prazeroso. Em especial a Dr. Ivoneide Maria da Silva e Ingrid Garcia pelo companheirismo durante coletas de campo e nos momentos de grande aprendizagem;

A todos os amigos da turma de Bacharelado 2013, pela companhia em todas as tardes de aula, pela união e companheirismo, e pelos muitos momentos de alegria que fizeram com que nos tornemos uma grande família durante todo o curso;

As amigas que se tornaram irmãs, Mitsue Harada, Sibebe Trindade, Thamires Oliveira, Lais Barbosa, Ana Nunes e Ana Laura por todo o carinho, amor, companheirismo, apoio e incentivo que fizeram com que estes anos fossem tão belos. Muito obrigada por cada dia juntas e por tudo que fizeram e fazem por mim;

O meu muito obrigado pelos meus mestres, que me deram a devida sabedoria de ser quem sou hoje a quem me lapidou com caprichos e atenção para que hoje eu pudesse finalizar uma das fases mais importantes da minha vida e que iram influenciar nas demais que ainda terei;

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que direta ou indiretamente colaboraram com minha caminhada até aqui.

Deus abençoe a todos.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 MORFOLOGIA DE <i>Aedes albopictus</i>	1
1.2 DISTRIBUIÇÃO DO <i>AE. ALBOPICTUS</i> E TIPOS DE CRIADOUROS PREFERENCIALMENTE FREQUENTADOS.....	2
1.3 DENGUE VIRUS (DENV), SUA TRANSMISSÃO VERTICAL (TRANSOVARIANA) E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	4
1.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>AE. ALBOPICTUS</i> E SEU PADRÃO ALIMENTAR.....	6
1.5 OBJETIVOS.....	8
1.5.1 OBJETIVO GERAL.....	8
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
2 – MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE INSETOS.....	9
2.2 COLETA E MANUTENÇÃO DE LARVAS E FÊMEAS INGURGITADAS.....	9
2.3 CAPTURA DE FÊMEAS INGURGITADAS.....	10
2.4 ISOLAMENTO DE RNA TOTAL DE <i>AE. ALBOPICTUS</i>	10
2.5 RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE CHAIN REACTION) PARA IDENTIFICAÇÃO DE DENV (VIRUS DENGUE)	11
2.6 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>AE. ALBOPICTUS</i>	12
2.7 REAÇÃO DE PCR PARA GENOTIPAGEM DE <i>AE. ALBOPICTUS</i> E ANÁLISE DE PADRÃO DE ALIMENTAÇÃO.....	12
2.8 ANÁLISES BIOINFORMÁTICA.....	13
3 – RESULTADOS	14
3.1 DISTRIBUIÇÃO E DENSIDADE POPULACIONAL DO VETOR <i>AE. ALBOPICTUS</i>	14
3.2 CARACTERIZAÇÕES GENÉTICA DOS MOSQUITOS <i>AE. ALBOPICTUS</i>	22
3.3 CARACTERIZAÇÕES DO PADRÃO DE ALIMENTAÇÃO DAS FÊMEAS ADULTAS DE <i>AE. ALBOPICTUS</i>	27
3.4 ISOLAMENTOS DE RNA DAS FÊMEAS DE <i>AE. ALBOPICTUS</i> E RT-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DO DENV.....	28
4 – DISCUSSÃO	31

5 – CONCLUSÃO.....	35
6 – REFERÊNCIAS.....	36

Lista de Figuras

- Figura 1.** Comparação morfológica entre *Ae. aegypti* (A) e *Ae. albopictus* (B) respectivamente em sua fase adulta, destacando o tórax com a disposição das faixas laterais em *Ae. aegypti* e faixa central em *Ae. albopictus* (Fonte: CDC - Centers of Disease Control and Prevention)... 2
- Figura 2.** Estados brasileiros que registraram *Aedes albopictus* durante 1986-1990 (cinza claro: Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo), 1991-2002 (cinza escuro: Amazonas, Rondônia, Pará, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), 2003-2014 (preto: Ceará, Tocantins, Roraima e Piauí), E aqueles sem registro (branco: Acre, Amapá e Sergipe) (Fonte: Pancetti et al., 2015)..... 3
- Figura 3.** Áreas de estudo: Universidade Federal do Pará (UFPA); Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG); Bosque Rodrigues Alves (BRA) e Parque Estadual do Utinga (PEUT)..... 9
- Figura 4.** Gráfico das espécies encontradas do primeiro período de coletas de larvas de mosquitos coletados no MPEG..... 15
- Figura 5.** Gráfico das espécies encontradas do primeiro período de coletas de larvas de mosquitos coletados na UFPA..... 16
- Figura 6.** Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados na UFPA..... 18
- Figura 7.** Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados no MPEG..... 19
- Figura 8.** Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados no BRA..... 20
- Figura 9.** Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados no PEUT..... 21

Figura 10. Gráfico do total de <i>Ae. Albopictus</i> , nos diferentes locais de coleta no segundo período de coletas.....	21
Figura 11. Gráfico geral das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos.....	22
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1.0%: amplificação da reação de PCR das amostras da UFPA, utilizando o gene ND5. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-15 com 1 indivíduo e C: controle.....	23
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1.0%: amplificação da reação de PCR das amostras do MPEG, utilizando o gene ND5. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-15 com 1 indivíduo e C: controle.....	23
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1.0%: amplificação da reação de PCR das amostras do BRA, utilizando o gene ND5. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-15 com 1 indivíduo e C: controle.....	23
Figura 15. Homologia dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo com o gene COI de <i>Aedes albopictus</i> . Na figura são mostrados os alinhamentos das sequencias de DNA dos oligonucleotídeos (Oligo) senso (A) e antisenso (B) com a sequência codificante do gene COI (AJ971008) e o contig derivado do genoma de <i>Aedes albopictus</i> . O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW e as sequencias editadas no programa GeneDoc.....	24
Figura 16. Amplificação do gene COI utilizando os oligonucleotídeos 1454 e 2160 (Zhong <i>et al.</i> , 2013). Na figura são mostrados o marcador de peso molecular (M), amplificação de amostras de DNA de mosquitos capturados (1-16) e controle negativo de reação (C-).....	25
Figura 17. Alinhamento da sequência do gene COI de <i>Ae. albopictus</i> capturados na cidade de Belém. Na figura é mostrado o alinhamento de sequencias de DNA do gene COI de mosquitos capturados na cidade de Belém (COI-T e COI-C), mostrando o SNP T/C (single nucleotide polymorphism) na posição 357. AeAlb-SP corresponde à sequência do gene COI de mosquitos capturados na cidade de São Paulo.....	26

- Figura 18.** Hipótese de Inferência Bayesianiana da filogenia de *Ae. albopictus* baseada na sequência do gene COI. As sequências do gene COI obtidas na cidade de Belém foram alinhadas junto com sequências do mesmo gene de diversas partes do mundo utilizando o programa ClustalW. A análise de inferência foi realizada com o programa MrBayes e a figura editada utilizando o programa FigTree..... 27
- Figura 19.** Determinação de padrão de alimentação de *Ae. albopictus* na cidade de Belém. Amostras amplificadas utilizando oligonucleotídeos para a detecção de sangue humano. Na figura são mostrados o marcador de peso molecular (M), amplificação de DNA de mosquitos ingurgitados (1-7), controle positivo (C+, DNA de mosquito alimentado com sangue humano), controle negativo (C-, DNA de mosquito não ingurgitado)..... 28
- Figura 20.** Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR. M: Marcador; 1: MPEG com 5 fêmeas; 2: UFPA com 1 fêmea; 3: MPEG com 5 fêmeas; 4: MPEG com 5 fêmeas; 5: MPEG com 2 fêmeas e C: controle..... 29
- Figura 21.** Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR das amostras da UFPA. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-10 com 5 fêmeas e C: controle..... 30
- Figura 22.** Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR de amostras do Museu. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-10 com 5 fêmeas e C: controle..... 30
- Figura 23.** Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR de amostras do Bosque. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-10 com 5 fêmeas e C: controle..... 30

RESUMO

No Brasil, os primeiros registros do mosquito *Aedes albopictus* foram na região sudeste, enquanto no Pará foi registrado por primeira vez em 2003 no município de Medicilândia, sendo considerado vetor secundário dos vírus da dengue e febre amarela. A colonização urbana dos mosquitos em regiões de clima temperado, bem como regiões tropicais e subtropicais, foi facilitada pela forte plasticidade biológica e comportamental deste inseto, como a capacidade de se proliferar em criadouros artificiais e naturais. O objetivo deste trabalho é estudar a ocorrência de *Aedes albopictus* da área urbana de Belém, assim como caracterizar geneticamente o mosquito e determinar os hábitos alimentares das fêmeas adultas, relacionando sua presença na área urbana com o risco de transmissão do vírus dengue. Para isso, foram realizadas coletas ativas de larvas e fêmeas ingurgitadas em quatro parques públicos da cidade de Belém, os quais apresentam níveis crescentes de antropização. As larvas coletadas foram mantidas para a identificação das espécies predominantes e o RNA total das fêmeas de *A. albopictus* foi analisado por RT-PCR para detecção da possível transmissão transovariana do vírus dengue. Por outro lado, as fêmeas ingurgitadas foram analisadas mediante PCR para determinar as fontes alimentares dos mosquitos. Conseguimos estabelecer que no período de estiagem, *Ae. albopictus* correspondeu a 32% dos indivíduos (37/113), entretanto, no período chuvoso, o *Ae. albopictus* correspondeu a 64% do total de indivíduos capturados (1.154/1.824). As análises realizadas para a detecção da transmissão transovariana de vírus dengue em *A. albopictus* foram negativas. Para a genotipagem de *Ae. albopictus*, foram utilizadas as sequências dos genes *COI* e *ND5*, com os quais conseguimos estabelecer que em 144 indivíduos analisados existiam duas populações de mosquito, uma correspondente a insetos de países tropicais e outra população correspondente a mosquitos de países de clima temperado, diferenciados pelo polimorfismo 357 (T/C) do fragmento amplificado. Com as análises de fonte alimentar, conseguimos estabelecer que este mosquito privilegia sua alimentação por sangue humano, ressaltando seu papel potencial na transmissão de arbovírus.

Palavras-chave: *Aedes albopictus*; vírus dengue e antropização.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MORFOLOGIA DE *Aedes albopictus*

O *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse 1894) (Diptera: Culicidae) foi primeiramente descrito na Índia em 1894. Mesmo pertencendo ao mesmo gênero, o *Aedes albopictus* pode ser facilmente diferenciado morfológicamente de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), tanto nas fases de ovo e larva, quanto na fase de adulto.

O *Ae. aegypti* em sua fase de ovo apresenta cório com desenhos e na fase larval possuem a cabeça com cerdas 5, 6 e 7 simples, o tórax com mesotorax e metatorax com espinhos laterais grandes e fortemente quitinizados e abdome com pécten do 8º segmento com dentes em forma de espinho agudo central acompanhado de outros de outros menores de ambos os lados; em sua fase de pupa apresenta em seu abdome nº 1 do primeiro segmento com tufos de pelos simples ou bífido, cerdas do nº 9 do oitavo segmento em forma de penacho com poucos pelos e palheta natatória com pelos curtos em sua borda, na fase adulta apresenta o tórax com o mesonoto recoberto de escamas escuras com desenhos em forma de lira de escamas branco-prateadas (Instituto Oswaldo Cruz, 2014).

O *Ae. albopictus* apresenta o ovo com projeções granulosas, na fase larval apresenta a cabeça com as cerdas 5, 6 e 7 bifurcadas, o tórax apresenta mesotorax e metatórax com espinhos laterais curtos e hialinos, o abdome com o pécten do 8º segmento com dentes longos em forma de espinho com base serrilhada, na fase de pupa o abdome possui o tufo da cerda nº 1 do primeiro segmento com grande quantidade de pelos com dicotomia, cerdas do nº 9 do oitavo segmento simples com pequenos pelos laterais e palheta natatória com franja de pelos longos em toda borda e em sua fase adulta o mesonoto é recoberto de escamas escuras com uma faixa mediana longitudinal de escamas branco-prateada (Instituto Oswaldo Cruz, 2014).

Estas comparações morfológicas podem ser melhor observadas na fase adulta destas espécies, em que são alvos de diversos estudos devido a relação com diversas epidemias de importância em saúde pública. (Figura 1)

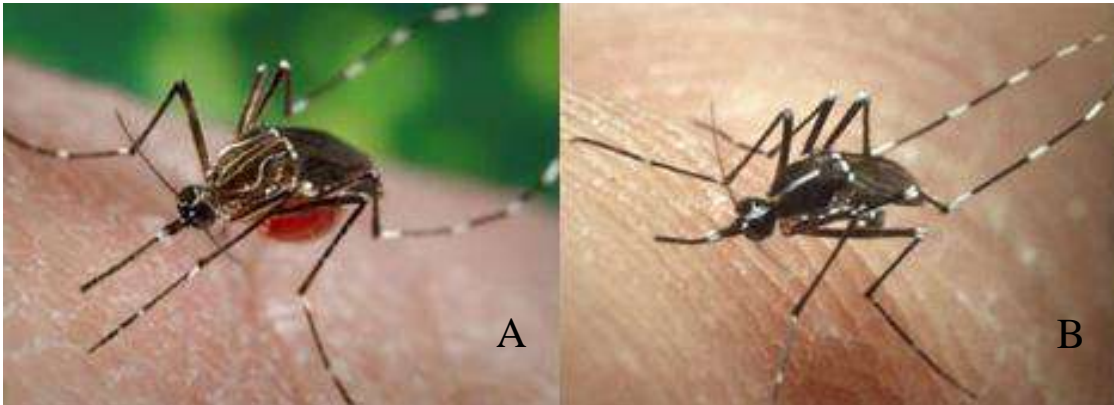


Figura 1: Comparação morfológica entre *Ae. aegypti* (A) e *Ae. albopictus* (B) respectivamente em sua fase adulta, destacando o tórax com a disposição das faixas laterais em *Ae. aegypti* e faixa central em *Ae. albopictus* (Fonte: CDC - Centers of Disease Control and Prevention, 2015)

1.2 DISTRIBUIÇÃO DO *AE. ALBOPICTUS* E TIPOS DE CRIADOUROS PREFERENCIALMENTE FREQUENTADOS

O *Aedes albopictus* possui uma distribuição mundial e, na atualidade, pode ser encontrado em diversos países, sendo considerado o principal mosquito invasor de novos habitats que participa na transmissão de arbovírus (Medlock *et al.*, 2012). No Brasil, o primeiro registro da presença de *Ae. albopictus* foi em 1986, nos Estados de Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Consoli & Lorenço-de-Oliveira, 1994), enquanto que no estado do Pará foi descrito por primeira vez no ano 2003, no município de Medicilândia, a 90 km de Altamira (Segura *et al.*, 2003) (Figura 2). É provável que, nas últimas décadas, o transporte passivo de ovos tenha favorecido a ampla dispersão desta espécie, promovido pelo tráfego intercontinental de produtos por rotas variadas, especialmente no começo da década de 1980 (Benedict *et al.*, 2007; Paupy *et al.* 2009).

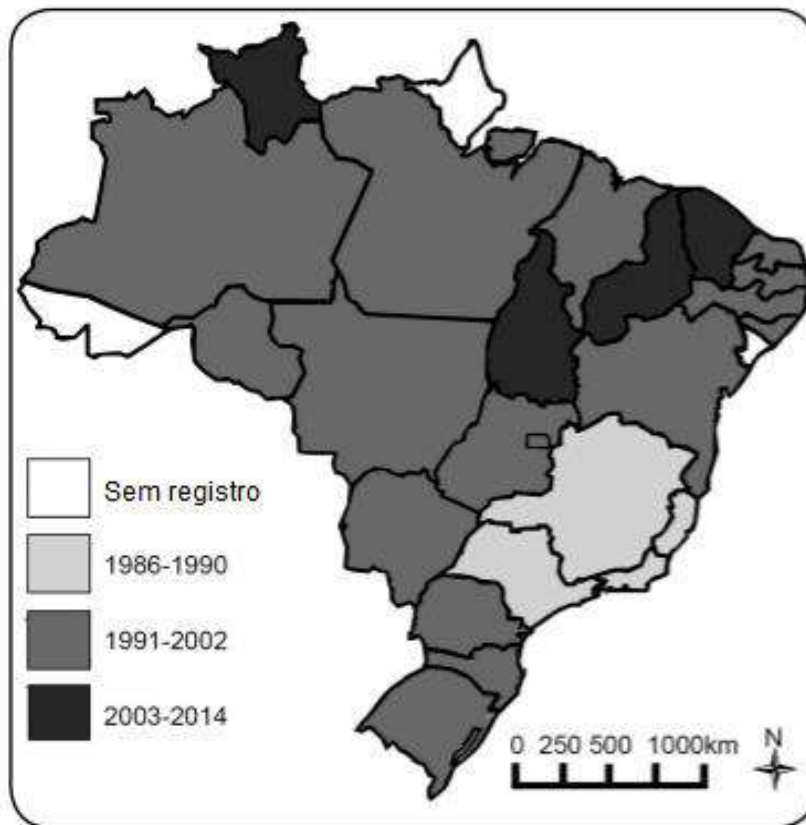


Figura 2. Estados brasileiros que registraram *Aedes albopictus* durante 1986-1990 (cinza claro: Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo), 1991-2002 (cinza escuro: Amazonas, Rondônia, Pará, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), 2003-2014 (preto: Ceará, Tocantins, Roraima e Piauí), E aqueles sem registro (branco: Acre, Amapá e Sergipe) (FONTE: Pancetti *et al.*, 2015)

A colonização de regiões de clima temperado, como a América do Norte e Europa, bem como regiões tropicais e subtropicais, como a América do Sul e África foi facilitada pela forte plasticidade biológica e comportamental do inseto, conseguindo utilizar uma variedade de reservatórios (artificiais e/ou naturais) para a postura de ovos e o desenvolvimento de larvas, além de apresentar uma alta competitividade na fase larval, resistência a baixas temperaturas dos adultos e capacidade de colonizar ambientes criados pelo homem (proximidade do ambiente doméstico) (Paupy *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2012; Lima-Camara *et al.*, 2013). Além destas características, se deve somar a habilidade que apresentam os ovos do mosquito de entrar em diapausa, permanecendo viáveis por longos períodos em ambiente secos e de baixa temperatura (Ramasamy *et al.*, 2011).

A adaptação do *Ae. albopictus* parte da teoria de que foi uma espécie selvagem que procriava e se alimentava nas margens das florestas, a qual conseguiu adaptar-se ao peridomicílio e intradomicílio nos diversos espaços urbanos e suburbanos (Gomes *et al.*, 2005). A partir de então, ele foi se expandindo pelo país, encontrando fontes de criadouros artificiais e naturais favoráveis à sua proliferação, sendo atualmente poucos estados brasileiros que ainda não registraram a sua presença (Aguilar *et al.*, 2008). Para ter êxito na colonização de novos ambientes, o *Ae. albopictus* tende a modificar o padrão da atividade hematofágica, considerada oportunista, passando assim a elevar os riscos de transmissão de doenças às populações humanas (Dieng *et al.*, 2010).

Quando comparados, *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* possuem aspectos biológicos semelhantes, como a plasticidade de seu desenvolvimento, que se refere a capacidade de se proliferar em diversos criadouros, sejam eles artificiais, que incluem uma série de recipientes produzidos pela ação antrópica, os quais incluem tanques, calhas, jarros decorativos, pneus descartados, sucatas de veículos e de eletrodomésticos, entulhos da construção civil, vasos de cemitérios e recipientes plásticos (Forattini *et al.*, 1986; Honório & Lourenço de-Oliveira, 2001) ou criadouros naturais, que se referem a bromélias, ocos de árvores, axilas de folhas, cascas de frutas e internódios de bambus (Gomes & Marques, 1988).

1.3 DENGUE VIRUS (DENV) E SUA TRANSMISSÃO VERTICAL (TRANSOVARIANA) E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Atualmente, a Dengue se destaca como a principal arbovirose de importância em saúde pública (Henriques, 2008), sua distribuição geográfica tem predomínio nas regiões tropicais e subtropicais e está diretamente associada com a distribuição geográfica do inseto vetor, onde os surtos dessa doença tendem a ser mais comuns nos períodos quentes e chuvosos do ano (Blair *et al.*, 2000).

A Dengue é uma doença infecciosa causada por um vírus transmitido através da picada da fêmea de mosquitos hematófagos do gênero *Ae. aegypti*, que é um grave problema na esfera da saúde, ambiental e econômica nas Américas (Gubler & Clark, 1995). Entretanto, o *Ae. albopictus* tem sido considerado um vetor secundário do vírus da dengue, pois este apresenta em sua estrutura características morfológicas

semelhantes e a mesma capacidade de proliferação do *Ae. aegypti* (Instituto Oswaldo Cruz, 2008).

O *Ae. albopictus* é responsável por alguns surtos de dengue no continente asiático (Instituto Oswaldo Cruz, 2008), região na qual a dengue é considerada endêmica e, nos últimos 20 anos, tem se intensificado e se propagado para países tropicais do sul do Pacífico, África Oriental, Ilhas do Caribe e América Latina (Gubler, 1998). Nesse território, *Ae. albopictus* recebe a denominação de “Tigre Asiático”, pois é um culicídeo nativo das florestas do sudeste asiático na qual se expandiu e se estabeleceu em muitos países do mundo, inclusive no Sul da América (Benedict *et al.*, 2007; Paupy *et al.*, 2009).

O agente etiológico da DF é pertencente ao grupo B dos arbovírus, família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, sendo a espécie dengue vírus (DENV) (CDC - Centers of Disease Control and Prevention, 2012). O genoma do vírus apresenta 10 genes dispostos em uma única fase aberta de leitura (*open reading frame-ORF*) que codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (Burke & Monath, 2001; Dyer *et al.*, 2007). O DENV possui um envoltório lipoproteico com morfologia esférica de 50 nm de diâmetro. O capsídeo é composto pela proteína C e o envelope contém duas proteínas codificadas pelo vírus (glicoproteína envelope, E, e a proteína da membrana, M), que são as proteínas estruturais (Trabulsi & Alterhum, 2008). Essas proteínas compõem o seu genoma juntamente com sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) o qual é constituído por RNA linear de fita simples com polaridade positiva (+ssRNA) com cerca de 11 kb de tamanho (Gubler, 1998).

O DENV é classificado em quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4) antigenicamente distintos, que permite que, ao haver uma infecção primária com um dos quatro sorotipos, seja gerada uma imunidade sorotipo específico, porém, se haver uma infecção secundária com um sorotipo diferente, tem um risco aumentado de desenvolver a dengue hemorrágica (DHF) (Rodríguez *et al.*, 2012).

Nos últimos 50 anos, estudos sobre a dengue tem alcançado grandes avanços, porem há necessidade de se entender a manutenção do vírus da dengue em natureza durante a ausência de hospedeiros invertebrados ou quando as condições climáticas não são favoráveis à atividade dos mosquitos vetores. Diversos estudos sugerem que em condições naturais o mosquito *Ae. aegypti* é mais eficiente na transmissão transovariana do DENV (Martins *et al.*, 2012), entretanto, em condições laboratoriais

Ae. albopictus é considerado susceptível em realizar a transmissão transovariana ou vertical dos quatro sorotipos do vírus da dengue (Rosen *et al.*, 1983). Por outro lado, *Ae. albopictus* mostrou-se capaz de possibilitar ao vírus DENV1 o mecanismo de ultrapassar o período de inverno e manter o ciclo de vida em períodos inter-epidemias, favorecendo a contínua proliferação do vírus (Bosio *et al.*, 1992). Estudos realizados no Brasil para se reconhecer a possível infecção pelo vírus da dengue através da transmissão transovariana, demonstraram que a captura de larvas de *Ae. albopictus* coletadas na área urbana da cidade de Fortaleza (Ceará) (Martins *et al.*, 2012), assim como na cidade de Santos (São Paulo) (Figueiredo *et al.*, 2010), obtiveram resultado positivo aos sorotipos da dengue.

No ano de 2015 foram registrados 1.688.688 casos de dengue no Brasil (Ministério da Saúde, 2015), sendo que no estado do Pará foram 4.780 casos confirmados, um aumento de 48,35% em relação ao mesmo período do ano de 2014, quando foram registradas 3.222 ocorrências. Dos 13 municípios paraenses com maior ocorrência da dengue, Belém liderou no ranking, com 1.156 casos confirmados, seguido por Parauapebas (369), Altamira (257), Senador José Porfírio (184), Canaã dos Carajás (148), Alenquer (128), Ananindeua (118), Breves (115), Marabá (72) e Santarém (32) (SESPA-Secretaria de Estado de Saúde Pública, 2015). No ano de 2016 foram registrados 1.500.535 casos de dengue (Ministério da Saúde, 2016), sendo contabilizados 6.202 casos de dengue, 2.654 de zika e 668 de febre chikungunya. As maiores ocorrências de dengue aparecem nos municípios de Belém (561 casos), Dom Eliseu (482), Marabá (460), Alenquer (440), Itaituba (313), Oriximiná (301), Parauapebas (298), Tucuruí (290), Pacajá (221) e Novo Progresso (220). Os municípios com maior número de casos de zika são Belém, Marituba e Rio Maria, e de chikungunya são Capanema, Belém e Dom Eliseu (SESPA-Secretaria de Estado de Saúde Pública, 2016).

1.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *AE. ALBOPICTUS* E SEU PADRÃO ALIMENTAR

Ae. albopictus tem sido caracterizado como uma espécie oportunista que realiza seu repasto sanguíneo preferencialmente em hospedeiros mamíferos, tais como bovinos, cães e humanos (Sullivan *et al.*, 1971), ao mesmo tempo em que as fêmeas também podem fazê-lo em répteis, aves e anfíbios (Scholte & Schaffner,

2007). Tal plasticidade alimentar, a qual varia de acordo com a origem geográfica de suas populações, maximiza a sua fecundidade e a sua sobrevivência, elevando os riscos de propagação de patógenos zoonóticos do ambiente selvagem ou de animais domésticos para o homem (Gubler, 2003; Dellate *et al.*, 2010).

Análises de amostras sanguíneas provenientes de mosquitos coletados em campo e provenientes de experimentos de escolha de hospedeiros para o repasto revelaram que, quando dispõe de oportunidade, *Ae. albopictus* prefere picar humanos em detrimento de outros animais (Valerio *et al.*, 2010). Em estudo realizado por Kamgang *et al.*, (2012), em Yaoundé, Camarões, observou-se que 93,5 % dos espécimes de *Ae. albopictus* capturados apresentaram traços de sangue humano em seus intestinos, sugerindo uma preferência por este tipo de hospedeiro, corroborando as observações feitas na Tailândia (Ponlawat & Harrington, 2005), nos Estados Unidos (Richards *et al.* 2006), na Itália (Valerio *et al.*, 2010), e em La Réunion (Dellate *et al.*, 2010).

Além da preferência por determinados hospedeiros, a intensidade do contato humano-mosquito e, portanto, o risco de transmissão de patógenos, é modulada pelos períodos em que ocorrem as investidas de repasto. As fêmeas de *Ae. albopictus* geralmente realizam seus repastos durante o dia (de 7:00 h às 18:00 h, com pico entre às 14:00 h e 15:00 h) e no peridomicílio (Paupy *et al.*, 2009).

Um estudo realizado na Malásia, observou que *Ae. albopictus* exibiu uma elevada atividade hematofágica no período da noite, quando comparado com o *Ae. aegypti*, revelando um curto tempo de repasto e um maior sucesso em obter a alimentação sanguínea. Tal período é considerado o de maior vulnerabilidade dos indivíduos em relação à resposta de defesa ao repasto do mosquito (Dieng *et al.*, 2010).

Quando estudada a genética do *Ae. albopictus*, segundo Kamgang *et al.*, (2011), não foi encontrada nenhuma relação entre distância genética e geográfica, sugerindo que a estrutura genética do mosquito tem sido moldada por fatores bióticos ou abióticos adicionais. Análise de sequências de DNA mitocondrial revelou a existência de quatro haplótipos para cada um dos genes *COI* e *ND5*, com um haplótipo dominante presente em todas as amostras do estudo, conseguindo estabelecer uma diferença genética entre os mosquitos de áreas temperadas e tropicais (Kamgang, *et al.*, 2011). Estudos destinados a caracterizar quais eram as espécies de animais utilizadas pelo mosquito para realizar a hematofagia de insetos em áreas temperadas,

conseguiu estabelecer que estes insetos se alimentam preferencialmente de sangue de humanos, demonstrando o alto risco causado pela presença deste mosquito para a transmissão de vírus dengue e chikunguya (Faraji *et al.*, 2014).

Finalmente, em estudos anteriores, nosso laboratório conseguiu coletar e identificar larvas e mosquitos adultos de *Ae. albopictus* na área urbana de Belém e, por outro lado, foi observado em alguns estudos a significativa antropofilia do *Ae. albopictus*, relacionada a sua capacidade de transitar em ambientes urbanos e periurbanos, transformando este vetor em um importante fator de risco para a transmissão do agente etiológico da dengue, levando em consideração seu padrão alimentar e sua estrutura genética com relação a sua distribuição geográfica. Diante disto, este trabalho pretende estudar a população de *Ae. albopictus* presentes nos parques públicos da cidade de Belém, e seu possível papel na transmissão do vírus dengue nesta cidade.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a ocorrência de *Aedes albopictus* na área urbana de Belém, identificando as suas características biológicas e genéticas além de verificar a transmissão transovariana do Vírus da Dengue (DENV) na população desse mosquito.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a distribuição da população de *Ae. albopictus* em quatro fragmentos florestais da cidade de Belém;
- b) Identificar qual o criadouro o *Ae. albopictus* se adaptou na área urbana de Belém;
- c) Isolar e identificar o *Dengue virus* (DENV) dos mosquitos adultos criados no insetário do Laboratório de Parasitologia Médica da Universidade Federal do Pará, verificando a potencial transmissão transovariana do vírus dengue;
- d) Analisar o genótipo de *Ae. albopictus* dos fragmentos florestais que foram capturados da cidade de Belém
- e) Caracterizar o padrão de alimentação através da captura de fêmeas ingurgitadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1 ÁREAS DE ESTUDO E COLETA DE INSETOS

As coletas foram realizadas em fragmentos florestais da cidade de Belém que possuem diferentes níveis de antropização. A Universidade Federal do Pará (UFPA) com intensa circulação de pessoas diariamente, sendo o local de maior nível de antropização; o Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e o Bosque Rodrigues Alves (BRA), ambos com nível de antropização intermediário, que são constituídos de um ambiente semi-preservedo recebendo visitas de pessoas durante seis dias da semana e o Parque Estadual do Utinga (PEUT) que correspondeu ao local com maior nível de preservação, pois é uma Unidade de Conservação Estadual criada com o objetivo de preservar ecossistemas naturais de grande relevância ecológica (Figura 3).



Figura 3. Áreas de estudo: Universidade Federal do Pará (UFPA); Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG); Bosque Rodrigues Alves (BRA) e Parque Estadual do Utinga (PEUT).

2.2 COLETA E MANUTENÇÃO DE LARVAS DE MOSQUITOS

Foram realizadas três coletas ativas em cada um dos quatro fragmentos florestais, com o auxílio de pipeta Pasteur plástica de ponta larga em frascos plásticos de 100 ml com tampa rosca e foram realizadas por um período de uma hora (09:00-10:00). Foram verificados diversos criadouros naturais e artificiais nos locais de coleta e junto com as larvas, também se coletou água do criadouro, os quais foram

transportados para o Laboratório de Parasitologia no ICB-UFPA. As larvas de mosquitos capturadas foram transferidas para uma bacia plástica de 500 mL, onde foi acrescentado 200 mL de água de clorada. As larvas foram alimentadas com ração (TetraMin Tropical Flakes) macerada e foram mantidas em condições favoráveis para seu desenvolvimento, incluindo temperatura entre 26°C e 28°C e umidade entre 70% a 80%. Ao chegar à fase de pupa, foram transferidas para um recipiente plástico de 200 mL e colocadas em uma gaiola teladas até alcançarem a fase adulta. Após o término da fase de desenvolvimento foi realizada a identificação de todas as espécies de mosquitos adultos conforme a literatura específica.

2.3 CAPTURA DE FÊMEAS INGURGITADAS

Foram realizadas três coletas ativas no horário 15:00-17:00 em três fragmentos florestais da cidade de Belém: Universidade Federal do Pará (UFPA), Museu Emílio Goeldi (MPEG) e no Bosque Rodrigues Alves (BRA), locais em que anteriormente foi observado a presença de larvas de *Ae. albopictus*. As coletas foram realizadas utilizando rede de captura (puçá) e transferidas para frascos de tampa rosca as quais foram transportadas para o Laboratório de Parasitologia no ICB-UFPA, as fêmeas de *Ae. albopictus* com material ingurgitado presente em seu trato digestivo conforme identificação por análise visual utilizando lupa ótica, foram devidamente processadas.

2.4 ISOLAMENTOS DE RNA TOTAL DE *AE. ALBOPICTUS*.

Fêmeas de *Ae. albopictus* derivadas das larvas capturadas foram separadas em grupos de até 5 indivíduos, mortas por congelamento e colocadas em tubos de 1.5 ml. O RNA total de cada grupo de mosquitos foi purificado utilizando Trizol LS (Introgen) seguindo o protocolo do fabricante. Em cada uma das amostras adicionou-se 500 µl de reagente Trizol LS, em seguida os mosquitos foram macerados utilizando pistilo de polipropileno estéril. Após esse procedimento adicionou-se mais 500 µl de reagente Trizol LS, 200 µl de clorofórmio e submeteu-os à agitação por um minuto. Os tubos foram deixados em repouso durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram submetidas a centrifugação a uma velocidade de 12.000 rpm durante 15 minutos em uma temperatura de 4°C, onde houve a separação da fase aquosa (RNA), intermediária (DNA) e fenólica (proteína). A fase

aquosa de cada uma das amostras foi transferida para tubos novos, nos quais foram adicionados 500 µl de isopropanol. As amostras foram agitadas e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse procedimento, os tubos foram submetidos a mesma centrifugação. Depois do procedimento o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado foi lavado por centrifugação utilizando 500 µl de etanol 70%. O sobrenadante foi descartado deixando apenas o pellet de RNA secar durante 10 minutos a temperatura ambiente. O RNA foi ressuspensos em 50 µl de água livre de RNase e congelado no freezer a -20°C até o próximo procedimento.

2.5 RT-PCR (*REVERSE TRANSCRIPTASE CHAIN REACTION*) PARA IDENTIFICAÇÃO DE DENV (VÍRUS DENGUE)

Em todas as reações foi utilizado 5,0 µg de RNA total de cada uma das amostras de *Ae albopictus*. A reação foi realizada utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para a síntese do cDNA foi utilizado iniciador hexâmetro randômico (Invitrogen). Após a obtenção do cDNA, cada amostra foi amplificada utilizando oligonucleotídeos específicos para a detecção dos quatro sorotipos do vírus dengue (Lanciotti *et al.*, 1992) e enzima Platinum Taq polimerase (Invitrogen) (Tabela 1). Como controle positivo foram utilizados RNA purificado dos quatro sorotipos do vírus dengue fornecidos gentilmente pela professora Maria Izabel Florindo Guedes do Laboratório de Bioquímica Humana da Universidade Estadual do Ceará. Os resultados foram analisados por meio da observação da amplificadas em eletroforese em gel de agarose a 1.5%.

Tabela 1. Oligonucleotídeos descritos por Lanciotti *et al.*, 1992.

PRIMER (INICIADORES)	SEQUENCIA
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'

2.6 ISOLAMENTOS DE DNA GENÔMICO DE *AE. ALBOPICTUS*

Para o isolamento do DNA genômico de *Ae. albopictus* foram utilizadas, fêmeas ingurgitadas e fêmeas derivadas de larvas coletadas, as quais foram mortas por congelamento e colocadas individualmente em tubos de 1,5 ml. Os mosquitos foram macerados utilizando pistilo de polipropileno estéril e o DNA genômico purificado utilizando a fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% e o DNA estocado em freezer a -20°C.

2.7 REAÇÕES DE PCR PARA GENOTIPAGEM DE *AE. ALBOPICTUS* E ANÁLISE DE PADRÃO DE ALIMENTAÇÃO

Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando Platinum Taq polimerase (Invitrogen) com temperatura de anelamento adequada para cada oligonucleotídeo. Os fragmentos amplificados dos genes *COI* e *ND5* foram sequenciados e observados por análises de bioinformática. Para as reações foram utilizados os oligonucleotídeos descritos Chang *et al.*, 2008 e Kamgang *et al.*, 2011. (Tabela 2)

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para determinação de padrão de alimentação de *Aedes albopictus* coletados nos quatro fragmentos florestais, descritos por Chang *et al.*, 2008; Kamgang *et al.*, 2011.

AVIAN-F	GACTGTGACAAAATCCCNTTCCA
AVIAN-R	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC
MAMMALIAN-F	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG
MAMMALIAN-R	TGTAGTTRTCWGGGTCHCCTA
CHICKEN-F	GGGACACCCTCCCCCTTAATGACA
CHICKEN-R	GGAGGGCTGGAAGAAGGAGTG
PIG-F	GCCTAAATCTCCCCTCAATGGTA
PIG-R	ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG
CAT-F	TTCTCAGGATATACCCTTGACA
CAT-R	GAAAGAGCCCATTGAGGAAATC
DOG-F	GAACTAGGTCAGCCCGGTA
DOG-R	CGGAGCACCAATTATTAACGGC
HUMAN-F	TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC
HUMAN-R	TATGCGGGGAAACGCCATATCG
MONKEY-F	CCTCTTTCCTGCTGCTAATG
MONKEY-R	TTTGATACTGGGATATGGCG
RAT-F	CGGCCACCCAGAAGTGACATC
RAT-R	GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG
COI-F	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTC
COI-R	CCCGGTAAAATTAATAAACTTC
ND5-F	TCCTTAGAATAAAATCCCGC
ND5-R	GTTTCTGCTTTAGTTCATTCTTC

2.8 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.

Os genes *COI* e *ND5* amplificados de *Ae. albopictus* foram submetidos a sequenciamento automático e as sequências analisadas manualmente utilizando o pacote do programa DNASTar Lasergene. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa ClustalW e editadas utilizando o programa Genedoc. As análises de inferência bayesiana foram realizadas utilizando o programa MrBayes.

3 RESULTADOS

3.1 DISTRIBUIÇÃO E DENSIDADE POPULACIONAL DO VETOR *AE.ALBOPICTUS* E CRIADOUROS IDENTIFICADOS

Neste período (23 de setembro a 1 de outubro de 2014) conseguiu-se realizar a captura de larvas somente no MPEG e na UFPA. A relação dos dados obtidos a partir da coleta de larvas de mosquitos nos diferentes ambientes está apresentada na Tabela 3. Como mostrado, foi confirmada a presença do *Ae. albopictus*, nos dois ambientes avaliados. Entretanto, no MPEG houve a presença de larvas de *Ae. albopictus* apenas em poças de água depositada em bambuzais. Observou-se também a coexistência de larvas de *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Culex spp.* e *Limatus durhamii* no MPEG, enquanto que na UFPA observou-se a coexistência de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* desenvolvendo-se nos mesmos criadouros. Quanto à coexistência de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* no mesmo criadouro observou-se o uma tendência a um número maior de *Ae. albopictus* nos dois ambientes (Tabela 3). No MPEG observou-se mais indivíduos fêmeas, enquanto na UFPA houve a presença maior de machos.

Tabela 3. Larvas coletadas no MPEG e UFPA no período de 23 de setembro a 1 de outubro de 2014.

Espécies	Museu Paraense Emílio Goeldi						UFPA			Total Geral
	Bambu			Lago das tartarugas			Bambu			
	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	Total	
<i>Anopheles rangeli</i>	0	0	0	9	9	18	0	0	0	18
<i>Aedes albopictus</i>	8	19	27	0	0	0	9	1	10	37
<i>Aedes aegypti</i>	0	2	2	0	0	0	2	0	2	4
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>Culex spp1.</i>	1	2	3	0	0	0	0	0	0	3
<i>Culex spp2.</i>	0	0	0	4	7	11	0	0	0	11
<i>Limatus durhamii</i>	0	39	39	0	0	0	0	0	0	39
Total	9	62	71	14	16	30	11	1	12	113
Nº de Gênero	2	2	4	2	2	4	1	1	2	10
Nº de Espécies	2	4	6	3	2	5	2	1	3	14

No período de estiagem, foi observado que no MPEG a espécie de maior predominância foi o *Limatus durhamii*, com 38% do total de indivíduos capturados,

seguido pelo *Ae. albopictus* com 27%. Enquanto a espécie *Culex quinquefasciatus* obteve o menor valor quantitativo comparado as demais espécies capturadas (Figura 4).

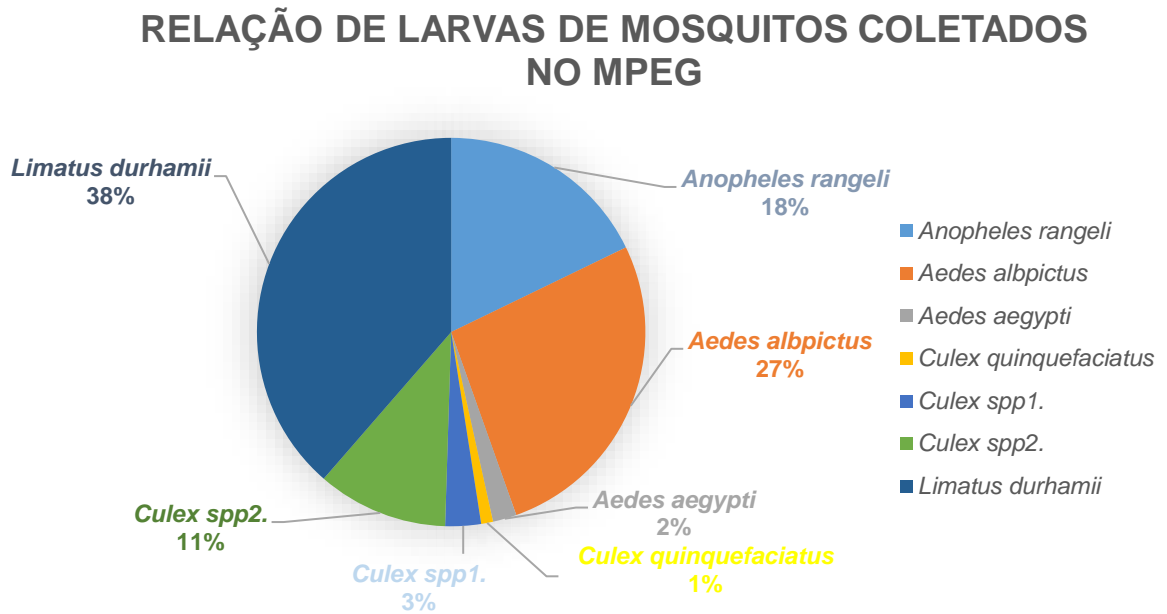


Figura 4. Gráfico das espécies encontradas no primeiro período de coletas de larvas de mosquitos coletados no MPEG.

A partir das coletas efetuadas na UFPA no período seco, foram obtidos apenas 12 espécimes (Tabela 3), dos quais 83% deles correspondiam a *Ae. albopictus*, sendo a espécie predominante, enquanto que o restante dos indivíduos (7%) correspondia a *Ae. aegypti*. Entretanto, vale ressaltar que o valor percentual obtido é consequente da baixa variabilidade de espécies encontradas neste local durante este período de seca e do baixo valor quantitativo obtido de cada espécie capturada (Figura 5).

RELAÇÃO DE LARVAS DE MOSQUITOS COLETADOS NA UFPA

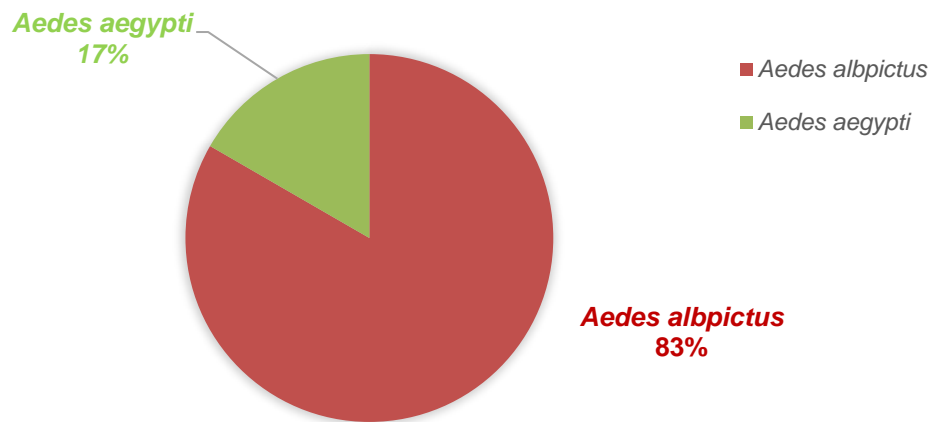


Figura 5. Gráfico das espécies encontradas do primeiro período de coletas de larvas de mosquitos coletados na UFPA.

Os dados obtidos no segundo período (16 de Março a 5 de Maio de 2015) de coletas são apresentados na Tabela 4. Neste período, o maior número de larvas foi obtido nos bambuzais cortados que apresentavam acúmulo de água em três das áreas estudadas (UFPA, MPEG e BRA), onde foi confirmado a presença de *Ae. albopictus*, indicando a preferência por este criadouro. No Parque Estadual do Utinga, foi possível a coleta em troncos de árvores e em poças de água às bordas do parque, onde foi confirmada a presença de *Ae. albopictus*, porém não houve uma quantidade significativa em relação aos outros locais de coleta, não permitindo o isolamento de RNA de fêmeas do mosquito.

Neste período, com o alto índice de chuva, foi possível observar uma maior quantidade de larvas (1.824) e uma maior riqueza de espécies (18 espécies), quando comparado com as coletas realizadas no período de estiagem. Do total de larvas coletadas, o maior número de indivíduos correspondeu a mosquitos *Ae. albopictus* com 1.154 mosquitos (63%) (Tabela 4).

Tabela 4. Larvas coletadas na UFPA; MPEG; BRA e PEUT no período de 16 de Março a 5 de Maio de 2015.

Espécies	UFPA			MPEG			BRA			PEUT			Total Geral
	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	Total	
<i>Aedes aegypti</i>	2	4	6	1	4	5	10	12	22	0	1	1	34
<i>Aedes albopictus</i>	137	208	345	73	86	159	304	342	646	1	3	4	1154
<i>Culex spp.</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	2
<i>Culex carrollia</i>	0	0	0	2	1	3	0	0	0	0	0	0	3
<i>Culex coronator</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48	52	100	100
<i>Culex melanoconion</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	102	128	230	230
<i>Deinocerites spp.</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	2
<i>Deinocerites aporonoma</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Flebotomíneo</i>	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Limatus durhamii</i>	0	3	3	0	117	117	0	53	53	0	26	26	199
<i>Limatus flavisetosus</i>	0	1	1	0	65	65	1	5	6	0	0	0	72
<i>Ocherotatus argyrothorax</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
<i>Ocherotatus septemstriatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4	4
<i>Sabethes spp.</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Uranotaenia spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Wyeomyia spp.</i>	0	2	2	0	6	6	0	0	0	0	0	0	8
<i>Wyeomyia aporonoma</i>	0	1	1	0	3	3	0	0	0	0	0	0	4
Total	139	226	365	77	284	361	315	412	727	156	215	371	1824
Nº de Gênero	1	5	6	3	5	8	2	2	4	4	5	9	27
Nº de Espécies	2	8	10	4	9	13	3	4	7	7	8	15	45

Quando foi analisada a abundância de mosquitos em cada uma das áreas estudadas, conseguimos estabelecer que *Ae. albopictus* apresenta uma preferência por locais de maior antropização quando comparado a áreas mais preservadas.

Na UFPA, sendo o local mais antropizado, com pequenas porções de vegetação (bosques) que estão distribuídas entres os Campus em que existe uma alta circulação diária de pessoas, foi observado o maior número de larvas de *Ae. albopictus*, chegando a 95% do total de larvas coletadas, sendo que as demais espécies encontradas obtiveram valor igual ou menor a 2% do total de indivíduos (Figura 6). Sendo assim, em comparação ao primeiro período de coletas neste local, também foi obtido um maior número de *Ae. albopictus*, em relação as outras espécies.

RELAÇÃO DE LARVAS DE MOSQUITOS COLETADOS NA UFPA

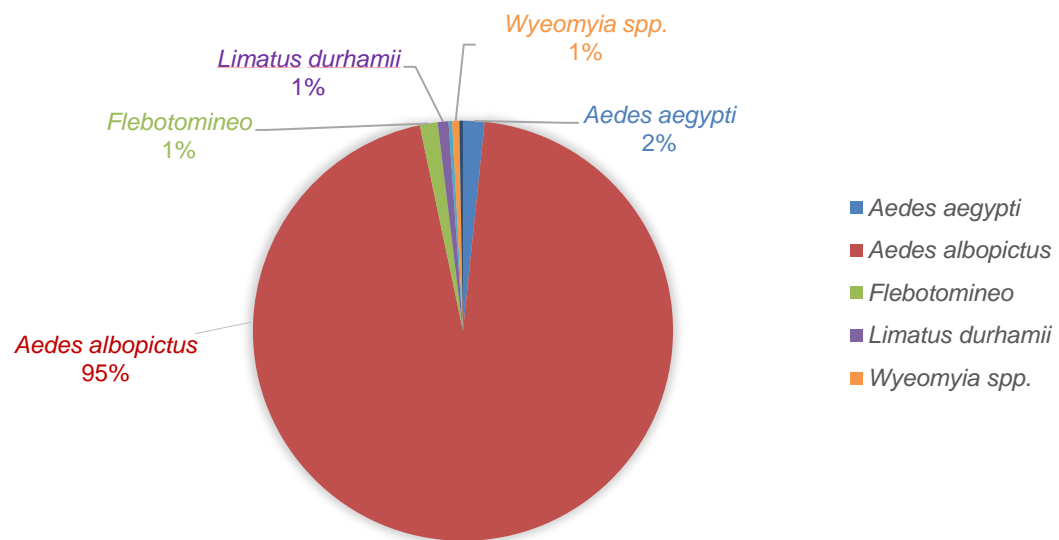


Figura 6. Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados na UFPA.

No MPEG, considerado um ambiente preservado que possui circulação de pessoas durante o período da manhã ao período da tarde (Terça-feira a Domingo), possui menor influência antrópica quando comparado com a UFPA. Neste ambiente, foi possível observar que a porcentagem de larvas de *Ae. Albopictus* correspondia a 44% do total de espécies coletadas, entretanto houve a coexistência com 33% de *Limatus durhamii*, e 18% de *Limatus flavisetosus*. As demais espécies obtiveram valor igual ou menor de 2% (Figura 7). Sendo assim, em comparação ao período de estiagem, também foi possível verificar a coexistência de *Ae. Albopictus* e *Limatus durhamii*, porém a segunda espécie foi encontrada em maior número.

RELAÇÃO DE LARVAS DE MOSQUITOS COLETADOS NO MPEG

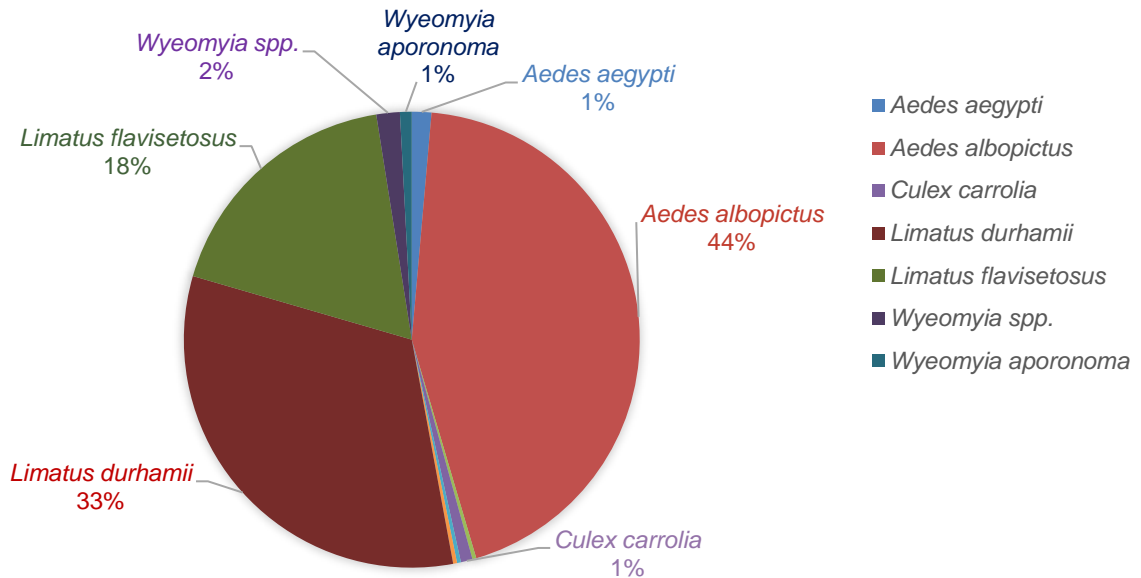


Figura 7. Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados no MPEG.

No BRA, um ambiente semelhante ao MPEG, local em que também há circulação de pessoas durante o período da manhã e no período da tarde (Terça-feira a Domingo), foi possível verificar que *Ae. albopictus* correspondia a 89% das larvas coletadas e, assim como no MPEG, houve a coexistência com *Limatus durhamii*, que alcançou somente a 7% do total de indivíduos coletados. As demais espécies obtiveram valor igual ou menor a 3% (Figura 8). Devemos destacar que foi observado em este local a menor diversidade de espécies encontradas em relação aos outros ambientes de coleta durante o período de chuvas (Tabela 2).

RELAÇÃO DE LARVAS DE MOSQUITOS COLETADOS NO BRA

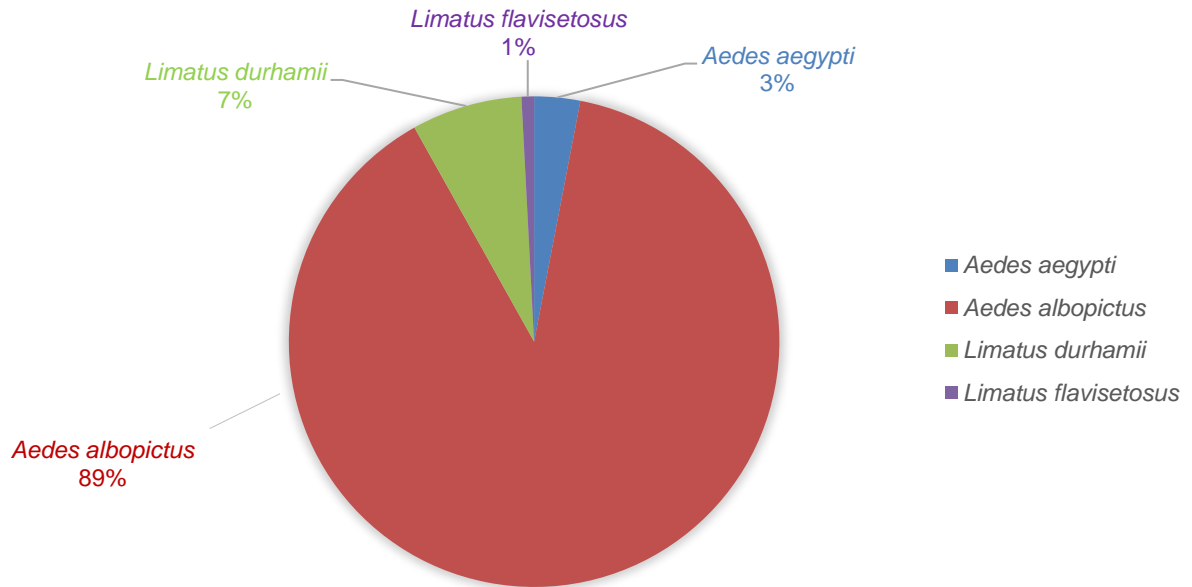


Figura 8. Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados no Bosque Rodrigues Alves.

No PEUT, um dos locais com maior extensão de floresta preservada, possui circulação de pessoas, porém com menor influência direta, e está situado entre os municípios de Belém e Ananindeua. As coletas neste local foram realizadas somente na região correspondente ao município de Belém. Neste ambiente, foi observado um maior número de *Culex quinquefasciatus*, com 62% do total de espécies, sendo que houve uma coexistência de *Culex coronator*, com 27% e *Limatus durhamii* com 7%, as demais espécies obtiveram valor igual ou menor a 1%. No entanto, neste ambiente obtivemos a menor número de *Ae. albopictus* (1%), quando comparado aos outros ambientes de coleta (Figura 9).

RELAÇÃO DE LARVAS DE MOSQUITOS COLETADOS NO PEUT

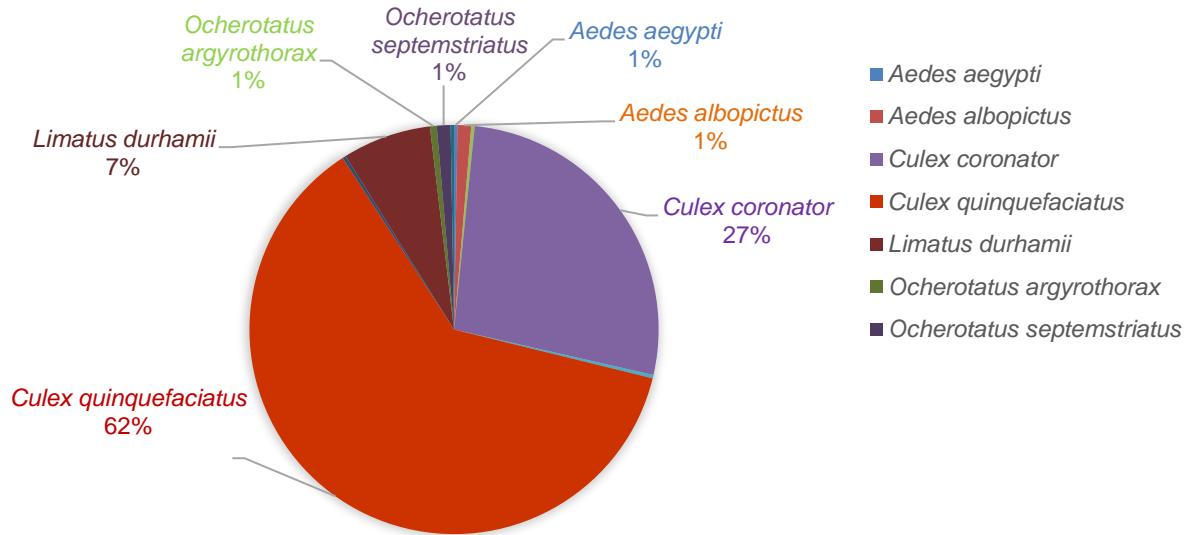


Figura 9. Gráfico das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos coletados no PEUT.

Quando somados o número total de larvas de *Ae. albopictus* coletadas no período de chuvas, foi possível observar um maior número de indivíduos no BRA (56%), seguido pela UFPA (30%) e MPEG (14%), e finalmente, no PEUT foi obtido valor inferior a 1% (Figura 10).

TOTAL DE AEDES ALBOPICTUS NO PERIODO CHUVOSO

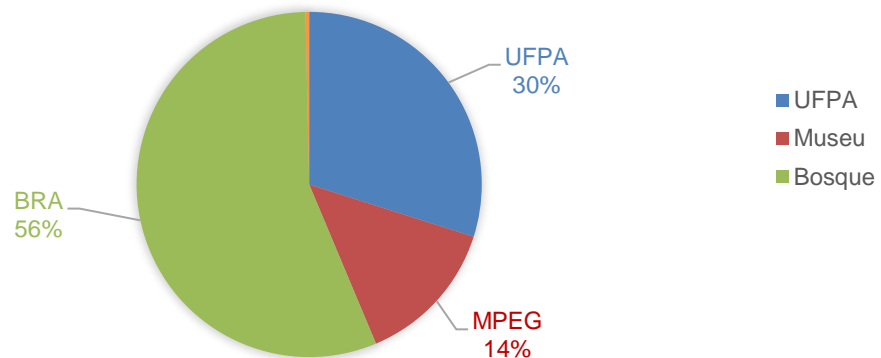


Figura 10. Gráfico do total de *Ae. Albopictus*, nos diferentes locais de coleta no segundo período de coletas

Em resumo, podemos observar que *Ae. albopictus* foi a espécie mais abundante nas áreas de coleta (63%), privilegiando como criadouros os bambuzais presentes nesses locais. Precisa ser destacado que *Ae. aegypti*, teve uma frequência menor, não alcançando 2% das larvas coletadas.

RELAÇÃO GERAL DAS LARVAS DE MOSQUITO

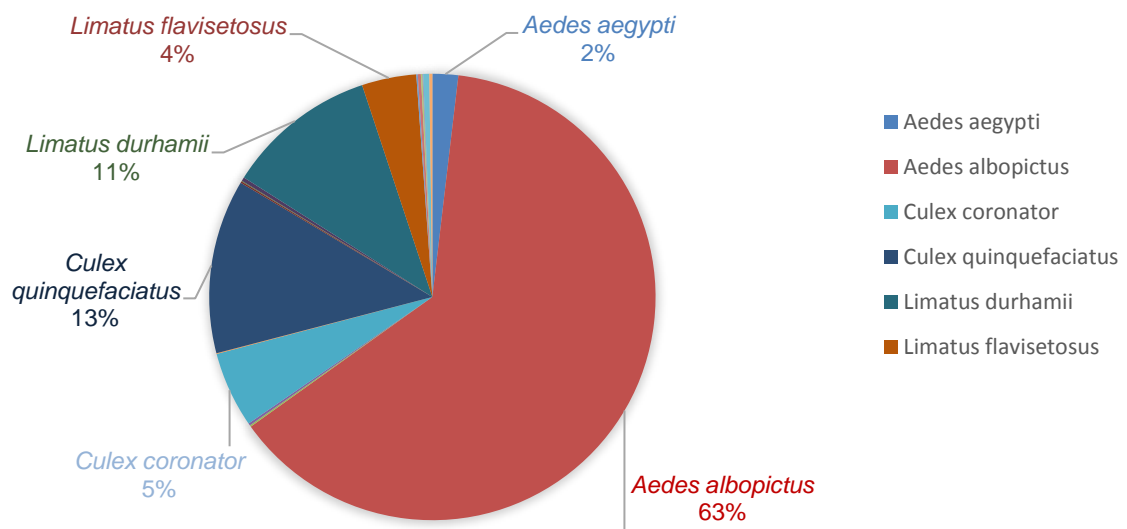


Figura 11. Gráfico geral das espécies encontradas do segundo período de coletas de larvas de mosquitos.

3.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS MOSQUITOS *AE. ALBOPICTUS*

Para tentar caracterizar geneticamente a população de mosquitos *Ae. albopictus* presentes na cidade de Belém, foram utilizados dois oligonucleotídeos descritos para este fim e que amplificam uma porção dos genes mitocondriais COI e ND5 (Kamgang *et al.*, 2011). Para isso foram utilizados o DNA genômico dos mosquitos identificados a partir das larvas capturadas nos parques públicos deste estudo.

Em nossa primeira tentativa para a obtenção das sequências do gene COI, foi obtida amplificação positiva em somente 7 amostras da UFPA, 9 amostras do MPEG e 14 amostras do BRA, mostrando que a sequência dos oligonucleotídeos utilizados

não conseguia reconhecer todas as amostras dos mosquitos capturados. (Figura 12, 13 e 14).

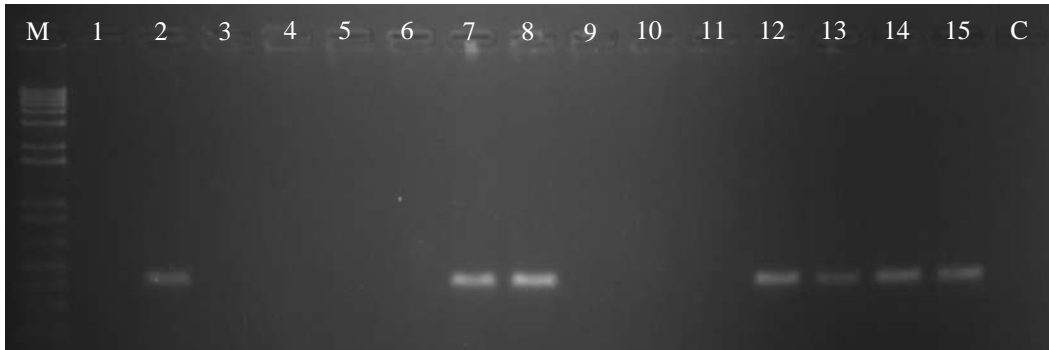


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1.0%: amplificação da reação de PCR das amostras da Universidade Federal do Pará, utilizando o gene ND5. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-15 com 1 indivíduo e C: controle.



Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1.0%: amplificação da reação de PCR das amostras do Museu Paraense Emilio Goeldi, utilizando o gene ND5. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-15 com 1 indivíduo e C: controle.

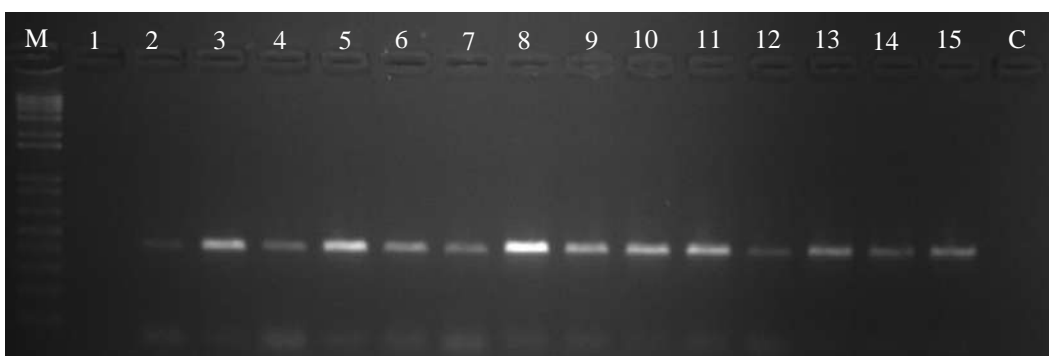


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1.0%: amplificação da reação de PCR das amostras do Bosque Rodrigues Alves, utilizando o gene ND5. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-15 com 1 indivíduo e C: controle.

As análises realizadas com as sequencias de DNA dos fragmentos purificados conseguiram demonstrar que os oligonucleotídeos utilizados amplificaram um fragmento intergênico não relacionado com o gene *COI*, demonstrando a ligação inespecífica dos iniciadores utilizados.

Para tentar explicar esta inespecificidade, foi realizada a análise em bancos de dados das sequencias dos oligonucleotídeos descritos por Kamgang *et al.* (2011), os quais foram utilizados em nosso estudo. Estes resultados demonstraram que, em realidade, os oligonucleotídeos correspondiam a sequencias dos genes *COI* e *ND5* de *Aedes aegypti*, apresentando somente 88% de homologia no oligonucleotídeo senso e 71% de homologia no oligonucleotídeo antisenso com os genes de *Ae. albopictus* (Figura 15).



Figura 15. Homologia dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo com o gene *COI* de *Aedes albopictus*. Na figura são mostrados os alinhamentos das sequencias de DNA dos oligonucleotídeos (Oligo) senso (A) e antisenso (B) com a sequência codificante do gene *COI* (AJ971008) e o contig derivado do genoma de *Aedes albopictus*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW e as sequencias editadas no programa GeneDoc.

Baseados nestes resultados, foram testados diversos protocolos de amplificação por PCR modificando tanto a concentração de cloreto de magnésio, quanto a temperatura de anelamento na reação. Em todos protocolos utilizados o resultado foi negativo, sendo mostrado como ausência de amplificação ou amplificação de sequencias não relacionadas (Tabela 4).

Tabela 5. Descrição dos protocolos de PCR utilizados com os oligonucleotídeos COI F e R.

Temperatura	MgCl ₂	Resultado	Temperatura	MgCl ₂	Resultado
54°C	0,5 mM	Negativo	45°C	0,5 mM	Negativo
54°C	1,0 mM	Negativo	50°C	0,5 mM	Negativo
54°C	2,5 mM	Negativo	52°C	0,5 mM	Negativo

Baseados nestes resultados foram solicitados novos oligonucleotídeos baseados no trabalho de Zhong *et al.* (2013) com os quais foram amplificadas as amostras de DNA dos mosquitos capturados. Como mostrado na figura 16, os novos oligonucleotídeos conseguiram amplificar uma amplificação específica de fragmento de aproximadamente 700 pares de bases o qual foi destinado para sequenciamento (Figura 16).

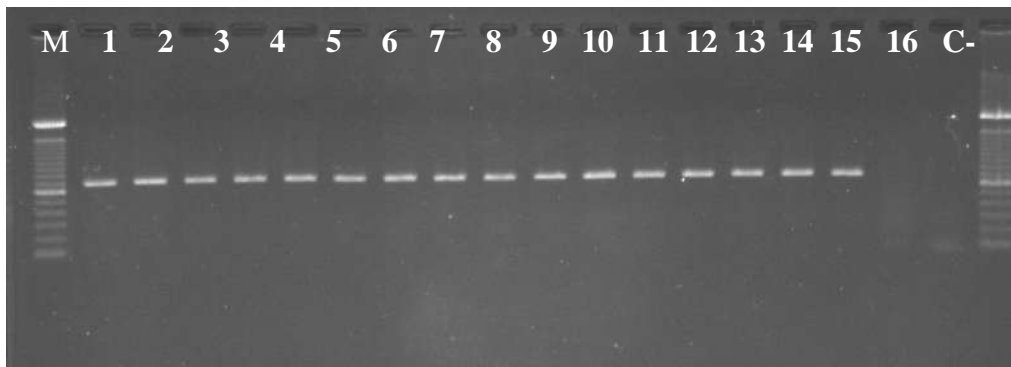


Figura 16. Amplificação do gene *COI* utilizando os oligonucleotídeos 1454 e 2160 (Zhong *et al.*, 2013). Na figura são mostrados o marcador de peso molecular (M), amplificação de amostras de DNA de mosquitos capturados (1-16) e controle negativo de reação (C-).

Com este novo set de oligonucleotídeos foram realizadas 144 sequências com as quais foram obtidos, de forma íntegra, fragmentos de em média 600 pares de base com os quais conseguimos estabelecer, após o alinhamento destas sequências, a existência de somente um polimorfismo na posição 357 (T/C) separando duas populações de mosquitos, onde o polimorfismo T está presente somente em três das amostras analisadas (COI-T), destacando que o restante das amostras (141) apresentavam o polimorfismo C (COI-C). Quando as sequências foram comparadas às provenientes de amostras de mosquitos capturados em São Paulo, conseguimos

observar que tais mosquitos apresentam o mesmo polimorfismo C na posição 357 apresentado nas amostras de mosquitos de Belém (Figura 17).

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100
COI-T : AAAGATATTGGAACATTATACCTTTATTTTCGGTATTTGATCTGGAATAGTCGGAACCTCACAAGAGTTTAAATTCGATTGAACCTAGACATCCTGGTATATT : 104
COI-C : AAAGATATTGGAACATTATACCTTTATTTTCGGTATTTGATCTGGAATAGTCGGAACCTCACAAGAGTTTAAATTCGATTGAACCTAGACATCCTGGTATATT : 104
AeAlb-SP : AAAGATATTGGAACATTATACCTTTATTTTCGGTATTTGATCTGGAATAGTCGGAACCTCACAAGAGTTTAAATTCGATTGAACCTAGACATCCTGGTATATT : 104
AAAGATATTGGAACATTATACCTTTATTTTCGGTATTTGATCTGGAATAGTCGGAACCTCACAAGAGTTTAAATTCGATTGAACCTAGACATCCTGGTATATT

*          120         *          140         *          160         *          180         *          200
COI-T : TATTGGAAATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTATTAATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATCATAATTGGAGGATTTGGAAACTGAC : 208
COI-C : TATTGGAAATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTATTAATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATCATAATTGGAGGATTTGGAAACTGAC : 208
AeAlb-SP : TATTGGAAATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTATTAATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATCATAATTGGAGGATTTGGAAACTGAC : 208
TATTGGAAATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTATTAATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATCATAATTGGAGGATTTGGAAACTGAC

*          220         *          240         *          260         *          280         *          300         *
COI-T : TAGTACCCCTTAATACTAGGAGCCCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATAAGTTTGTGAATATTACCCCCCTCTTAACACTGCTGCTTTCAGTTCT : 312
COI-C : TAGTACCCCTTAATACTAGGAGCCCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATAAGTTTGTGAATATTACCCCCCTCTTAACACTGCTGCTTTCAGTTCT : 312
AeAlb-SP : TAGTACCCCTTAATACTAGGAGCCCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATAAGTTTGTGAATATTACCCCCCTCTTAACACTGCTGCTTTCAGTTCT : 312
TAGTACCCCTTAATACTAGGAGCCCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATAAGTTTGTGAATATTACCCCCCTCTTAACACTGCTGCTTTCAGTTCT

*          320         *          340         *          360         *          380         *          400         *
COI-T : ATAGTAGAAAACGGAGCTGGAACAGGGTGAACGGTTTATCCTCCCTTTCTTCTGGAACAGCTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATTTAGCAATTTTCTTTACA : 416
COI-C : ATAGTAGAAAACGGAGCTGGAACAGGGTGAACGGTTTATCCTCCCTTTCTTCTGGAACAGCTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATTTAGCAATTTTCTTTACA : 416
AeAlb-SP : ATAGTAGAAAACGGAGCTGGAACAGGGTGAACGGTTTATCCTCCCTTTCTTCTGGAACAGCTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATTTAGCAATTTTCTTTACA : 416
ATAGTAGAAAACGGAGCTGGAACAGGGTGAACGGTTTATCCTCCCTTTCTTCTGGAACAGCTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATTTAGCAATTTTCTTTACA

*          420         *          440         *          460         *          480         *          500         *          520
COI-T : TTTAGCGGGAACTCATCTATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACGTAAATTAATATACGATCAGCTGGTATTACTCTTGATCGACTACCTTTAATTGTGT : 520
COI-C : TTTAGCGGGAACTCATCTATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACGTAAATTAATATACGATCAGCTGGTATTACTCTTGATCGACTACCTTTAATTGTGT : 520
AeAlb-SP : TTTAGCGGGAACTCATCTATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACGTAAATTAATATACGATCAGCTGGTATTACTCTTGATCGACTACCTTTAATTGTGT : 520
TTTAGCGGGAACTCATCTATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACGTAAATTAATATACGATCAGCTGGTATTACTCTTGATCGACTACCTTTAATTGTGT

*          540         *          560         *          580         *          600         *          620
COI-T : GATCAGTAGTAATTACAGCTATTTTATTACTTCTTCTCACCCTGATTAGCCGGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATTTAAATACATCTTT : 620
COI-C : GATCAGTAGTAATTACAGCTATTTTATTACTTCTTCTCACCCTGATTAGCCGGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATTTAAATACATCTTT : 620
AeAlb-SP : GATCAGTAGTAATTACAGCTATTTTATTACTTCTTCTCACCCTGATTAGCCGGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATTTAAATACATCTTT : 620
GATCAGTAGTAATTACAGCTATTTTATTACTTCTTCTCACCCTGATTAGCCGGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATTTAAATACATCTTT

```

Figura 17. Alinhamento da sequência do gene *COI* de *Ae. albopictus* capturados na cidade de Belém. Na figura é mostrado o alinhamento de sequências de DNA do gene *COI* de mosquitos capturados na cidade de Belém (COI-T e COI-C), mostrando o SNP T/C (*single nucleotide polymorphism*) na posição 357. AeAlb-SP corresponde à sequência do gene *COI* de mosquitos capturados na cidade de São Paulo.

Para tentar caracterizar as duas populações de *Ae. albopictus* achadas na cidade de Belém, foi realizada uma análise de inferência Bayesiana das sequências descritas neste estudo, junto com sequências obtidas em bancos de dados correspondentes a mosquitos presentes em outras cidades do Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, São Luiz) e de sequências descritas nas Américas, Ásia, Europa e Oceano Índico. Com esta análise conseguimos observar que o haplótipo mais frequente do nosso estudo (COI-C) consegue se agrupar com isolados do Brasil e outros países de clima tropical, enquanto que o haplótipo menos frequente (COI-T) é agrupado com isolados de países de clima temperado (Figura 18). A baixa qualidade das sequências obtidas com os oligonucleotídeos *ND5* não permitiu realizar as análises descritas para o gene *COI*.

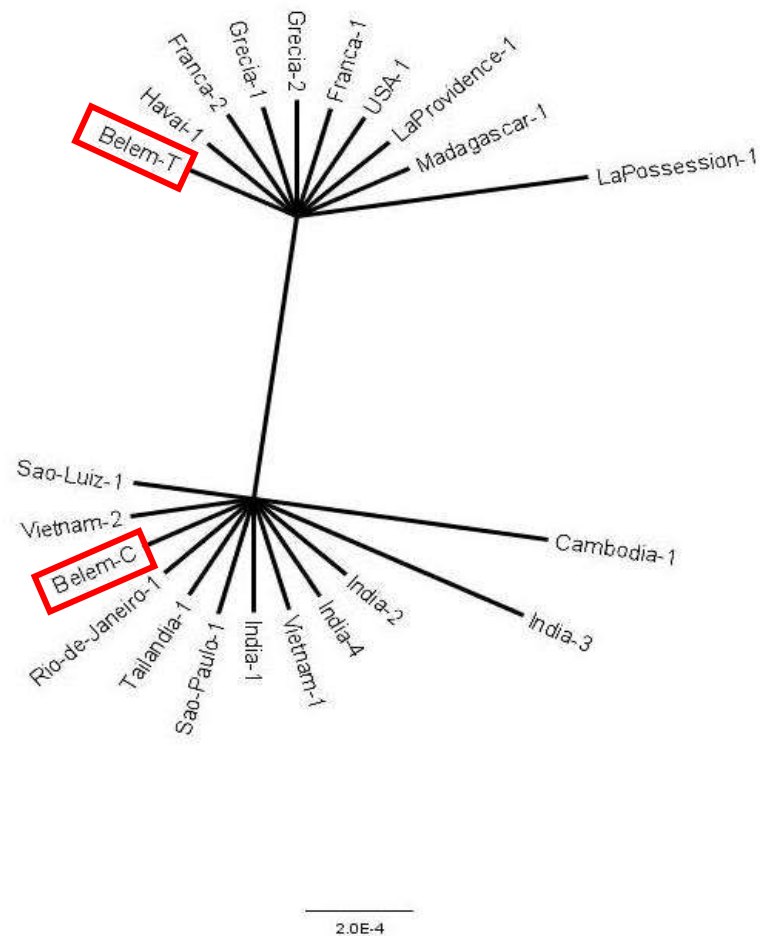


Figura 18. Hipótese de Inferência Bayesiana da filogenia de *Ae. albopictus* baseada na sequência do gene *COI*. As sequências do gene *COI* obtidas na cidade de Belém fora alinhadas junto com sequências do mesmo gene de diversas partes do mundo utilizando o programa ClustalW. A análise de inferência foi realizada com o programa MrBayes e a figura editada utilizando o programa FigTree.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE ALIMENTAÇÃO DAS FÊMEAS ADULTAS DE *AE. ALBOPICTUS*

Para estes estudos foram realizadas cinco coletas ativas de mosquitos adultos nas três áreas de estudo, resultando em 356 mosquitos capturados, dos quais 7 se apresentaram ingurgitados (1,96%). O DNA total de estes mosquitos foi purificado e usado para amplificação por PCR utilizando os oligonucleotídeos que determinam o

padrão de alimentação. Nas sete amostras de mosquitos ingurgitados foi detectado a presença de sangue humano (Figura 19). Precisa ser destacado que das 7 amostras analisadas 1 correspondia ao haplótipo COI-T e as demais amostras correspondem ao haplótipo COI-C.

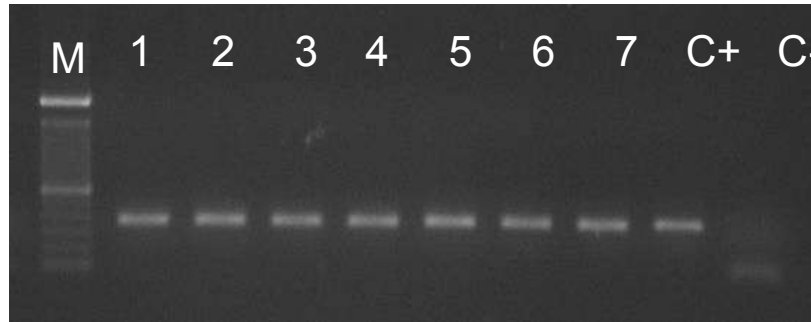


Figura 19. Determinação de padrão de alimentação de *Ae. albopictus* na cidade de Belém. Amostras amplificadas utilizando oligonucleotídeos para a detecção de sangue humano. Na figura são mostrados o marcador de peso molecular (M), amplificação de DNA de mosquitos ingurgitados (1-7), controle positivo (C+, DNA de mosquito alimentado com sangue humano), controle negativo (C-, DNA de mosquito não ingurgitado).

3.4 ISOLAMENTO DE RNA DAS FÊMEAS DE *AE. ALBOPICTUS* E RT-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DO DENV

Para verificar se existe transferência do vírus dengue desde as fêmeas do mosquito para a sua descendência, foram utilizados os indivíduos adultos provenientes das larvas coletadas nos parques públicos de Belém. Para esta análise foram utilizados oligonucleotídeos específicos para a amplificação de todos os sorotipos de vírus dengue descritos por Lanciotti *et al.* (1992) e que são utilizados para diagnóstico por RT-PCR no Laboratório Central (LACEN) da cidade de Fortaleza. Foram analisados os mosquitos capturados na época de estiagem e os da época chuvosa.

Na época de estiagem foi possível o isolamento de RNA total em 5 grupos de fêmeas de *Ae. albopictus* na fase adulta, sendo 3 grupos com 5 indivíduos, 1 grupo com 2 indivíduos, coletados no MPEG, e apenas 1 indivíduo na UFPA.

Após serem submetidos a reação de PCR as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1.5%. Entretanto, não foi observada nenhuma banca correspondente aos fragmentos do DENV, demonstrado na Figura 20.

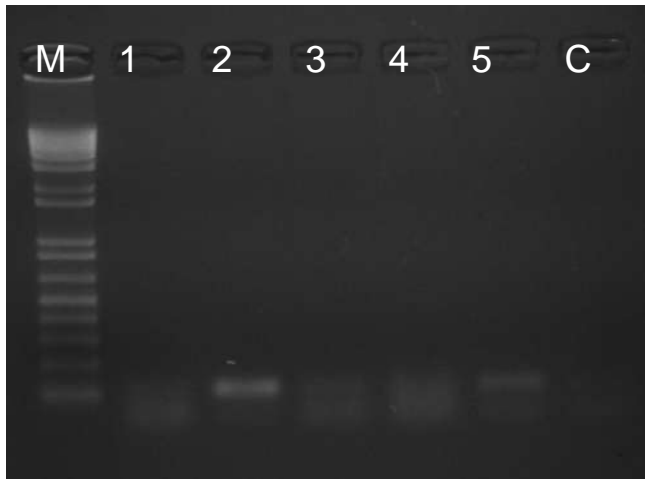


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR. M: Marcador; 1: MPEG com 5 fêmeas; 2: UFPA com 1 fêmea; 3: MPEG com 5 fêmeas; 4: MPEG com 5 fêmeas; 5: MPEG com 2 fêmeas e C: controle.

Com a grande quantidade de mosquitos obtidos na época chuvosa foi possível realizar o isolamento de RNA total em 10 amostras, sendo que cada continha 5 fêmeas adultas. Não foi possível o isolamento de RNA de fêmeas de *Ae. albopictus* na fase adulta nas coletas do Parque Estadual do Utinga devido ao baixo número de larvas coletadas.

Como no primeiro período de coleta, após o isolamento o RNA total foi retro-transcrito em cDNA para a amplificação dos fragmentos correspondentes ao DENV. Depois de serem submetidos a reação de PCR, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1.5%. Entretanto, da mesma forma que observado na época de estiagem, não foi observada nenhuma banda correspondente aos fragmentos do DENV nas amostras analisadas, demonstrado nas figuras 21, 22 e 23. Estes resultados demonstram que com as técnicas utilizadas, não foi possível detectar a transmissão transovariana do DENV nos mosquitos *Ae. albopictus* na cidade de Belém.

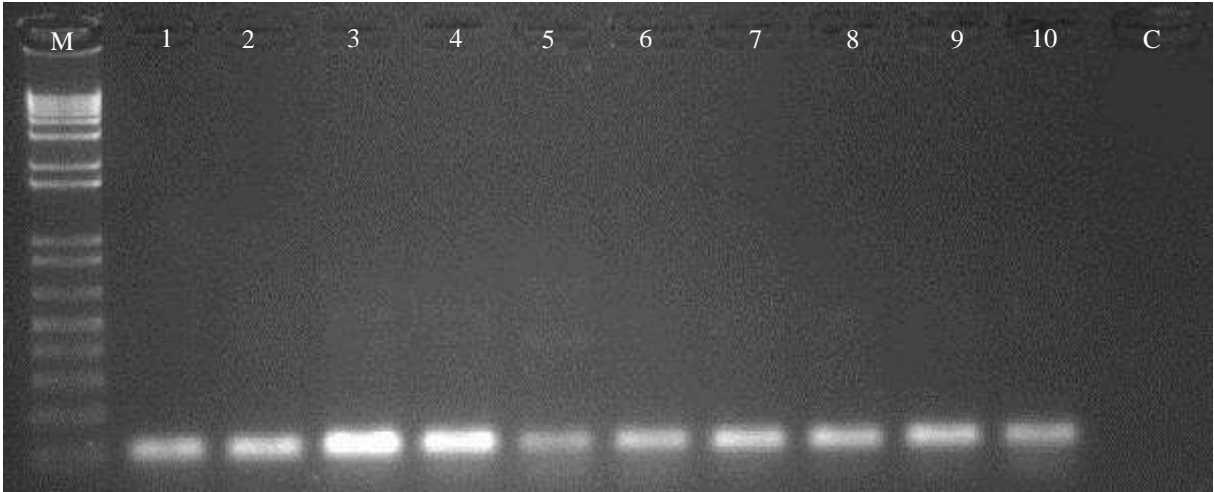


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR das amostras da UFPA. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-10 com 5 fêmeas e C: controle.

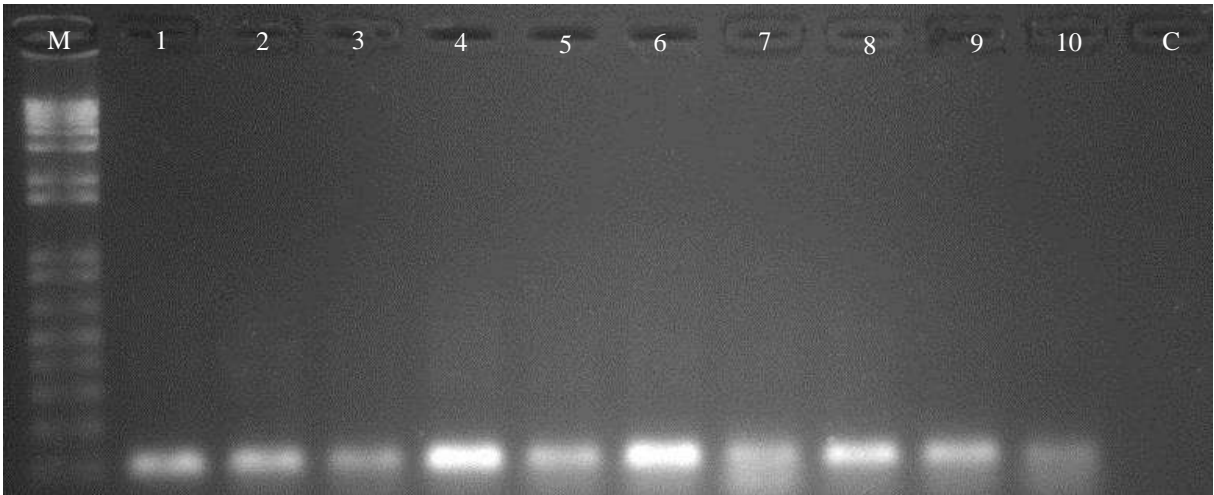


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR de amostras do Museu. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-10 com 5 fêmeas e C: controle.

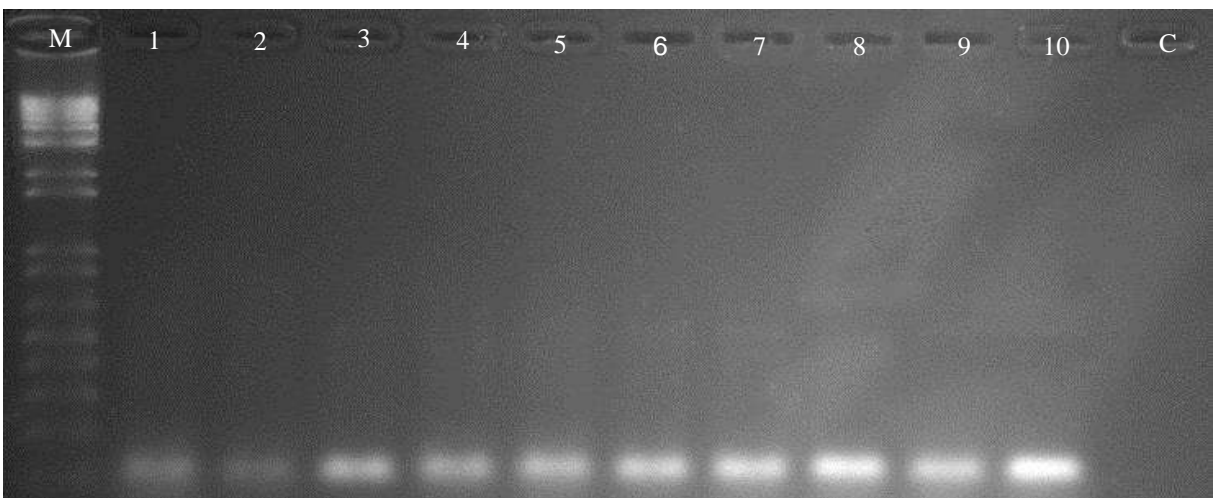


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 1.5%: amplificação da reação de PCR de amostras do Bosque. M: Marcador 1 kb ladder plus; 1-10 com 5 fêmeas e C: controle.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência do mosquito *Aedes albopictus* em quatro parques públicos da cidade de Belém, realizando a caracterização genética deste mosquito e a estudos destinados a determinar o padrão alimentar de fêmeas adultas, além de avaliar o risco de transmissão do vírus dengue na área urbana de Belém analisando a possível infecção transovariana do vírus dengue neste mosquito.

Este estudo forneceu informações quanto á presença do *Ae. albopictus* em ambientes com diferente grau de antropização, sendo verificado como a espécie de maior abundancia em criadouros de áreas mais urbanizadas, ressaltando a coexistência com o *Ae. aegypti* no mesmo criadouro. As larvas do mosquito *Ae. albopictus* foram encontradas preferencialmente em apenas um tipo de criadouro, que é correspondente a interiores de bambuzais cortados.

As larvas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* podem ser frequentemente encontrados desenvolvendo-se no mesmo criadouro (Braks *et al.*, 2003), apesar disso, há uma tendência ao aumento de *Ae. albopictus*, tanto em áreas urbanas quanto em zonas rurais, embora nestas áreas *Ae. albopictus* substitua ou desloque *Ae. aegypti* (Honório & Lourenço-de-Oliveira 2001; Forattini *et al.*, 1998). Segundo, Gilotra *et al.*, (1967) em um estudo realizado em Calcutá, na Índia, em locais de reprodução de ambas as espécies, observaram que não houve exclusão competitiva entre elas. Estes dados corroboram que o desenvolvimento larval de *Ae. Albopictus* e *Ae. Aegypti* pode ocorrer no mesmo criadouro sem que ocorra a exclusão de uma das espécies, apesar de que em condições de alta densidade larval verifica-se o melhor desempenho de *Ae. albopictus* quando na presença de *Ae.aegypti*, sugerindo maior resistência da primeira espécie à superpopulação (Barrera, 1996; Juliano, 1998)

No estudo realizado por Ceretti *et al.*, (2014), em Parques Públicos no Estado de São Paulo, foram realizadas coletas de larvas em interiores de bambus, sendo que 61 dos parques visitados, apenas 23 foram positivos para as larvas de mosquitos nos interiores desses criadouros. Em seus resultados, o *Ae. albopictus* foi encontrado em 19 Parques e foi, portanto, a espécie mais frequente (68,7% do total). Com base no número total de larvas recolhidas, o *Ae. albopictus* era 7,2 vezes mais abundante do que o *Ae.aegypti*. Estes resultados indicaram que, em Parques Urbanos no estado de

São Paulo, o *Ae. albopictus* é capaz de colonizar interiores de bambu de forma mais eficiente. Enquanto, Gomes & Marques (1988), em um estudo realizado para se conhecer a preferência entre criadouros naturais e artificiais do mosquito *Ae. albopictus*, concluíram a preferência por criadouros naturais, como bromélias e interiores de bambus. Podemos inferir que a preferência por bambuzais cortados, pode estar relacionado com fato destes locais possuírem características semelhantes aquelas de ambientes rurais e selvagens, apesar de estarem incorporado em uma paisagem urbana.

Com a captura abundante de *Ae. albopictus* durante o estudo, foi possível conhecer a característica genética deste mosquito presente na cidade de Belém, a partir da realização de uma genotipagem inicial destes mosquitos utilizando genes mitocondriais *COI* e *ND5*. Nas análises das sequências de um fragmento de 600 pares de bases do gene *COI* conseguimos estabelecer a existência somente de um SNP (357 T/C) o qual permitiu diferenciar duas populações de mosquitos, a primeira foi isolada com maior frequência (*COI-C*) apresentando homologia de 100% com amostras de mosquitos capturados em outras regiões do Brasil (Rio de Janeiro, São Paulo, São Luiz) e em países de clima tropical. Além de uma população de menor frequência (*COI-T*) a qual apresenta homologia com mosquitos capturados em países de clima temperado. Estes achados diferem dos apresentados por outros estudos onde a análise da sequência do gene *COI* determina a presença de somente uma população de mosquitos na região estudada (Kamgang *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Paupy *et al.*, (2009), Fernández *et al.*, (2012) e Lima-Camara *et al.*, (2013), demonstram que a colonização de regiões de clima temperado, bem como regiões de clima tropical e subtropical, é facilitada pela plasticidade biológica e comportamental do mosquito *Ae. albopictus*. Com isso, nossos achados demonstram a presença de duas populações distintas de *Ae. albopictus* na cidade de Belém, e assim podemos inferir que o mosquito referente ao haplótipo *COI-T* correspondente a regiões de clima temperado, pode ter sido introduzido na região através do tráfego de navios na região, conseguindo se desenvolver e conviver com as demais espécies. Entretanto, é possível que a baixa frequência desta população de mosquitos esteja associada ao seu nível de adaptação as condições bióticas e abióticas da região.

Devido a esta variabilidade de populações de *Ae. albopictus*, a caracterização do padrão alimentar é fundamental, tendo em vista que em nossos resultados

conseguimos estabelecer que os sete mosquitos ingurgitados (1,96% do total) apresentavam sangue humano no seu trato digestivo e não de outro vertebrado. O baixo número de mosquitos ingurgitados coincide com os achados em outros estudos, onde a porcentagem de mosquitos com presença de sangue não supera o 4% do total de mosquitos capturados (Bueno *et al.*, 2010; Kirchatter *et al.*, 2014). Valério *et al.*, (2010) em um estudo realizado na Itália, mostraram que nas análises de amostras sanguíneas provenientes de mosquitos coletados em campo e provenientes de experimentos de escolha de hospedeiros para o repasto revelaram que, quando dispõe de oportunidade, *Ae. albopictus* prefere se alimentar de sangue humano em detrimento de outros animais. Outras pesquisas realizadas por Ponlawat e Harrington (2005) na Tailândia; Richards e colaboradores (2006) nos Estados Unidos e Dellate *et al.*, (2010) em La Réunion também demonstraram a preferência por este tipo de hospedeiro (humanos).

Estes achados corroboram os resultados obtidos no presente estudo, assim como o estudo realizado por Foraji *et al.*, (2014) destinado a caracterizar quais eram os animais utilizadas pelo mosquito para realizar a hematofagia do inseto em áreas temperadas. Estes pesquisadores conseguiram estabelecer que estes insetos se alimentam preferencialmente de sangue de humano, demonstrando o alto risco causado pela presença deste mosquito para a transmissão de vírus dengue.

Com o conhecimento de que o mosquito *Ae. albopictus* tem se alimentado de sangue proveniente de humanos, nos leva a ressaltar a importância epidemiológica que este mosquito possui, pois o *Ae. albopictus* é responsável por surtos de dengue ocorridos no continente asiático (Instituto Oswaldo Cruz, 2008). No período em que foram realizadas as nossas coletas, no estado do Pará houve um aumento significativo no número de pacientes infectados com o vírus dengue, sendo observados 4.780 casos registrados em 2015 e 6.202 casos registrados no ano de 2016 (SESPA-Secretaria de Estado de Saúde Pública, 2015, 2016). Com isso, podemos inferir que ao apresentarem sangue humano no intestino, há possibilidade de que mosquitos de *Ae. albopictus* podem estar associados a possível transmissão do vírus dengue (DENV), contribuindo para as epidemias deste vírus.

Entretanto, nos estudos destinados a identificação de infecção transovariana de DENV realizados no presente trabalho, não obtivemos resultados positivos, não confirmando a possível infecção do vírus por esta forma de transmissão. Mesmo não demonstrada a infecção de mosquitos *Ae. albopictus* com vírus dengue, vale ressaltar

que o *Ae. albopictus* precisa destaque nas medidas de vigilância epidemiológica, pois esse mosquito mostrou-se, em experimentos laboratoriais, capaz de infectar-se com cerca de 23 arbovírus (Moore & Mitchell, 1997), e em virtude dos escassos relatos de pesquisas conduzidas em campo direcionadas ao *Ae. albopictus*, é possível que sua participação como vetor do vírus dengue tenha sido negligenciada (Degallier *et al.*, 2003).

O estudo da população de *Ae. albopictus* na cidade de Belém, ressalta a importância epidemiológica deste mosquito, devido ao risco de aparecimento de casos de dengue transmitido por *Ae. albopictus*. Assim como Vélez *et al.*, (1998) conclui, que devido aos números de larvas encontradas de *Ae. albopictus*, é possível que a fêmea exerça a hematofagia em uma ampla variedade de animais, mamíferos e aves, sendo ainda altamente antropofílica, o que aumenta sua capacidade de transmitir enfermidades em diferentes hospedeiros. Com isto, se torna viável que a transmissão de diversos vírus que podem ser transmitidos de forma horizontal ou vertical, tendo esta última importância epidemiológica, pela possibilidade de estabelecer novos focos de dengue gatilhados pela presença de ovos infectados. Sendo que esta espécie apresenta uma ampla valência ecológica, adaptando-se facilmente aos ambientes rural, urbano e peri-urbano, desta forma, presume-se que possa servir de ponte entre os ciclos silvestre e urbano de arboviroses de importância epidemiológica (FUNASA-Fundação Nacional de Saúde, 1999; Monath, 1987).

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, é verificado a presença do mosquito *Ae. albopictus* nos quatro fragmentos florestais da cidade de Belém, sendo capturados em apenas um tipo de criadouro, referente a interiores de bambuzais cortados. A partir disto, conseguimos estabelecer a existência somente de um polimorfismo (357 T/C) o qual permitiu diferenciar duas populações de mosquitos, a com maior frequência (COI-C) correspondente a regiões de clima tropical e de menor frequência (COI-T) correspondente a regiões de clima temperado. Nos estudos destinados a caracterizar o padrão de alimentação de *Ae. albopictus* na cidade de Belém conseguimos estabelecer que os sete mosquitos ingurgitados (1,96% do total) apresentavam sangue humano no seu trato digestivo. Entretanto, as amostras de RNA, não confirmaram a possível infecção do vírus dengue por transmissão transovariana. Contudo, futuras pesquisas são necessárias, para que se possa investigar fatores associados com a dispersão do *Ae. albopictus*. Todavia, a crescente coexistência desta espécie com *A. aegypti*, em áreas de transmissão ativa de dengue, representa uma ameaça para a saúde do ser humano.

7 REFERÊNCIAS

- AJUZ, L. C. & VESTENA, L. R. Influence of rainfall and temperature ambient on longevity and fertility *Aedes aegypti* and *albopictus* in the city guarapuava-pr and the possibility of superinfestation. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saude* 10: 1-18, 2014.
- AGUIAR, D. B.; FONTÃO, A.; RUFINO, P.; MACEDO, V. A.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M.; CASTRO, M. G. & HONÓRIO, N. A. Primeiro registro de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em Roraima, Brasil. *Acta Amazônica* 38: 357-360, 2008.
- BARRERA, R. Competition and resistance to starvation in larvae of container inhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecological Entomology* 21: 117-127. 1996.
- BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N. & OLSONI, K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clinical Microbiology Review* 13: 651-661, 2000.
- BRAKS, M. A.; HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; JULIANO, S. A. & LOUNIBOS, L. P. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *Journal of Medical Entomology* 40: 785-794, 2003.
- BENEDICT, M. Q.; LEVINE, R. S.; HAWLEY, W. A. & LOUNIBOS, L. P. Spread of the tiger: global risk of invasion by mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 7: 76-85, 2007.
- BOSIO, C. F.; THOMAS, R. E.; GRIMSTAD, P. R. & RAI, K. S. Variation in the efficiency of vertical transmission of dengue-1 virus by strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 29: 985-989. 1992.
- BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P.; MENEZES, R. M.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F.; ARAÚJO, R. A.; GUIDA, F. J. & KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil, 2010.
- BURKE, D. S. & MONATH, T. P. Flaviviruses. In: *Fields Virology*. 4 ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 33, v. II, p. 852-921, 2001.
- CARVALHO, R. G.; OLIVEIRA, R. L. & BRAGA, I. A. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 109: 787-796.
- CERETTI-JÚNIOR, W; MEDEIROS-SOUZA, A.R; MULTINI, L. C.; URBINATTI, P. R.; VENDRAMI, D. P.; NATAL, D.; MARQUES, S.; FERNANDES, A.; OGATA, H.; MARRELLI, M. Immature mosquitoes in Bamboo internodes in Municipal Park, City of São Paulo, Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association* 30: 268-274, 2014.

CERRETTI, P.; O'HARA, J. E.; MONTGOMERY WOOD, D.; SHIMA, H.; INCLAN, D. J. & STIREMAN, J. O. Signal through the noise? Phylogeny of the Tachinidae (Diptera) as inferred from morphological evidence. *Systematic Entomology* 39: 335-353. 2014.

CDC: Centers of Disease Control and Prevention. Chikungunya Virus. Clifton Road Atlanta; 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/index.html> Acesso: 11 de mar. 2017

CHANG, M. C.; TENG, H. J.; CHEN, C. F.; CHEN, Y. C. & JENG, C. R. The resting sites blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malaria Journal* 7: 105-113. 2008.

CONSOLI, R. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**, Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 1994. 225 p.

DEGALLIER, N.; TEIXEIRA, J. M.; SOARES, S. S.; PEREIRA, R. D.; PINTO, S. C.; CHAIB, A. J.; VASCONCELOS, P. F. & OLIVEIRA, E. *Aedes albopictus* may not be vector dengue virus in human epidemic in Brazil. *Revista de Saúde Pública* 37: 386-387. 2003.

DELLATE, H.; DESVARS, A.; BOUÉTARD, A.; BORD, S.; GIMONNEAU, G.; VOUREC'H, G. & FONTENILLE, D. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of chikungunya on La Réunion. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10: 249-258, 2010.

DIENG, H.; SAIFUR, R.; HASSAN, A.; CHE SALMAH, M.; BOOTS, M.; SATHO T, J. A. A. L. Z. & ABUBAKAR, S. Indoor-breeding of *Aedes albopictus* in northern peninsular Malaysia and its potential epidemiological implications. *PLoS One*. 5. 2010.

DUBRULLE, M.; MOUSSON, L.; MOUTAILLER, S.; VAZEILLE, M. & FAILLOUX, B. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One* 4. 2009.

DYER, J.; CHISENHALL, D. M. & MORES, C. N. A multiplex taqman assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses. *Journal of Virology Methods* 145: 9-13, 2007.

FARAJI, A.; EGIZI, A.; FONSECA, D. M.; UNLU, I. & CREPEAU, T. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8. 2014.

FERNÁNDEZ, M. C. M.; JEAN, Y. S.; CALLABA, C. A. F. & LÓPEZ, L. S. The first report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Haiti. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 279-281, 2012.

FIGUEIREDO, M. L.; GOMES, A. C.; AMARILLA, A. A.; LEANDRO, A. S.; ORRICO, A. S.; ARAUJO, R. F.; CASTRO, J. S.; DURIGON, E. L.; AQUINO, V. H. & FIGUEIREDO, L. T. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virology Journal* 7: 152. 2010.

FIOCRUZ, 2008. Vetor da dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos. IOC notícias. Rio de Janeiro, Brasil; 2008. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=576&sid=32> Acesso em 03 set. 2014

FIOCRUZ, 2014. Diferenças entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. INVIVO. Rio de Janeiro, Brasil; 2014. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1413&sid=2> Acesso em 13 mar. 2017

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. *Revista de Saúde Pública* 20: 244-245, 1986.

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde. Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela. *Ministério da Saúde*, Brasília, 1999.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary Entomology* 18:215-227. 2004.

GILOBRA, S. K.; ROSEBOOM, L. E. & BHATTACHERYA, N. C. Observations on possible competitive displacement between populations of *Aedes aegypti* Linnaeus and *Aedes albopictus* Skuse in Calcutta. *Bulletin of World Health Organization* 37: 437-446. 1967.

GOMES, A. C. & MARQUES, G. R. A. M. Encontro de criadouro natural de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde pública de São Paulo* 22: 245, 1988.

GOMES, A. C.; SOUZA, J. M. P.; BERGAMASCHI, D. P.; SANTOS, J. L. F.; ANDRADE, V. R.; LEITE, O. F.; RANGEL, O.; SOUZA, S. S. L.; GUIMARÃES, N. S. N. & LIMA, V. L. C. Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 206-210, 2005.

GOMES, A. C.; FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; MARQUES, G. R. A. M.; MARQUES, C. C. A.; MARUCCI, D. & BRITO, M. Microhabitats of *Aedes albopictus* (Skuse) in the Paraíba Valley region of the State of S. Paulo, Brazil. *Revista de Saúde pública de São Paulo* 26: 108-118, 1992

GUBLER, D. J. & CLARK G. G. Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases* 1: 55-7. 1995.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Review* 11:480-96, 1998.

GUBLER, D. J. & ROSEN, L. A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 25:146-150. 1976.

GUBLER, D. J. *Aedes albopictus* in Africa. *Lancet Infectious Diseases* 3: 751-752. 2003.

HADDAD, N.; MOUSSON, L.; VAZEILLE, M.; CHAMAAT, S.; TAYEH, J.; OSTA M. A. & FAILLOUX, A. B. *Aedes albopictus* in Libanon, a potential risk of arboviruses outbreak. *BMC Infectious Diseases* 12:300. 2012.

HENRIQUES, D. A. **Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna diptera nematocera do Estado de Rondônia (Amazônia ocidental brasileira)**. São Paulo: USP, 2008.

HONÓRIO, N. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 35:385-91, 2001.

HOTTA, S. Dengue vector mosquitoes in Japan: The role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the 1942-1944 dengue epidemics of Japanese Main Islands. *Medical Entomology and Zoology* 49: 276-284. 1998.

I. C. T. V.; KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. San Diego, 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 09 dez. 2013.

JULIANO, S. A. Species introduction and replacement among mosquitoes: interspecific resource competition or apparent competition? *Ecology* 79: 255-268. 1998.

KAMGANG, B.; BRENGUES, C.; FONTENILLE, D.; NJJOKOU, F.; SIMARD, F. & PAUPY, C. Genetic structure of the tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS One* 6. 2011.

KAMAGANG, B.; NCHOUTPOUEN, E.; SIMARD, F. & PAUPY, C. Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites and Vectors* 5:57. 2012.

KIRCHGATTER, K.; TUBAKI, R. M.; MALAFRONTI, R. M.; ALVESI, I. C.; CASTRO-LIMA, G. F.; GUIMARÃES, L. O.; ZAMPAULO, R. O. & WUNDERLICH, G. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (DIPTERA: CULICIDAE) in peridomestic area during asymptomatic malaria transmission in the atlantic forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo* 56, 2014.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J. & VORNDAM, V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 545-551, 1992.

LIMA-CAMARA, T. N.; CODECO, C. T.; HONÓRIO, N. A.; BRUNO, R. V.; PEIXOTO, A. A. & LOUNIBOS, L. P. Male accessory gland substances from *Aedes albopictus*

affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 18-25, 2013.

LINNAEUS, C. *Species Plantarum*. 2 ed. Stockholm 1: 1-784. 1762.

LOUNIBOS, L. P.; SUÁREZ, S.; MENÉNDEZ, Z.; NISHIMURA, N.; ESCHER, R. L. & O'CONNELL, S. M. & REY, J. R. Does temperature affect the out-come of larval competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? *Journal of Vector Ecology* 27:86-95, 2002.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; CASTRO, M. G.; BRAKS, M. A. & LOUNIBOS, L. P. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *Journal Vector Ecology* 29:94-100, 2004.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; NETO, R. B.; GONÇALVES, J. M.; CODEÇO, C. T. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. *Journal of Medical Entomology* 43: 1112-1120, 2006.

MARTINS, V. E.; ALENCAR, C. H.; KAMIMURA, M. T.; ARAÚJO, F. M.; SIMONE, S. G.; DUTRA, R. F. & GUEDES, M. I. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One* 7. 2012.

MEDLOCK, J. M.; HANSFORD, K. M.; SCHAFFNER, F.; VERSTEIRT, V.; HENDRICKX, G.; ZELLER, H. & BORTEL, W. V. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks and control options. *Vector-Borne Zoonotic Diseases* 12: 435-447, 2012.

MILLER, B. R.; MITCHELL, C. J. & BALLINGER, M. E. Replication, tissue tropisms and transmission of yellow fever virus in *Aedes albopictus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83:252-255, 1989.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2016. Casos de dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf> Acesso em: 04 de Fev de 2017.

MITCHELL, C. J.; MILLER, B. R. & GUBLER, D. J. Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3:460-465. 1987.

MONATH, T. P. Yellow fever: A medically neglected disease. Report on a seminar. *Reviews on Infectious Diseases* 9: 165-175, 1987.

MOORE, C. G. & MITCHELL, C. J. *Aedes albopictus* in the United States: ten-years presence and public health implications. *Emerging Infectious Diseases* 3: 329-334. 1997.

MORAES, B. C.; COSTA, J. M. N.; COSTA, A. C. L. & COSTA, M. H. Spatial and temporal variation of precipitation in the State of Pará. *Acta Amazonica* 35: 207-214, 2005.

NETO, F. C.; DIBO, M. R.; BARBOSA, A. A. C. & BATTIGAGLIA, M. *Aedes albopictus* (S) in the region of São José do Rio Preto, SP, Brazil: a study of its infestation in an area where *Aedes aegypti* was already established and a discussion of its role as a possible vector of dengue and yellow fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 35-357, 2002.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Executive Committee of the Directing Council. *Aedes albopictus* in the Americas; 99th meeting. Washington, D. C, 1987. (CE99 15) [Mimeografado].

PANCETTI, F.; HONÓRIO, N.; URBINATTI, P. & LIMA-CAMARA, T. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48:87-89, 2015.

PAUPY, C.; DELATTE, H.; BAGNY, L.; CORBEL, V. & FONTENILLE, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infection* 11: 1177-1185. 2009.

PESSOA, V. E. M.; SILVEIRA, D. A.; CAVALCANTE, I. L. R. & FLORINDO, M. I. G. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e ricos de transmissão da dengue. *Entomotropica* 28: 75-86, 2013.

PONLAWAT, A. & HARRINGTON, L. C. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of Medical Entomology* 42: 844- 849, 2005.

RAMASAMY, R.; SURENDRAN, S. N.; JUDE, P. J.; DHARSHINI, S. & VINOBA, M. Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban brackish water and its implications for transmission of arboviral diseases. *PLoS Neglected Tropical Disease* 5: 1369. 2011.

RICHARDS, S. L.; PONNUSAMY, L.; UNNASCH, T. R.; HASSAN, H. K. & APPERSON, C. S. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) in relation to availability of humans and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *Journal of Medical Entomology* 43: 543-551, 2006.

RODRÍGUEZ, L. M. A.; LIGONIO, A. R.; ENCINA, J. L. R.; CAZÁRES, M. T. M.; CRIVELLI, A. R, MONTEON, A. L. Expression, Purification, and Evaluation of Diagnostic Potential and Immunogenicity of a Recombinant NS3 Protein from All Serotypes of Dengue Virus. *Journal of Tropical Medicine* 10. 2012.

ROSEN, L.; SHROYER, D. A.; TESH, R. B.; FREIER, J. E. & LIEN, J. C. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 1108-1119. 1983.

SARDELIS, M. R.; TURELL, M. J.; O'GUINN, M. L.; ANDRE, R. G. & ROBERTS, D. R. Vector competence of three North American strains of *Aedes albopictus* for West Nile virus. *Journal of the American Mosquito Control Association* 18:284-289. 2002.

SEGURA, M. N.; MONTEIRO, H. A.; LOPES, E. S.; CASTRO, F. C. & VASCONCELOS, P. F. Occurrence of *Aedes albopictus* in the state of Pará, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 37:388-9, 2003.

SERPA, L. L. N.; COSTA, K. V. R. M.; VOLTOLINI, J. C. & KAKITANI, I. Seasonal variation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a city of Southeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 2006

SECRETARIA DE ESTADO E SAÚDE PÚBLICA. 2016. Sespa divulga o 15º informe do ano sobre os casos de dengue, chikungunya e zika. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/?p=4391> Acesso em: 04 de Fev de 2017.

SCHOLTE, E. J. & SCHAFFNER, F. Waiting the tiger: establishment and spread of *Aedes albopictus* mosquito in Europe. In: *Emerging Pests and Vector Borne Disease in Europe*. Wageningen: Academic Publishers. 241-260. 2007.

SULLIVAN, M. F.; GOULD, D. J. & MANEECHAI, S. Observations on the host range and feeding preference of *Aedes albopictus* (Skuse). *Journal of Medical Entomology* 8: 713-716. 1971.

TALBALAGUI, A.; MOUTAILLER, S.; VAZEILLE, M. & FAILLOUX, A. B. Is *Aedes albopictus* for Italy competent enough to sustain new arborival outbreaks? *Medical and Veterinary Entomology* 24:83-87. 2010.

TESH, R. B.; GUBLER, D. J. & ROSEN, L. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with chikungunya virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25:326-335. 1976.

TRABULSI, L. R.; ALTERHUM, F. *Microbiologia*. 5ªed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VALERIO, L.; MARINI, F.; BONGIORNO, G.; FACCHINELLI, L.; POMBI, M.; CAPUTO, B.; MAROLI, M. & DELLA TORRE, A. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts with Rome province, Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10: 291-294. 2010.

VÉLEZ, I. D.; QUIÑONES, M. L.; SUÁREZ, M.; OLANO, V.; MURCIA, L. M.; CORREA, E.; AREVALO, C.; PÉREZ, L.; BROCHERO, H. & MORALES, A. Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica* 18: 192-198, 1998.

VEGA-RUA, A.; ZOUACHE, K.; GIROD, R.; FAILLOUX, A. B. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of Virology* 88:6294-6306. 2014.

ZONG, G.; ZHU, J.; SUN, L.; YE, X.; LU, L.; JIN, Q.; ZHENG, H.; YU, Z.; ZHU, Z.; LI, H. & LIN, X. Associations of erythrocyte fatty acids in the novo lipogenesis pathway with risk of metabolic syndrome in a cohort study of middle-aged and older Chinese. *American Journal of Clinical Nutrition* 98: 319-326. 2013.