



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia- ICB/UFMG

**DETECÇÃO DE *Dengue virus* EM *Aedes albopictus* Skuse E
PEQUENOS MAMÍFEROS DE FRAGMENTO FLORESTAL
URBANO**

TATIANA MINGOTE FERREIRA DE ÁZARA

Belo Horizonte, MG

Outubro de 2013

TATIANA MINGOTE FERREIRA DE ÁZARA

**DETECÇÃO DE *Dengue virus* EM *Aedes albopictus* Skuse E
PEQUENOS MAMÍFEROS DE FRAGMENTO FLORESTAL
URBANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Área de Concentração: Entomologia
Orientador: Dr. Álvaro Eduardo Eiras

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte, MG

2013

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (LabEQ), no Laboratório de Vírus (LabVÍRUS) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e na Unidade Fazendinha, Sabará/MG, do Instituto Metodista Izabela Hendrix, com auxílio da CAPES, FAPEMIG, Pronex-Dengue e INCT-Dengue.

*Para ser grande, sê inteiro
Nada teu exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa
Põe quanto és no mínimo que fazes
Assim, em cada lago a lua toda brilha
Porque alta vive.”*

(Ricardo Reis)

COLABORADORES:

- Laboratório de Ecologia e Conservação (LECon)

Departamento de Biologia Geral, ICB/UFMG

Dr. Adriano Pereira Paglia (Professor)

Flávia Vieira Nunes e Filipe Madeira (Biólogos Mastozoólogos)

Daniella Rezende e Daniele Cury (Biólogas - Mestrandas em Ecologia)

Thaís Morcatty (Bióloga – Instituto Mimirauá)

- Laboratório de Vírus (LabVírus)

Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG

Dra. Giliane de Souza Trindade (Professora)

Dra. Erna Geessien Kroon (Professora)

Dr. Júlio César (Pós-doutorando)

Dra. Ana Paula Pessoa Vilela (Pós-doutoranda)

Dra. Iara Apolinário Borges

Lara Ambrósio e Paula Marinho (Biólogas – Mestrandas em Microbiologia)

- Instituto Metodista Izabela Hendrix

Rilson Barbosa – Gerente da Unidade Fazendinha, Sabará/MG

- Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (LabEQ)

Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

Danielle Souza (Bióloga – Mestranda em Parasitologia)

Mariele Ribeiro (Bióloga)

Andréa Vieira, Paloma Caldas, Dulcina Hellen (Iniciação científica)

Isadora Sepúlveda, Andréa Souto, Frederico Lima (Iniciação científica)

Helder Henriques Cavalcante (Iniciação científica)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Agradeço a todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB/UFMG.

Às secretárias da Pós-Graduação, Sibeles e Sumara, por toda sua dedicação, carinho e por serem fundamentais para que as coisas ocorram no Departamento.

À CAPES pela concessão da bolsa, à FAPEMIG, ao Pronex-Dengue e INCT-Dengue pelo financiamento do projeto.

Ao orientador Prof. Álvaro E. Eiras, pela confiança, credibilidade e oportunidades de crescimento profissional.

Aos colaboradores Dra. Giliane Trindade, Dra. Erna Kroon e Dr. Adriano Paglia por todo incentivo, empenho, acessibilidade e, por muitas vezes, acreditarem mais no meu trabalho do que eu mesma!

Aos professores Pedro Linardi e Ramiro Botelho, pela identificação dos ectoparasitos dos pequenos mamíferos.

Ao Dr. Andrey Andrade, querido amigo, exemplo de pesquisador por amar o que faz acima de tudo. Obrigada pela identificação dos flebotomíneos.

À Dra. Luciane Batista-Pereira por todo carinho, atenção, prestatividade e pelas correções e sugestões da tese.

Ao Rilson Barbosa e, em nome dele, aos demais funcionários e alunos da Unidade Fazendinha do Instituto Metodista Izabela Hendrix, Sabará/MG, por nos permitir utilizar a

unidade como área experimental e por todo auxílio e prestatividade em tudo que precisávamos, mesmo quando atrapalhávamos sua rotina.

Às estagiárias Andréa Vieira, Paloma Caldas e Dulcina Hellen. Obrigada por um ano inteiro de ajuda em campo e na criação dos *Aedes albopictus*. Em especial à Andréa que conseguiu me aturar por um tempinho a mais...

Agradeço a todos os voluntários que auxiliaram nos trabalhos de campo: Helder Henriques, Andréa Couto, Frederico Nascimento, Mariele Ribeiro, Danielle Andrezza, Carolin Degener, Kelly Paixão, Maria Cristina, Dimitri Pacheco, Iancor Diego, Isadora Sepúlveda, Matheus Hipólito, Renata Duarte, Pedro Henrique, Lorena, Priscila Helmond, Cláudia Kelly, Marina, Daniele, Daniella, Vanessa, Ariadna, Luiz Alexandre, Galileu. A ajuda, o esforço e companheirismo de vocês foram imprescindíveis para a realização de todo trabalho. Obrigada de coração!

Aos integrantes do “Oh My God Science Group”: Filipe Madeira, Flávia Vieira, Thais Morcaty, Iara Borges, Lara Ambrósio, Mariele Ribeiro, Andréa Vieira (ou melhor: Barbudin, Moça do Barreiro, Juliana Paes, Minusculazinha, Mulher-do-Homem-Bravo, Pezinho, Modelo). Tenham certeza que não haveria projeto se não fosse o imenso empenho e suor (literalmente!) de todos vocês. Foi um privilégio conhecer e trabalhar com pessoas tão empolgadas e dedicadas (mesmo tendo que chegar à Federal antes das seis da manhã, enfrentar chuva, lama, sol forte, carregar peso, levar mordida de bicho, levar tombo nas trilhas...).

Ao Sr. Sebastião (Seu Tião) por ter tornado as idas e vindas do campo sempre um aventura.

A todos os integrantes do LabVírus por toda ajuda nesse novo universo da microbiologia e biologia molecular. Obrigada por terem feito me sentir em casa no laboratório de vocês. Em especial à Paula Marinho, Júlio César e Ana Paula Pessoa, o que seria de mim sem vocês!!!

A toda equipe do Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (LabEQ) das antigas (Claudinha, Renatinha, Ione, Marcinha, Jivago, Celinha, Dedey, Gigante, Isa, Rose, Maria Cristina) os remanescentes e novatos (Ana Paula Carrusca, Luciane, Kelly, Laila, Moreno,

Caro, Priscila, Dani, Eliseu, Karla, Adriano, Frede, Bruna, Bárbara). Vários já seguiram seu rumo, mas todos os momentos de convivência, aprendizagem e diversão ficarão para sempre. Obrigada por fazerem do lab não somente um lugar de trabalho, mas também um local de se cultivar bons amigos!

Às minhas amigas Alinona, Alininha, Renata, Klívia e Cris, por todos os anos de amizade, cumplicidade e amor! Prova maior que o tempo e a distância não importam quanto se gosta de verdade.

Aos professores Alice Kumagai e Fernando Silveira por terem feito parte de minha formação acadêmica e hoje fazerem parte da minha vida, como grandes e queridos amigos.

Ao João Paulo, meu Zé, por ter acompanhado todo esse caminho ao meu lado, por ter sido meu apoio, meu ombro amigo. Obrigada por todo o companheirismo, paciência... enfim, obrigada por tudo meu bem!

Ao meu pai, Seu Custódio, meus irmãos Michel e Bárbara e em especial à minha mãe, D. Ilza, por ser exemplo de dedicação, perseverança e paciência!!

Para todos aqueles que participaram direta ou indiretamente e que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste projeto, meu muito, muito, muito obrigada!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	16
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. <i>Aedes Albopictus</i> : biologia, ecologia e relação com a transmissão de arboviroses	20
1.2. Métodos de coleta de culicídeos	23
1.3. Estudo da paridade das fêmeas de <i>Aedes</i>	26
1.4. Dengue	27
1.5. Dengue e outras arboviroses em mamíferos silvestres	33
1.6. Diagnóstico de arbovírus	36
1.7. Culicídeos de fragmentos florestais inseridos em área urbana	38
1.8. Pequenos mamíferos de fragmentos florestais inseridos em área urbana	39
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Área de estudo	46

4.2	Coleta e identificação dos mosquitos	50
4.3	Estudo da paridade	52
4.4	Detecção de <i>Dengue virus</i> em adultos de <i>Aedes</i>	53
4.5	Coleta, identificação e retirada de sangue dos pequenos mamíferos	53
4.6	Testes sorológicos dos pequenos mamíferos	55
4.7	Detecção de dengue-vírus em pequenos mamíferos	56
4.8	Dados meteorológicos	57
4.9	Análises estatísticas	57
5	RESULTADOS	60
5.1	Estrutura da comunidade de culicídeos e paridade:	60
5.2	Estrutura da comunidade de pequenos mamíferos:	73
5.3	<i>Dengue virus</i> em <i>Aedes albopictus</i> capturados:	81
5.4	<i>Dengue virus</i> em pequenos mamíferos:	88
6	DISCUSSÃO	91
6.1	Estrutura da comunidade de culicídeos e paridade:	91
6.2	Estrutura da comunidade de pequenos mamíferos:	97
6.3	<i>Dengue virus</i> em <i>Aedes albopictus</i> :	100
6.4	<i>Dengue virus</i> em pequenos mamíferos:	104
7	CONCLUSÕES	106
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (Castro-Gomes et al. 2008). 21
- Figura 2 -** Ovário de culicídeos. A. Ovário de fêmea nulípara com extremidades das traqueíolas noveladas (seta); B. ovário de fêmea onípara ou párida com extremidades das traqueíolas distendidas (seta) (Reiter & Nathan 2001). 27
- Figura 3-** Esquema da partícula viral e do genoma de dengue-vírus A. Estrutura viral; B. Estrutura geral do genoma do dengue-vírus. Regiões não tradutoras 5' e 3' (UTRs) e open reading frame (ORF) indicando proteínas estruturais (C-prM-E) e não estruturais (NS1-NS2AB-NS3-NS4AB-NS5): (Clyde et al. 2006 adaptado) 29
- Figura 4-** Áreas de risco de transmissão de dengue. Escala colorimétrica indica áreas sem transmissão (verde) até áreas com transmissão detectada (vermelho). Marcações em pontos apontam casos locais e regionais de dengue em 2013 (CDC 2013a). 28
- Figura 5-** Representação do perfil da resposta imunológica das infecções por dengue-vírus. (CDC 2013b adaptado). 30
- Figura 6-** Número de casos de dengue notificados em Minas Gerais entre os anos 1990-2013. (SINANOnline e DVA/SVEAST/SubVPS/SES-MG 2012/2013 dados parciais sujeitos a revisão. Adaptado de SES 2013). 322
- Figura 7-** Municípios do Estado de Minas Gerais e taxas de transmissão de dengue. (SES 2013 adaptado). 32
- Figura 8-** Representação de ciclo de dengue silvestre (esquerda) com envolvimento de primatas não humanos e ciclo urbano (direita) com o ser humano como hospedeiro definitivo (Whitehead et al. 2007 adaptado). 366
- Figura 9-** Número de espécies de mamíferos por ordem no Estado de Minas Gerais (Minas 2009) 366
- Figura 10-** Espécies de pequenos mamíferos A. *Akodon cursor*; B. *Cerradomys subflavus*; C. *Necomys lasiurus*. D. *Oligoryzomys* sp.; E. *Guerlinguetus ingrami*; F. *Didelphis albiventris*; G. *Gracilinanus microtarsus*; H. *Sylvilagus brasiliensis*. 42
- Figura 11-** A. Mapa do Estado de Minas Gerais destacado em vermelho o município de Sabará, MG. B. Região Metropolitana de Belo Horizonte, com destaque para o município de Sabará (Fonte: http://www.slideshare.net/patri_lab/crescimento-urbano-de-sabar-mg-modificao-e-conservao-da-cidade-segundo-seus-instrumentos-legais-de-planejamento acessado em 30/04/2013). 46
- Figura 12-** Unidade Fazendinha em Sabará/MG, sua edificação principal (Escola) e delimitação das trilhas nas áreas de Cerrado (Trilha 1 - vermelho) e Mata Atlântica (Trilha 2- roxo e Trilha 3- laranja). (Fonte: Google Earth, 2013). 47

Figura 13- Vista da Unidade Fazendinha em Sabará, MG mostrando área transicional de Cerrado (à direita), onde foi demarcada a Trilha 1, e Mata Atlântica (à esquerda). 48

Figura 14- Vista da Unidade Fazendinha em Sabará/MG mostrando a área de Mata Atlântica. A. Trilha 2 e B. Trilha 3. 49

Figura 15- Edificação principal da Unidade Fazendinha, Sabará/MG, denominada de área da Escola. A. parte anterior da edificação com entrada principal; B. parte lateral da edificação; C. e D. exemplos de localização da armadilha BG-Sentinel® na área da Escola. 49

Figura 16- A. Armadilha BG-Sentinel® com liberador de gás carbônico; B. Saco coletor dos insetos; C. Atraente BG-Lure® D. Partes componentes da armadilha; C. Esquema de funcionamento da armadilha (Biogents 2006). 512

Figura 17- Armadilhas utilizadas para captura de mamíferos na Fazendinha, Sabará/MG. A. Gaiola; B. Sherman. 55

Figura 18- *Aedes* (média± erro-padrão) capturados em armadilha BG-Sentinel® iscadas com e sem gelo seco. Fazendinha Sabará/MG. Asterisco (*) indica diferença significativa (Mann-Whitney, $p=0,02$) ($n=36$). 601

Figura 19- Culicídeos (média± erro-padrão) capturados em armadilha BG-Sentinel® iscadas com e sem gelo seco. Fazendinha Sabará/MG. Asteriscos: (*) indica diferença significativa entre fêmeas de *Culex quinquefasciatus* (Mann-Whitney, $p = 0,05$). (**) indica diferença significativa entre outros culicídeos em conjunto (Mann-Whitney, $p < 0.001$) ($n=36$). 612

Figura 20- Total de espécimes de culicídeos por data de coleta. Fazendinha, Sabará/MG. (abril/2011-maio/2012). Seta indica o início do uso de CO₂ nas coletas. Asteriscos indicam data das queimadas. 612

Figura 21- Abundância de culicídeos (média ±SE) por local de coleta. Fazendinha, Sabará/MG. (abril/2011-maio/2012). Um asterisco (*): diferença significativa entre Escola e Trilha 2; Dois asteriscos (**): diferença significativa entre Trilha 2 e Trilha 3 (GLM, ANOVA, $p<0,05$). 634

Figura 22- Distribuição das espécies por locais de coleta pela análise de escalonamento não métrico multidimensional (NMDS). Em sentido horário: primeiro quadrante à esquerda: Trilha 3; segundo quadrante: Trilha 2; terceiro quadrante: escola; quarto quadrante: Trilha 1. 656

Figura 23- Curva de acumulação de espécies de culicídeos para cada uma das áreas de coleta, Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 – Maio/2011 baseada nos índices não-paramétricos utilizados. Sob: riqueza observada; Chao2, Jack1, Jack2 e Bootstrap: estimadores de riqueza. 667

Figura 24- Comparação entre as estimativas de riqueza geradas com o estimador Jackknife 1 entre as áreas de coleta. Intervalo de confiança (IC=95 %) é mostrado pelas barras. Linha pontilhada indica a sobreposição dos IC's da Trilha 1 e Escola. 678

Figura 25- Dados abióticos do período de coletas (abril/2011 a maio/2012). A. Índices pluviométricos e Umidade Relativa do Ar (URA); B. Temperaturas Máxima, Média e Mínima. Fonte: CPTEC/INPE. 701

Figura 26- Estado fisiológico de fêmeas de *Aedes* por mês de coleta, Unidade Fazendinha, Sabará/MH. Abril/2011 a maio/2012. A. *Aedes albopictus*; B. *Aedes aegypti*. 723

Figura 27- Curva de acumulação de espécies de pequenos mamíferos para cada uma das áreas de coleta, Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 – Maio/2011 baseada nos índices não-paramétricos utilizados. Sob: riqueza observada; Chao2, Jack1, Jack2 e Bootstrap: estimadores de riqueza. 756

Figura 28- Frequência relativa (%) das espécies de pequenos mamíferos coletadas na Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 767

Figura 29- Frequência relativa (%) das espécies de pequenos mamíferos por local de coleta. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 778

Figura 30- Localização dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para DENV nos locais de coleta da Unidade Fazendinha, Sabará/MG, Abril/2011 - Maio/2012. Número no marcador indica quantidade de *pools* positivos em cada ponto de coleta. 812

Figura 31- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-1/DENV-3 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. A. Curvas do controle positivo: DENV-1 (72.62), DENV-3 (73.82) e controle negativo (NTC). B. a F. curvas das amostras 3, 5, 9, 10 e 11 (vide Tab. X). 845

Figura 32- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-1/DENV-3 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. A. a F. curvas das amostras 13, 14, 17, 18 e 22 e 24 (vide Tab. X). 856

Figura 33- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-1/DENV-3 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. A. a D. curvas das amostras 25, 26, 29 e 31 (vide Tab. X). 867

Figura 34- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-2/DENV-4 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. A. Curvas do controle positivo: DENV-2 (74.13), DENV-3 (73.98) B. a D. curvas das amostras 1, 8 e 20 (vide Tab. X). 878

Figura 35- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-2/DENV-4 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. A. a C. curvas das amostras 25, 26, 29 e 31 (vide Tab. X). 878

Figura 36- Gél de poliacrilamida 8 % das amostras de oito pequenos mamíferos positivos para dengue-vírus por PRNT ou ELISA. Ladder: padrão de bandas (100 a 500 pb); Linhas 1 a 8 (amostras com cDNA diluído (1:20)); Linhas 9 a 18 (repetição em sequência das amostras. 1 a 8, com cDNA não diluído); D1-D4: controle-positivo para os quatro sorotipos. Mix e MixTaq; controles negativos. DENV-1: 482 pb; DENV-2: 119 pb; DENV-3: 288 pb; DENV-4: 394 pb. 901

LISTA DE TABELAS

Tabela I- Abundância total (n) e relativa (%), riqueza de espécies de Culicidae (Diptera) e Índices de Diversidade Shanon-Wiener (H') e Berger-Parker (d) por local de coleta. Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. Número de armadilhas/noite: Trilha 1 (N=101); Trilha 2 (N=132); Trilha 3 (N=138); Escola (N=252); Total (N=623). 622

Tabela II- Porcentagem de dissimilaridade (SIMPER) entre as áreas de coleta e espécies que mais contribuíram para a diferença, Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. Valores em negrito: porcentagem entre as áreas. Demais valores: contribuição (%) de cada espécie para a dissimilaridade entre os pares de locais. 644

Tabela III- Coeficientes de Correlação (r_s) das espécies de culicídeos Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011-Maio/2012. Pluvio = Índice Pluviométrico; Temp Média = Temperatura Média; Temp Máxima = Temperatura Máxima; Temp Mínima = Temperatura Mínima; URA = Umidade Relativa do Ar; 2 sem= duas semanas antes das coletas; 1 sem= uma semana antes das coletas; sem= semana das coletas. 69

Tabela IV- Estado fisiológico (%) de fêmeas de *Aedes* por local de coleta, Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 a maio/2012. 71

Tabela V- Abundância total, absoluta (n) e relativa (%), Esforço Amostral (EA), Sucesso de Captura (SC) e Índices de Diversidade Shanon-Wiener (H') e de Dominância Berger-Parker (d) de pequenos mamíferos por local de coleta, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 744

Tabela VI- Número de espécimes de pequenos mamíferos recapturados na Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 2ª a 7ª (segunda à sétima recapturas). 788

Tabela VII- Abundância absoluta das espécies de pequenos mamíferos por data de coleta, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 79

Tabela VIII- Coeficientes de Correlação (r_s) das espécies de culicídeos Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011-Maio/2012. Pluvio = Índice Pluviométrico; Temp Média = Temperatura Média; Temp Máxima = Temperatura Máxima; Temp Mínima = Temperatura Mínima; URA = Umidade Relativa do Ar; 2 sem= duas semanas antes das coletas; 1 sem= uma semana antes das coletas; sem= semana das coletas. 800

Tabela IX- Amostras (*pools*) de *Aedes albopictus* submetidas a qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix por local de coleta, total de amostras positivas e porcentagem de positividade por local. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 811

Tabela X- Total de amostras (*pools*) de *Aedes albopictus* submetidas a qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. F(♀): total de fêmeas no *pool*; M(♂): total de machos no *pool*; +: amostras positivas para DENV-1 ou DENV-3 e DENV-2 ou DENV-4. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 822

Tabela XI- PCR convencional das amostras de *Aedes albopictus* submetidas ao qRT-PCR e positivas para DENV. D1: amostra positiva para DENV-1; D2: amostra positiva para DENV-2; D2 e D4: amostras positivas concomitantemente para DENV-2 e DENV-4; “-“: amostras não amplificadas. Para resultados da qRT-PCR vide Tab. X. 833

Tabela XII- Número total de soros de pequenos mamíferos testados por IgG-ELISA e respectivas porcentagens para amostras positivas e negativas. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2001-Maio/2012. 888

Tabela XIII- Número total de soros de pequenos mamíferos testados por soroneutralização (PRNT) e respectivas porcentagens de redução de placa para cada sorotipo de DENV. Números em negrito com PRNT > 50 %. N. amostras (PCR): código utilizado nos testes de PCR das respectivas amostras (vide Fig. 37). Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011-Maio/2012. 89

Tabela XIV- Comparação entre as metodologias de detecção de DENV utilizadas nas amostras de soros de pequenos mamíferos da Unidade Fazendinha, Sabará/MG, Abril/2011 - Maio/2012. ELISA (IgG-ELISA); PRNT (soroneutralização); PCR (RT-PCR). + / -: reação positiva (+) ou negativa (-) para cada uma das técnicas utilizadas; na: análise não realizada. Numeração ao lado do nome específico é a mesma utilizada nas amostras que foram submetidas à PCR (vide Fig. 37). 900

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
A	Ampère
APS	Persulfato de amônia
BGS	BG-Sentinel [®]
BSA	Albumina de soro bovino
CO ₂	Gás carbônico
cm	centímetros
<i>C-prM</i>	Gene pré-membrana e do capsídeo de dengue-vírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DEPC	Água com dietilpirocarbonato, inibidor de RNase
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DENV 1-4	sorotipos 1, 2, 3 e 4 de dengue-vírus
EA	Esforço amostral
ECP	Efeito citopatogênico na soroneutralização
ELISA-IgG	<i>enzyme-linked immunosorbent assay - IgG</i> (ensaio imunoenzimático com a imunoglobulina G)
g	Giro
g/m	Gramas por minuto
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i> (alta eficiência na separação de partículas de ar). Filtro contido em máscaras de ar
h	Hora
ICB	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IUCN	International Union for Conservation of Nature (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais)
Kb	Kilobase
LabEQ	Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores (ICB/UFMG)
LabVÍRUS	Laboratório de Vírus (ICB/UFMG)

LeCon	Laboratório de Biologia da Conservação (ICB/UFMG)
m	Metro
mg/Kg	Miligrama por kilo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µL	Microlitro
min	Minuto
nm	nanômetros
MS	Ministério da Saúde
NMDS	Análise por escalonamento não métrico multidimensional
pb	Pares de base
PBS-T	<i>fetal bovine serum</i> (soro fetal bovino) com meio Tween
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PNCD	Programa Nacional de Controle de Dengue
qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
pH	Potencial hidrogeniônico
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> (Teste de redução de placa por soroneutralização)
RNA	Ácido ribonucléico
SC	Sucesso de captura
SIMPER	Análise de porcentagem de similaridade
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (catalisador para gel de poliacrilamida)
T _M	Temperatura de melting
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Volt

RESUMO

A dengue é uma arbovirose que, no Brasil, tem seu agente etiológico, o *Dengue virus*, transmitido por *Aedes aegypti* e por *A. aegypti* e *A. albopictus* no Sudeste Asiático. O mosquito *A. albopictus*, presente em áreas remanescentes de mata urbana, pode ser um elo na transmissão de arboviroses silvestres para o homem e pode estar relacionado à circulação dos agentes virais entre os animais silvestres, domésticos e vetores. O objetivo do trabalho foi detectar a presença de *Dengue virus* em *A. albopictus* e em pequenos mamíferos silvestres presentes em remanescente de Cerrado e Mata Atlântica em área urbana de Minas Gerais. Foram realizadas coletas mensais (abril/2011 a maio/2012) de culicídeos e de pequenos mamíferos em diferentes áreas remanescentes de mata presente na Unidade Fazendinha, Sabará (MG). Os mamíferos e culicídeos foram identificados com auxílio de chaves dicotômicas. *Aedes albopictus* foi submetido a testes de PCR em tempo real para detecção de dengue-vírus. Os mamíferos tiveram sangue coletado para realização de testes sorológicos (ELISA e Soroneutralização) além da detecção viral por PCR convencional. Foram coletadas 26 espécies de culicídeos e oito de pequenos mamíferos. Verificou-se que o perfil das espécies de mosquitos variou de acordo com os locais, indicando que mesmo em áreas pequenas os culicídeos demonstram preferências por determinados habitats. Houve positividade para DENV-1, DENV-2 e DENV-4 em 19 *pools* de *A. albopictus*. ELISA e soroneutralização realizado com soro dos mamíferos foram positivos para todos os sorotipos em duas espécies, uma de roedor e outra de marsupial. No Brasil, este é o primeiro relato de sorologia e virologia positivas para dengue-vírus em pequenos mamíferos. Apesar de ainda não se saber qual o real papel dessas espécies na epidemiologia da doença, especula-se que ocorra a manutenção local do vírus, fazendo dos pequenos mamíferos uma fonte de infecção para os mosquitos e para transmissão interepidêmica da doença. Uma vez que pequenos mamíferos também podem ser utilizados como fonte alimentar para as fêmeas de *A. albopictus*, a espécie pode vir a participar de ciclos enzoóticos de diversos patógenos presentes nesses mamíferos, incluindo a dengue. Com o novo quadro relatado de possível transmissão e manutenção de dengue em áreas de remanescente de mata urbana, a abrangência da doença se altera o que, conseqüentemente, leva ao questionamento da metodologia de controle da doença frente a um novo quadro epidemiológico relatado.

ABSTRACT

Dengue is an arbovirus that it caused by *Dengue virus* and transmitted by *Aedes aegypti* in Brazil and *A. albopictus* in Southeast Asia. Currently, the only available measure to break the virus transmission chain it's fighting the vectors involved in the transmission since there is no vaccine or specific medication. *Aedes albopictus* in forest remnants inside urban areas may be a link in the arboviruses transmission to man, as it features eclectic behavior regarding host-seeking habit, and these places have greater proximity to humans. The fauna survey of mosquitoes and small mammals present in urban forest remnants is needed to understand the dynamics of environmental change, mainly anthropogenic character. With this set up risk factors in certain habitats, this may be related to the movement of viral agents among wild, domestic and vector. The aim of this study was to detect the presence of *Dengue virus* in *A. albopictus* and wild small mammals present in Cerrado and Atlantic Forest remnants in urban area of Minas Gerais State, Brazil. Were collected monthly (April/2011 to May/2012) of mosquitoes and small mammals in different areas of remaining forest in Sabará/MG. *Aedes albopictus* was tested by real-time PCR for detection of *Dengue virus*. The mammals had blood collected for serological tests (ELISA and soroneutralization) and for viral detection by conventional PCR. We collected 26 mosquitoes species and eight of small mammals. It was found that the mosquitoes species profile varied according to local and show that they prefer some kind of habitats. There were positivity for DENV-1, DENV-2 and DENV-4 in 19 pools of *A. albopictus*. Serological tests of mammals were positive for all serotypes in two species, rodent and marsupial. In Brazil, this is the first report of virology and serology positive for dengue-virus in small mammals. Although up to now we don't understand what is the role of these species in dengue epidemiology, it is speculated to occur on-site maintenance of the virus, making small mammals as a source of infection for mosquitoes and disease interepidemic transmission. Since small mammals can also be used as a blood source for *A. albopictus* females, the species can come to participate in enzootic cycles of various pathogens in these animals, including dengue. With the new framework reported the possible transmission and maintenance of dengue in areas of remnant urban forest, the scope of the disease changes and leads to questioning and a differentiated approach to disease control in front of a new framework epidemiological reported.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Aedes albopictus*: biologia, ecologia e sua relação com a transmissão de arboviroses

Os insetos conhecidos popularmente no Brasil como mosquitos, pernilongos, muriçocas ou carapanãs pertencem à ordem Diptera e família Culicidae (Consoli & Oliveira 1994). Nesta família destaca-se *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse 1894, considerada a segunda espécie em importância para o homem, como vetor do dengue-vírus, sendo superado apenas pelo *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762) (Knudsen 1995). A espécie, assim como os demais membros da família, possui ciclo de vida do tipo holometábolo, ou seja, passa por quatro estágios durante seu desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto (Forattini 2002).

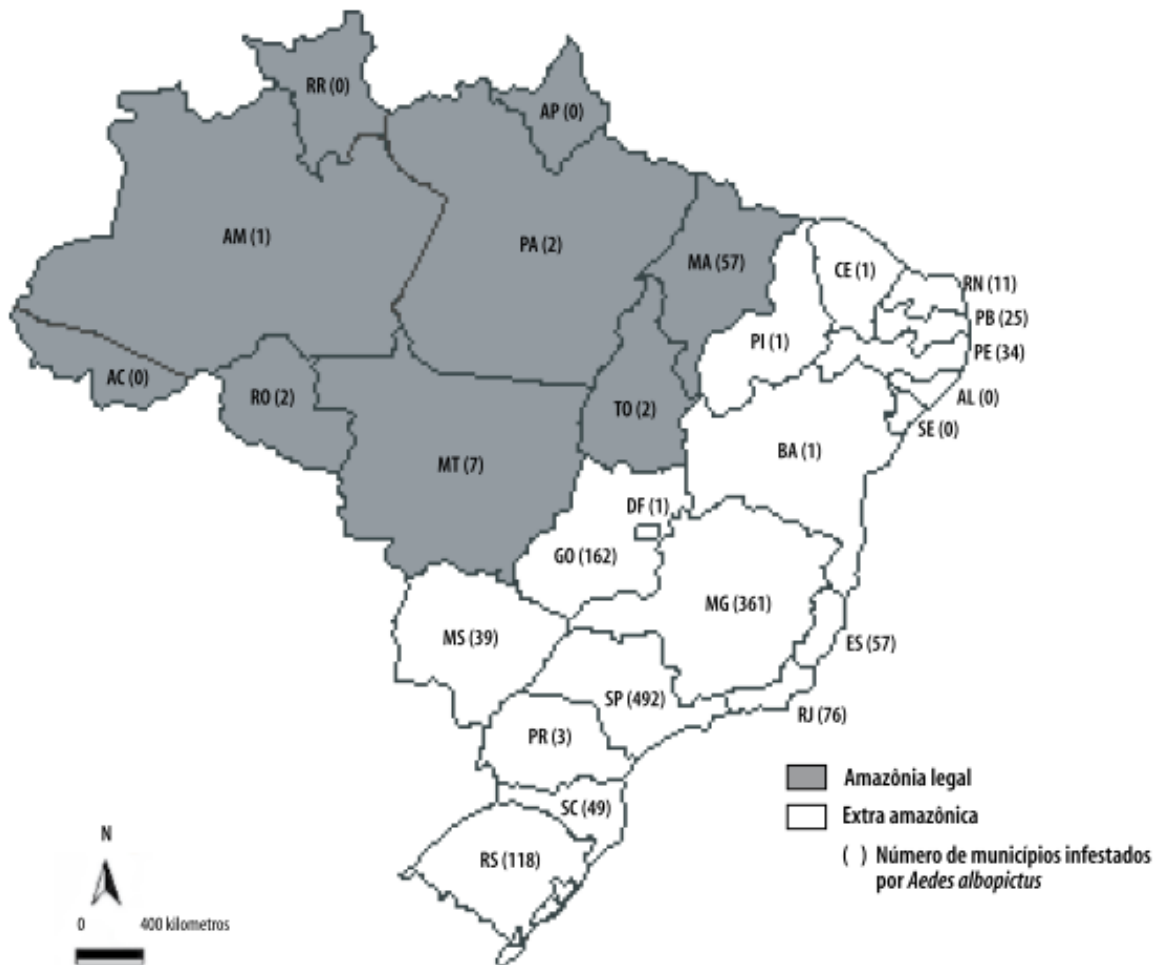
Os criadouros dos mosquitos do gênero *Aedes* são considerados como de caráter transitório e desenvolvem-se em recipientes artificiais e naturais, como ocos de árvores, cascas de frutas, internódios de bambu (Borges 2001, Forattini 2002), aproveitando algumas vezes dos mesmos tipos de criadouros do *A. aegypti* (Consoli & Oliveira 1994).

Aedes albopictus possui hábitos diurnos, apresentando o pico da atividade hematofágica nos períodos matutino e vespertino (Forattini 2002). A espécie apresenta uma valência ecológica de maior amplitude, sendo considerada como silvestre, eclética e oportunista quanto ao hábito hematofágico (Borges 2001). Dificilmente entra nas casas, não apresentando antropofilia acentuada como ocorre em *A. aegypti* (Tauil 2001, Castro-Gomes et al. 2005).

O mosquito *A. albopictus* tem origem Asiática, com distribuição primária incluindo o Sudeste do Continente Asiático, Região Oriental, Australásica, Oceania e Paleártica. Destas localidades espalhou-se para a Europa, África, América do Norte e do Sul, além do Caribe e em regiões tropicais e subtropicais do globo (Miller & Ballinger 1988, Estrada-Franco & Craig 1995, Castro-Gomes et al. 1999, La Corte 2003, Fé et al. 2003, Braks et al. 2003, Eiras 2011), principalmente através do transporte de pneus contendo ovos e larvas da espécie (Gratz 2004). É denominado em algumas localidades como “Tigre Asiático” (Knudsen 1995, Borges 2001, Benedict et al. 2007).

No Brasil, os primeiros relatos da presença do *A. albopictus* foram realizados no ano de 1986 em material proveniente de coletas do Estado do Rio de Janeiro (Forattini 1986) e em

São Paulo, no mesmo ano, onde larvas foram encontradas em recipientes artificiais na área urbana (Brito et al. 1986). No ano seguinte, a espécie foi encontrada em Belo Horizonte (MG) (Neves & Spinola 1987). Vinte e sete anos após sua detecção no Brasil, a espécie é encontrada em 21 dos 26 Estados brasileiros mais o Distrito Federal (Fig. 1), sendo que esta infestação pode ser mais abrangente, devido principalmente à carência de investigações entomológicas (Castro-Gomes et al. 2008).



Fonte: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão, Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue.

Figura 1- Distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (Castro-Gomes et al. 2008).

Vários trabalhos têm demonstrado a suscetibilidade desta espécie a diferentes arbovírus, como *Chikungunya Virus*, vírus da Encefalite Equina, *La Crosse Virus*, *Oropoche virus* (Shroyer 1986, Hawley 1988, Estrada-Franco & Craig 1995, Mitchell 1995, Borges 2001, Gratz 2004, Lambert et al. 2010). Em condições laboratoriais no Japão e Itália, A.

albopictus mostrou-se competente para transmitir a *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856) (Konishi 1989, Cancrini et al. 1995).

O primeiro registro que relacionou *A. albopictus* com a transmissão de *Dengue virus* foi realizado nas Filipinas em 1926 (Siller et al. 1926 *apud* (Ibanez-Bernal et al. 1997). Simmons et al. (1931) permitiram que voluntários com dengue em período de viremia fossem picados por fêmeas de *A. albopictus* criadas em laboratório. Decorrido o período de incubação extrínseca (tempo necessário para replicação viral e migração das partículas infectantes para as glândulas salivares do mosquito), as mesmas fêmeas foram aptas a transmitir o vírus para voluntários saudáveis. Esta espécie é a principal transmissora do vírus da dengue no Sudeste Asiático (Shroyer 1986) e é considerada vetora de manutenção de dengue em áreas rurais de países endêmicos do Sudeste Asiático e Ilhas do Pacífico (Gratz 2004).

Nas Américas o primeiro isolamento de *Dengue virus* (DENV-1) em *A. albopictus* foi constatado em 1993 (Serufo et al. 1993) a partir de larvas provenientes do município de Campos Altos, MG. Posteriormente, estudos realizados com larvas e adultos de *Stegomyia albopicta* (*A. albopictus*) na cidade de Pompéu, MG, detectaram a transmissão vertical de DENV-2 (Cecílio et al. 2009). Coletas de mosquitos realizadas em Santos (SP) também detectaram adultos e larvas da espécie infectados com DENV-3 (Figueiredo et al. 2010).

O papel do *A. albopictus* na transmissão do *Dengue virus* na epidemia de dengue ocorrida na cidade de Vitória (ES) em 1998 foi investigado e se sugeriu que a espécie ainda não pode ser considerada vetor inter-humano de dengue no Brasil (Degalliér et al. 2003). O aumento da população desta espécie pode contribuir para elevar o risco de transmissão de dengue, apesar de não existir comprovação da transmissão do vírus pelo *A. albopictus* no país (Alencar et al. 2008). Contudo, existem indícios de que a espécie possa ter tido participação na epidemia de dengue ocorrida na cidade de Santos em 1999 (Figueiredo et al. 2010).

Apesar das evidências anteriormente citadas da circulação de DENV em larvas e adultos de *A. albopictus*, o MS não reconhece a espécie como vetora de dengue no Brasil, sendo todas as medidas de controle voltadas exclusivamente para *A. aegypti* (Brasil 2002a, 2013a).

A dificuldade em se controlar a expansão do *A. albopictus* já foi descrita por Estrada-Franco & Craig (1995), devido principalmente à sua distribuição em criadouros naturais e artificiais em áreas urbanas, peri-urbanas e silvestres. Castro-Gomes et al. (2005) alertaram sobre a ocupação pelo *A. albopictus* de áreas urbanas com presença de vegetação, pois esses locais não estão incluídos na rotina de vigilância entomológica do Programa Nacional de

Controle de Dengue (PNCD). O encontro da espécie em ambientes silvestres, rurais, suburbanos e urbanos e sua transição por entre estes diferentes habitats permite uma proximidade do mosquito com os seres humanos e possivelmente uma maior exposição destes a várias arboviroses, incluindo dengue (Miller & Ballinger 1988, Mitchell 1995, Gratz 2004, Alencar et al. 2008).

Aedes albopictus é espécie invasora, com alto grau de dispersão e adaptação, apresentando potencialidade de ocupar diferentes ambientes. Aliada à sua avidez e preferência por se alimentar em mamíferos, especula-se que a espécie possa atuar como vetor da febre amarela e dengue também nas Américas (Shroyer 1986, Ali & Nayar 1997, Borges 2001, Forattini 2002, Gratz 2004, Alencar et al. 2008). Sua competência vetorial vem sendo objeto de investigação devido ao seu habitat silvestre, que pode estabelecer um elo entre o ciclo de arbovírus em mamíferos e no homem (Alencar et al. 2008, Barreto & Teixeira 2008).

1.2. Métodos de coleta de culicídeos

O monitoramento de vetores realizado através da coleta dos insetos pode determinar mudanças geográficas e realizar medições populacionais ao longo do tempo, fornecendo subsídios para intervenções na saúde pública (Brasil 2009). Pode também estabelecer padrões de sazonalidade, de riqueza, composição e estrutura da comunidade, possibilitando a tomada de decisão para atividades de conservação em conjunto com medidas epidemiológicas (Beketov et al. 2010). Esse monitoramento pode ser realizado através da coleta de ovos, larvas, pupas e adultos dos vetores. Com os dados da identificação do material são gerados índices entomológicos, utilizados para se estipular risco de transmissão de patógenos e medidas de infestação do vetor (Castro-Gomes 1998, Brasil 2009).

Armadilhas de oviposição são depósitos de água alocados em locais estratégicos com intuito de se atrair fêmeas para postura de ovos (Brasil 2001). Para a coleta de ovos de culicídeos, principalmente *A. aegypti*, a ovitrampa, descrita na década de 1960 por Fay & Perry (1965) e modificada por Fay & Eliason (1966), foi utilizada inicialmente no monitoramento de vetores da febre amarela e ainda hoje é utilizada em alguns municípios como metodologia para detecção de vetores de dengue (CDC 1967, Brasil 2001, AFPMB 2012). Constituída por pote preto fosco, possui em seu interior água ou infusão de gramínea diluída e uma palheta de madeira compensada de 10 x 2.5cm, onde as fêmeas depositam seus

ovos. A ovitrampa apresenta alta sensibilidade para detecção de populações de *Aedes* spp. em campo quando comparado à pesquisa larvária, ou seja, busca por formas larvais nos criadouros (Braga et al. 2000, Gama et al. 2007). Apesar de sua sensibilidade, a ovitrampa demanda tempo em laboratório para a eclosão, crescimento e identificação das larvas, o que atrasa a obtenção do resultado em uma semana ou mais (Facchinelli et al. 2008).

O monitoramento larvário ou pesquisa larvária consiste na busca ativa por criadouros positivos para formas imaturas de mosquito no intra ou peridomicílio. É a metodologia padrão na investigação entomológica preconizada pelo PNCD e relacionada à epidemiologia de dengue no Brasil (Brasil 2001, 2009). São realizadas coletas bimestrais ou quatro levantamentos rápidos de índices entomológicos (LIRAA) por ano, para avaliar e controlar a situação vetorial local (Brasil 2009).

Também são utilizadas armadilhas para captura de larvas, denominadas larvitrapas, para monitoramento do vetor em áreas como portos fluviais ou marítimos, aeroportos e rodoviárias. Constituída de material preto fosco, como parte de pneu usado, possui 2/3 do seu volume preenchido com água e tem como objetivo detectar precocemente infestações importadas (Brasil 2001). É uma armadilha que requer monitoramento rigorosamente semanal, pois se as formas imaturas não forem retiradas, o local pode vir a se tornar um criadouro (Lima et al. 1989, Brasil 2001, 2009).

Métodos amostrais e indicadores de abundância de vetores de dengue, em especial *A. aegypti*, são tradicionalmente baseados em índices de monitoramento gerados a partir de coletas larvais ou de ovos. Apesar disso, pouco se aproximam da abundância de adultos e possuem uso limitado quanto à estimativa do risco de transmissão do patógeno (Focks 2003).

O uso de armadilhas para captura de vetores adultos é fundamental para o desenvolvimento de novos indicadores de risco de transmissão de patógenos e de densidade vetorial (Castro-Gomes 1998, Gubler 1998). O monitoramento de mosquitos adultos por armadilhas possibilita também analisar a distribuição espacial, paridade, suscetibilidade a patógenos, resistência a inseticidas e entrada de espécies exóticas (Barata et al. 2001, Kroeckel et al. 2006, Ritchie et al. 2006, Eiras & Resende 2009). Apesar de sua utilidade, Focks (2003) alerta que a aplicação dessa metodologia deve estar inserida em um contexto operacional ou de pesquisa, por ainda não se saber a relação entre o número de adultos coletados e a população real em campo e, também, a relação entre número de adultos e transmissão do patógeno.

Os métodos para coletar mosquitos adultos como a isca humana (Service 1993a, b) e aspiradores portáteis (Nasci 1981) não têm sido usados para monitoramento do vetor, uma vez que são invasivos, laboriosos e expõem técnicos no campo ao risco de serem infectados por patógenos (Reiter & Nathan 2001). Além disso, os resultados obtidos através destas metodologias podem variar de acordo com a habilidade humana e a motivação do operador (Service 1993a).

Algumas armadilhas têm sido utilizadas em pesquisa para o monitoramento da população de adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus*, como a Adultrap[®] (Castro-Gomes et al. 2007, Maciel-de-Freitas et al. 2008) e a MosquiTRAP[®] (Fávaro et al. 2006, 2008, Gama et al. 2007, Eiras & Resende 2009), que coletam fêmeas grávidas à procura de criadouros. Ambas são consideradas armadilhas passivas, pois não se utilizam de mecanismos de sucção ou equipamentos elétricos para capturar os insetos. Já armadilhas como Fay-Prince (Fay & Prince 1970, Canyon & Hii 1997, Jones et al. 2003), CDC[®] (Sudia & Chamberlain 1962, Silva et al. 2005, Xue et al. 2008, Hoel et al. 2009) e BG-Sentinel[®] (BGS) (Biogents AG, Regensburg, Germany) (Kroeckel et al. 2006, Maciel-de-Freitas et al. 2007, Gama et al. 2012, Azara et al. 2013) que capturam fêmeas a procura de repasto sanguíneo, são consideradas armadilhas ativas, por possuírem mecanismos de sucção ou auxílio elétrico para realizar a captura dos insetos.

A BGS é uma armadilha composta por um sistema de ventilador que proporciona um fluxo de ar em direção ao seu interior, o qual aspira os mosquitos para um saco coletor, e um atrativo sintético químico (BG-Lure[®]), composto por amônia, ácido láctico e ácido capróico que mimetiza o odor humano (Geier et al. 2004, 2006, Kroeckel et al. 2006). A dinâmica de circulação dos odores provenientes do atrativo na armadilha forma correntes de convecção que simulam aquelas emanadas por um hospedeiro humano (Geier et al. 2006, Farajollahi et al. 2009). Esta armadilha foi desenvolvida no Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Regensburg (Alemanha) em parceria com o Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - ICB/UFMG, Brasil.

Vários estudos indicam a armadilha BGS como ferramenta para captura de culicídeos, em especial *A. aegypti* e *A. albopictus* (Maciel-de-Freitas et al. 2006, Krueger & Hagen 2007, Hapairai et al. 2013). A armadilha BGS foi avaliada em campo em Belo Horizonte (MG), sendo considerada uma ferramenta sensível para medir a densidade de *A. aegypti* (Kroeckel et al. 2006).

Sabe-se que o gás carbônico (CO₂) é o estímulo olfatório mais importante envolvido na procura de hospedeiros por mosquitos, que detectam a diferença de concentração do gás entre a atmosfera e a do ar emanado pelo hospedeiro (Gillies 2009). Armadilhas como a CDC e a Fay-Prince são utilizadas iscadas com CO₂ para aumentar o número de mosquitos adultos capturados (Service 1993a, Xue et al. 2008). Ao se adicionar CO₂ na BGS em área urbana da Austrália, obteve-se um aumento de 33 vezes na captura de fêmeas de *A. albopictus*, quando comparada com a armadilha CDC (Meeraus et al. 2008).

Alterações no modelo original da BGS (BG-Malária) têm permitido a coleta de espécimes do gênero *Anopheles*, especialmente *Anopheles (Nyssorhyncus) darlingi* Root 1926 no norte do Brasil (Gama et al. 2013). Levantamento da fauna de culicídeos realizada na cidade de Porto Velho (RO) utilizando a BGS acrescida de gelo seco como fonte de gás carbônico, resultou na captura de nove gêneros de culicídeos (*Coquillettia*, *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Uranotaenia* e *Wyeomyia*) (Gama et al. 2012). Estes resultados indicaram que a armadilha também pode ser utilizada como metodologia de amostragem de culicídeos adultos, por coletar outros gêneros além do *Aedes* (Gama et al. 2012).

As forças armadas dos EUA publicaram um guia de bolso para controle de vetores de *Chikungunya virus* e *Dengue virus*, onde relataram que a BGS é uma ferramenta melhor do que a CDC para o monitoramento de *A. aegypti* e *A. albopictus* (AFPMB 2012).

1.3. Estudo da paridade das fêmeas de *Aedes*

A estimativa de porcentagem de fêmeas páridas numa população de mosquitos é útil, pois é um indicativo de que as fêmeas já realizaram ao menos uma alimentação sanguínea e, com isso, podem estar infectadas por patógenos (Hoeck et al. 2003). Fêmeas que ainda não realizaram nenhuma postura de ovos são denominadas nulíparas e aquelas que já fizeram pelo menos uma oviposição, são denominadas oníparas ou páridas (Detinova 1962, Forattini 2002) (Fig. 2).

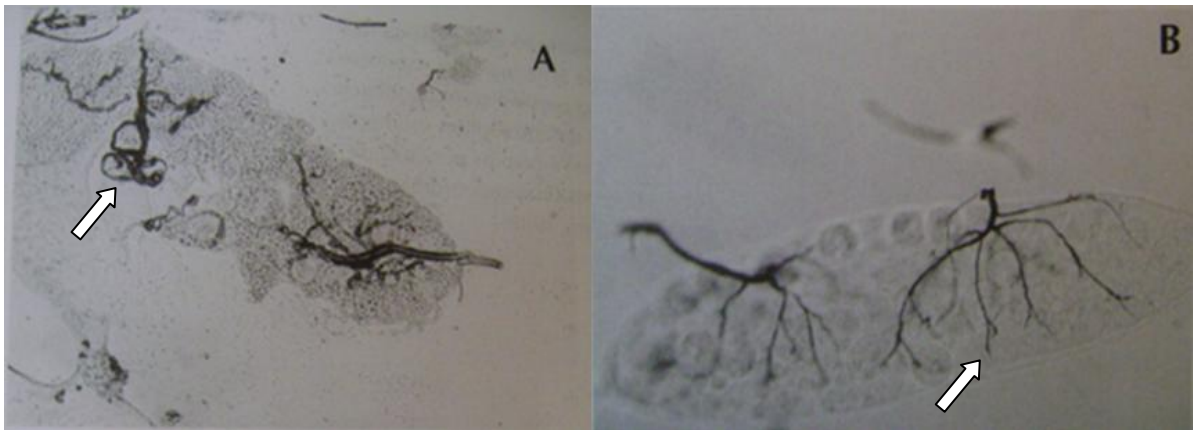


Figura 2 - Ovário de culicídeos. **A.** Ovário de fêmea nulípara com extremidades das traqueíolas noveladas (seta); **B.** ovário de fêmea onípara ou párida com extremidades das traqueíolas distendidas (seta) (Reiter & Nathan 2001).

Os dados obtidos com o estudo da paridade das fêmeas fornecem estimativas sobre a idade fisiológica da população de culicídeos e, a partir de sua análise, é possível avaliar modificações na proporção dos indivíduos da população e estabelecer sua significância epidemiológica (Detinova 1962, Forattini et al. 1993). Uma revisão sobre a biologia de *A. albopictus* detectou que fêmeas dessa espécie em laboratório apresentaram concordância gonotrófica, ou seja, realizaram um repasto sanguíneo para cada postura de ovos, e poucas fêmeas de campo precisaram realizar mais de um repasto sanguíneo para realizar a oviposição (Hawley 1988). Em estudo sobre a sobrevivência de populações de *A. albopictus* em ambiente urbano e rural, percebeu-se discordância gonotrófica (a realização de mais de um repasto para uma postura de ovos) quando sua idade fisiológica foi analisada. Este fato implicaria em um incremento na probabilidade da fêmea se infectar e transmitir patógenos de um hospedeiro para outro (Fernández & Forattini 2003).

1.4. Dengue

A dengue é hoje a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui-se em sério problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países tropicais, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação de seu principal vetor, *A. aegypti* (Brasil 2002a, WHO 2009). Estima-se que 50 milhões de pessoas sejam infectadas pelo vírus anualmente e que 2,5 bilhões vivam em áreas endêmicas (Fig. 4) e, com isso, em

risco de adoecerem (Deen et al. 2006, Halstead 2007, 2008, WHO 2009, San Martín et al. 2010).

A dengue apresenta como agente etiológico os vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, sendo conhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler 1998, Halstead 2008). São vírus RNA fita simples positiva (ss⁺RNA), envelopados e com o genoma contendo aproximadamente 11kb (Holmes & Twiddy 2003). Cada sorotipo apresenta ainda variantes genéticas ou genótipos, com alta similaridade nas sequências nucleotídicas, que podem estar relacionados com formas mais severas ou brandas da doença (WHO 2009, Acosta et al. 2011).

A partícula viral madura (Fig. 3) apresenta 50 nm de diâmetro e possui múltiplas cópias das três proteínas estruturais [a do capsídeo (C), a precursora de membrana (prM) e a proteína do envelope, (E)], uma membrana bicamada derivada do hospedeiro e uma cópia de RNA fita simples (WHO 2009).

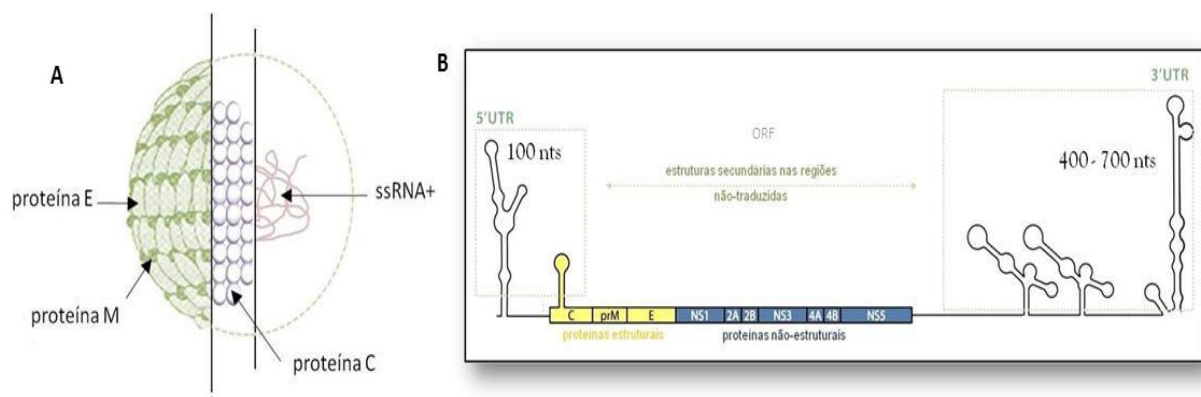


Figura 3- Esquema da partícula viral e do genoma de dengue-vírus **A.** Estrutura viral; **B.** Estrutura geral do genoma do dengue-vírus. Regiões não tradutoras 5' e 3' (UTRs) e *open reading frame* (ORF) indicando proteínas estruturais (C-prM-E) e não estruturais (NS1-NS2AB-NS3-NS4AB-NS5): (Clyde et al. 2006 adaptado).

A transmissão de dengue ocorre quando uma fêmea de *Aedes* realiza hematofagia em uma pessoa infectada com o vírus durante o período de viremia (um dia antes da febre até aproximadamente o sexto dia da doença) (Brasil 2006). Decorrido o período de incubação extrínseca (período necessário para replicação, maturação das partículas virais e migração para as glândulas salivares), que pode variar entre oito a 12 dias após a picada infectante, a

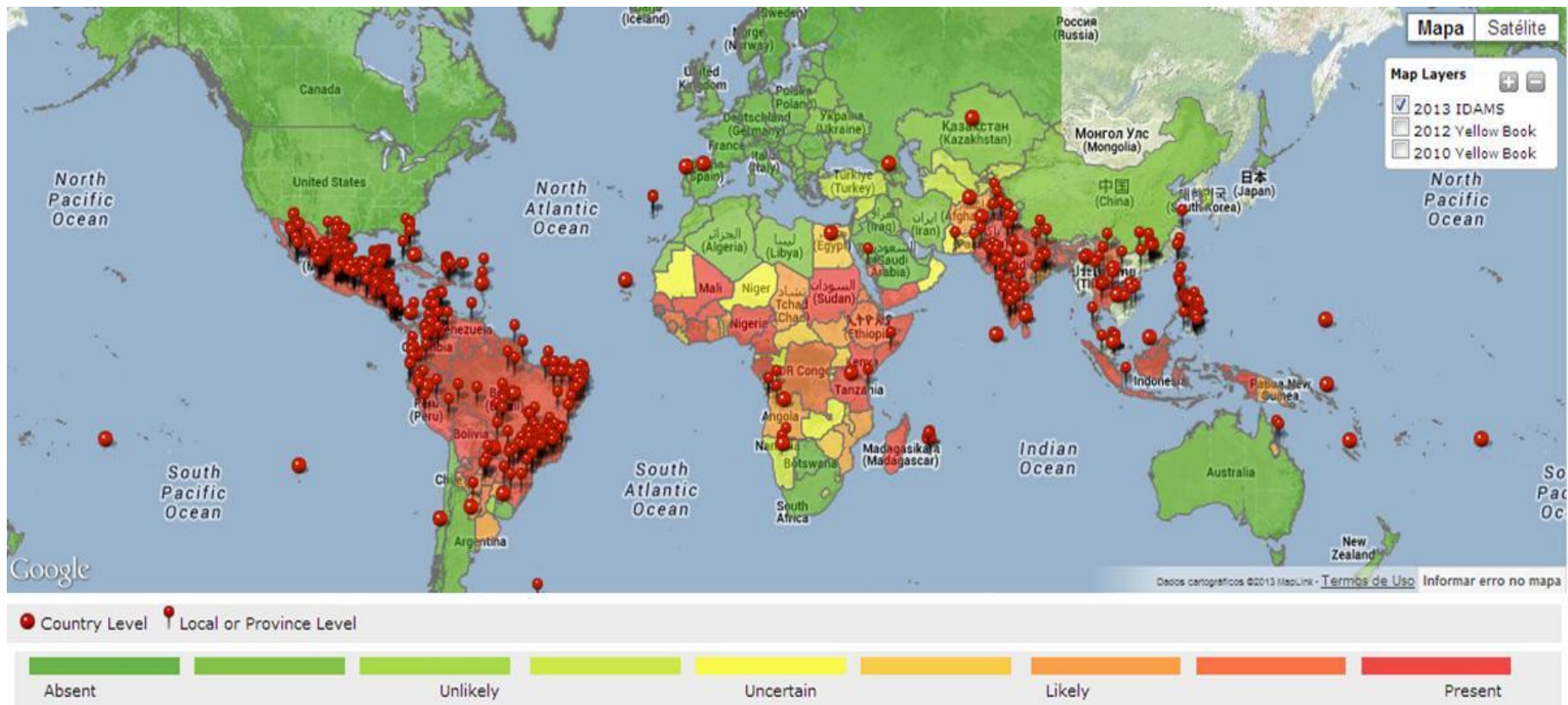


Figura 4- Áreas de risco de transmissão de dengue. Escala colorimétrica indica áreas sem transmissão (verde) até áreas com transmissão detectada (vermelho). Marcações em pontos apontam casos locais e regionais de dengue em 2013 (CDC 2013a).

fêmea já estará apta a transmitir o *Dengue virus* para outro hospedeiro por meio da saliva infectada com o vírus (Halstead 2008).

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda cujas manifestações clínicas, sintomatologia e gravidade são bem diversas entre os pacientes. Fatores como infecção secundária pelo dengue-vírus, idade, sexo, estado nutricional e doenças crônicas tem interferência direta na severidade da dengue (Vaughn et al. 2000). De forma geral há quadros de casos assintomáticos ou oligossintomáticos, passando pela dengue clássica com febre alta, artralgia, mialgia, exantema, dor retroorbital até dengue hemorrágica e síndrome de choque da dengue (dengue severa) (WHO 2009), sendo este último frequentemente fatal devido à permeabilidade capilar e ao extravasamento de plasma anormais, além do quadro hemorrágico grave (Brasil 2006, San Martín et al. 2010).

A resposta imunológica adquirida por uma infecção por dengue-vírus consiste na produção de anticorpos IgM e IgG contra proteínas do envelope do vírus. O perfil imunológico é diferenciado na infecção primária (primeiro contato com dengue ou outros *Flavivirus*) ou secundária (contato prévio com os vírus), sendo o diagnóstico dependente da fase da infecção (CDC 2013b). Durante uma primeira infecção há o aumento de anticorpos IgM, entre o 5° e 6° dias da doença, e de IgG após aproximadamente sete dias. Na infecção secundárias, os títulos de IgG são detectados mesmo na fase aguda da doença, sendo IgM menos detectado ou em alguns casos até ausente. Portanto, anticorpos IgM são marcadores de infecção recente e os altos títulos de IgG um critério para detecção de infecção secundária (Guzmán & Kourí 2004) (Fig. 5).

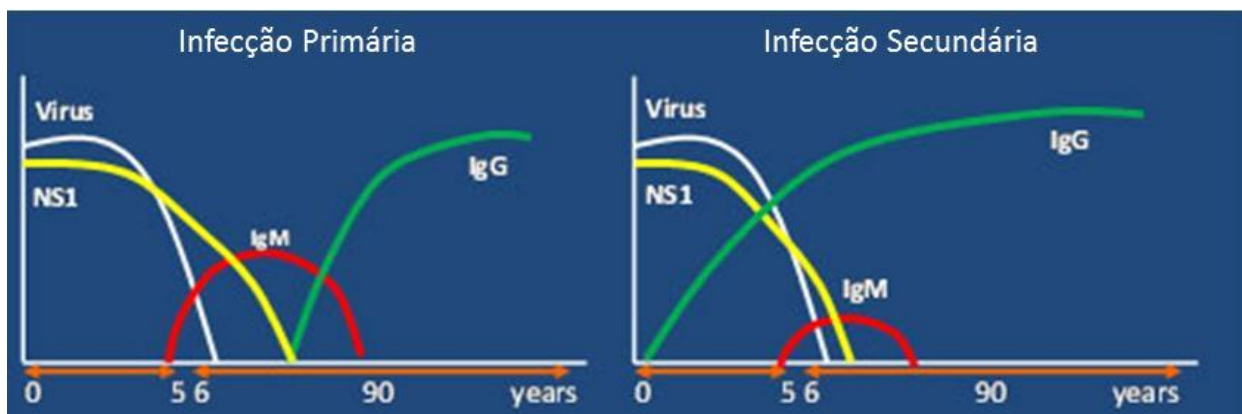


Figura 5- Representação do perfil da resposta imunológica das infecções por dengue-vírus. (CDC 2013b adaptado).

No Brasil há relatos de casos de dengue ocorridos nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, no período de 1846 a 1853. Apesar disso, as primeiras citações na literatura científica datam de 1916 em São Paulo e em 1923 em Niterói (Barreto & Teixeira 2008). Na região da Amazônia foi realizado um inquérito sorológico entre 1953 e 1954, encontrando-se positividade para o vírus da dengue em moradores locais, sugerindo que houve circulação viral na região. Nas décadas de 1950 e 1960 o *A. aegypti* foi considerado erradicado do país, sendo reintroduzido em seguida, infestando praticamente todos os estados do Brasil (Teixeira et al. 1999).

A primeira epidemia de dengue com confirmação laboratorial no Brasil aconteceu em 1982, na cidade de Boa Vista (RO) onde foram isolados dois sorotipos: DENV-1 e o DENV-4 (Câmara et al. 2007). Em 1986 houve a reintrodução do sorotipo DENV-1 e em 1990 do DENV-2, ambos no Rio de Janeiro. Após esse evento, a circulação viral se expandiu assim como o vetor *A. aegypti*. Em 2003, também no Rio de Janeiro, ocorreu pela primeira vez o isolamento de DENV-3 (Teixeira et al. 2005) e em 2005 amostras de pacientes em Manaus (AM) foram positivas para DENV-4 (Figueiredo et al. 2008), sendo a circulação do sorotipo reconhecida pelo MS somente em 2011 (Brasil 2011a).

Atribui-se à introdução de novos sorotipos as ondas epidêmicas de dengue que ocorreram no Brasil nos períodos de 1986-1987, 1990-1991 (nesse período sendo detectados os primeiros casos de dengue hemorrágica) e 1997-1998, devido também à rápida dispersão do vetor em grande extensão territorial que possibilitou a circulação viral em maior número de Estados e Municípios e provocou uma rápida ascensão da doença. Em 2003 foi registrado o maior número de casos de dengue notificados (800 mil) até então (Braga & Valle 2007). E, com a reintrodução do sorotipo DENV-2 entre 2007 e 2008, houve o maior número de casos fatais de dengue (158) registrado no Brasil (San Martin et al 2010).

Em Minas Gerais, a partir de 1990, houve um crescente no número de casos confirmados de dengue, sendo registrados 286 em 1991, 2.832 em 1995 e 147 mil em 1998. Entre 2000 e 2009 a média anual de casos foi de 35 mil, sendo que, em 2010, ocorreu a maior epidemia até então registrada, com aproximadamente 215 mil casos notificados da doença e 106 óbitos. Entre 2011 e 2012 houve média de 35 mil casos confirmados (FUNED 2012, SES 2012).

De acordo com o mais recente boletim epidemiológico da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, até a semana epidemiológica 38 (15 a 21/09/2013) foram

confirmados 293,325 com registro de 105 óbitos decorrentes da doença no Estado, superando os casos registrados em 2010 (SES 2013) (Fig. 6).

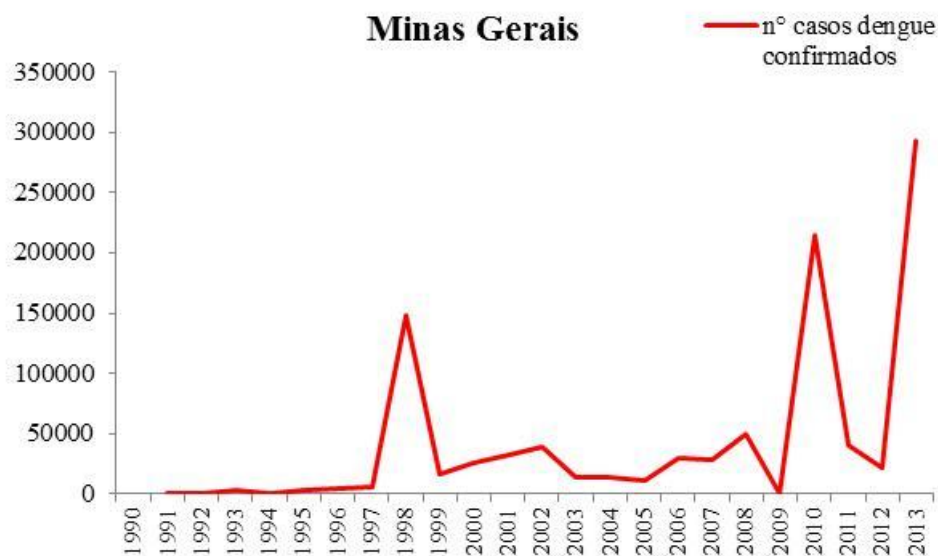
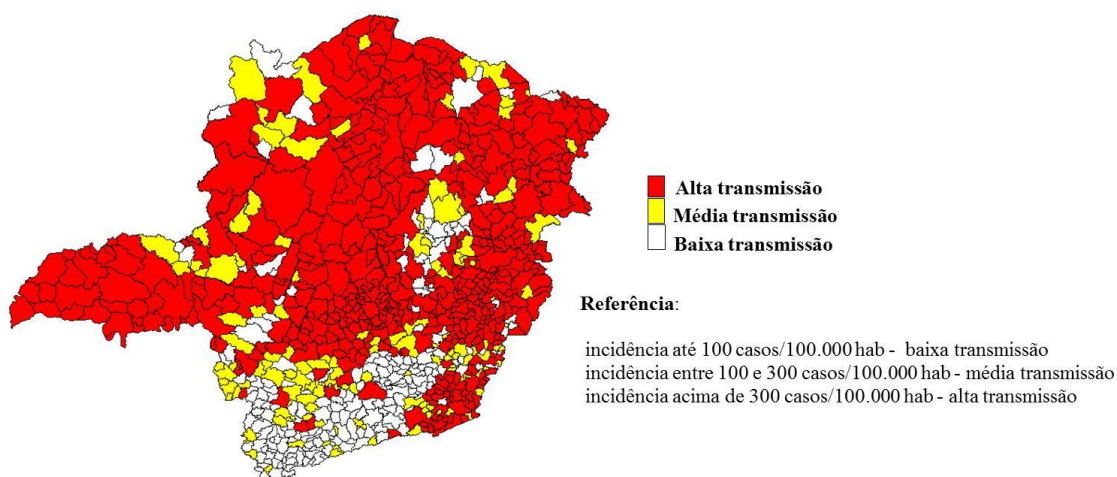


Figura 6- Número de casos de dengue notificados em Minas Gerais entre os anos 1990-2013. (SINANOnline e DVA/SVEAST/SubVPS/SES-MG 2012/2013 dados parciais sujeitos a revisão. Adaptado de SES 2013).

Atualmente os quatro sorotipos estão circulando concomitantemente no Estado e aproximadamente 80 % dos Municípios mineiros possuem altas e médias taxas de transmissão de dengue (Fig. 7).



Fonte: Planilha Simplificada - DVA/SVEAST/SubVPS/SES-MG e SINAN ONLINE

Obs: *Casos notificados -Dados parciais até 17/04/2013 sujeitos a alterações

Figura 7- Municípios do Estado de Minas Gerais e taxas de transmissão de dengue. (SES 2013 adaptado).

Dados sobre histórico de dengue e epidemiologia da doença no município de Sabará são escassos na literatura. Contudo, verifica-se no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) e nos boletins epidemiológicos publicados pelos Estados e MS, a notificação de 2,979 casos entre os anos de 2007 e 2012, sendo destes 29 casos confirmados no ano de 2011 e 50 em 2012 (MS 2013). Até abril/2013 foram 515 casos notificados com 33 confirmações no Município (Sabará 2013a).

Atualmente percebe-se que o perfil epidemiológico de dengue varia devido a fatores como a introdução de novo sorotipo, idade e condição de saúde da população humana, além de fatores climáticos, dentre outros. Observa-se um padrão sazonal com picos de número de casos notificados variando entre três e cinco anos, sendo este período mais curto a cada ano (San Martin et al 2010).

1.5. Dengue e outras arboviroses em mamíferos silvestres

O termo arbovirose (derivado da expressão inglesa “**AR**thropod + **BO**rne + **VIRUSES**”) foi primeiramente utilizado em 1942 para descrever membros de um grupo de viroses animais que se multiplicavam em artrópodes e eram transmitidos para hospedeiros vertebrados através da picada, sendo seu uso recomendado no International Subcommittee Viral Nomenclature em 1963 (WHO 1985). Dentre os artrópodes, os culicídeos representam importante grupo de transmissores de arbovírus, envolvidos no ciclo epidemiológico de Dengue, Febre Amarela, Rocio, Chikungunya, Encefalite Equina Venezuelana, febre do Oeste do Nilo entre outros (Gratz 1999).

Vírus pertencentes às famílias Bunyaviridae (Nunes et al. 2005) e Flaviviridae (de Thoisy et al. 2009) apresentam como hospedeiros e reservatórios naturais aves e pequenos roedores, dentre outros mamíferos, que são suscetíveis e capazes de circular em altos títulos, o que permite a infecção do vetor (WHO 1985). A ocorrência e a notificação de surtos relacionados a esses vírus, como dengue, febre amarela e Chikungunya podem estar diretamente relacionadas com a circulação viral em roedores e outros mamíferos em áreas adjacentes aos surtos (De Thoisy et al. 2009).

Várias espécies de pequenos mamíferos possuem importância epidemiológica por fazerem parte da manutenção, amplificação e disseminação de diferentes patógenos, como os

causadores arbovirozes (MacLean 1991), peste bubônica e hantavirozes (OPAS/MS 2008), sendo o conhecimento da dinâmica populacional dos reservatórios fundamental para a saúde pública.

O envolvimento de vertebrados silvestres na transmissão natural de arbovirozes foi primeiramente documentado na década de 1940, com estudos comparando a suscetibilidade de animais domésticos e silvestres ao vírus da encefalite equina (Hommit 1940 *apud* MacLean 1991). Em revisão sobre arbovirozes em pássaros e mamíferos silvestres nos EUA, verificou-se que estes foram considerados suscetíveis e hospedeiros de 63 arbovírus registrados no país e centenas de outros vírus no mundo (MacLean 1991).

No Brasil, foram realizadas coletas de pequenos mamíferos em área de mata em Belém (PA), utilizando armadilhas iscadas e a metodologia de captura-marcação-recaptura. Houve a captura de roedores e marsupiais de cinco gêneros e espécies. Por meio de inquérito sorológico com o sangue coletado dos mamíferos, foram detectados arbovírus em 12 roedores e três marsupiais. No mesmo trabalho foram isolados os vírus Bussuquara e Naples de *Proechimys*, sendo este gênero um provável hospedeiro para o vírus (Causey 1964).

Alguns vírus do gênero *Flavivirus* são mantidos como zoonoses silvestres que, ocasionalmente, podem acometer o homem e animais domésticos. Na África e na Ásia, tem-se demonstrado que *Flavivirus* circulam entre macacos, mas ainda não há comprovação se é um ciclo primitivo ou um ciclo humano retrógrado (Teixeira et al. 1999). Outro exemplo é o vírus da febre amarela que apresenta como reservatórios macacos Callitrichidae e Cebidae no ciclo silvestre. Esse vírus é transmitido pela picada das fêmeas de *Haemagogus janthinomys*, *H. leucocelaenus*, *Sabethes* spp. em campo, e por *A. albopictus*, em condições de laboratório (Degalliér et al. 1992).

Um inquérito sorológico para febre amarela, encefalite Saint Louis e dengue foi realizado em amostras de indivíduos pertencentes a 27 espécies de mamíferos na Guiana Francesa. Para febre amarela 10 espécies pertencentes às ordens Primata (3), Rodentia (2), Artiodactyla (1), Carnívora (1) e Xenarthra (3) foram positivas. A habilidade do vírus da febre amarela em infectar um grande espectro de hospedeiros e ser transmitido por uma série de culicídeos são características que contribuem para transmissão interepidêmica e para emergência de focos urbanos. O vírus da encefalite Saint Louis foi encontrado em três espécies: *Bradypus tridactylus*, *Tamandua tetradactyla* e *Didelphis marsupialis*, o que indica que estes mamíferos podem contribuir com a manutenção do vírus entre epidemias e amplificação viral antes e após períodos epidêmicos (Thoisya et al. 2004). Anticorpos anti-

dengue foram encontrados em cinco espécies da ordem Xenarthra (*Dasybus* sp.), Didelphimorphia (*Metachirus nudicaudatus*), Rodentia (*Dasyprocta leporina*, *Coendou* sp.) e Artiodactyla (*Mazama* sp.), o que evidencia a circulação de vírus da dengue em uma ampla gama de mamíferos silvestres, indicando que estes animais podem estar expostos a dengue (De Thoisy et al. 2004).

Para determinar se mamíferos silvestres podem se infectar com *Dengue virus*, 32 espécies pertencentes às ordens Rodentia, Marsupialia e Chiroptera foram coletados em áreas de mata periurbana na Guiana Francesa entre 2001 e 2007. Destas, 14 foram positivas, comprovadas por PCR de amostras de sangue e/ou fígado. Foi encontrada positividade em 22% dos Rodentia (33 positivos/146 testados), 12% dos Marsupialia (40/318), e 12% dos Chiroptera (19/152). Quando se comparou as sequências dos vírus dos mamíferos com os vírus da população humana circulante concomitantemente às coletas, verificou-se alta similaridade, o que indica que mamíferos presentes em áreas de mata periurbana podem se infectar com vírus circulantes em humanos, indicando um possível papel de mamíferos não primatas na manutenção do vírus de dengue em ciclos silvestres enzoóticos (De Thoisy et al. 2009).

O perfil epidemiológico de dengue no Brasil indica uma doença de caráter urbano, com transmissão homem a homem através da picada do vetor *A. aegypti*, que apresenta comportamento marcadamente antropofílico (Teixeira et al. 2005). Mas em países da África, Ásia e na Guiana Francesa, existem indícios de um ciclo silvestre da doença (Fig. 8), com a participação de hospedeiros não humanos, como primatas, marsupiais, roedores e morcegos, como reservatórios do vírus (Fagbami et al. 1977 *apud* De Thoisy et al. 2009, Teixeira et al. 1999, Thoisy et al. 2004, de Thoisy et al. 2009). Com a provável participação de espécies de mosquitos que apresentam perfil alimentar zoófilo ou mesmo eclético neste ciclo silvestre (De Thoisy et al. 2009), o *A. albopictus* se torna um possível elo de transmissão de dengue entre áreas urbanas e silvestres (Teixeira et al. 1999).

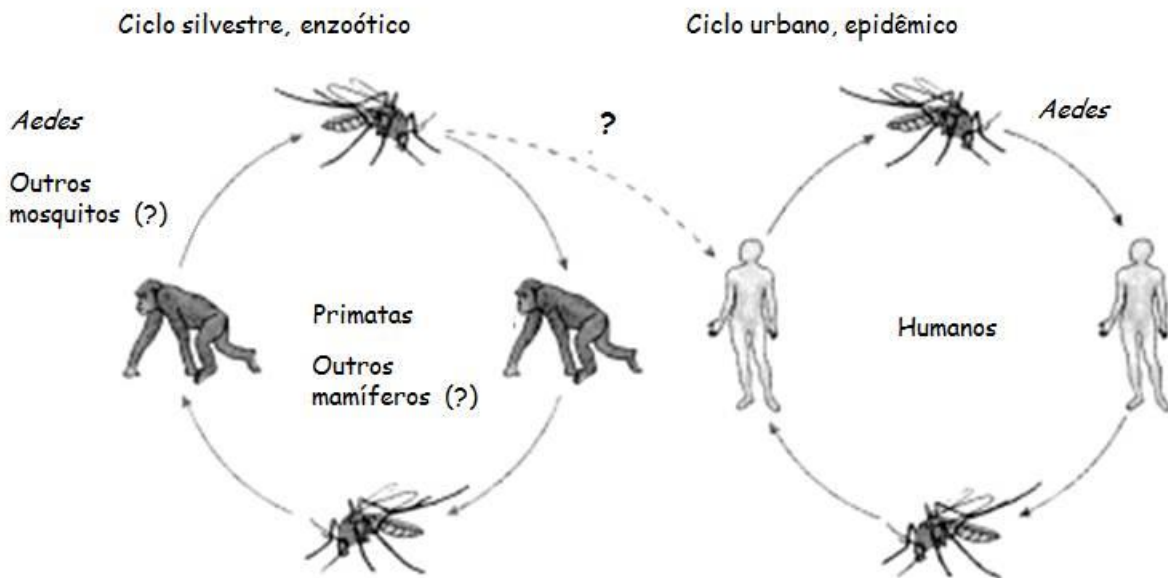


Figura 8- Representação de ciclo de dengue silvestre (esquerda) com envolvimento de primatas não humanos e ciclo urbano (direita) com o ser humano como hospedeiro definitivo (Whitehead et al. 2007 adaptado).

1.6. Diagnóstico de arbovírus

Métodos de detecção e isolamento viral têm sido rotineiramente empregados para vários arbovírus, em especial para dengue-vírus. Estes representam técnicas diversas tais como inoculação intracerebral em camundongos, cultivo em células de mamíferos, inoculação intratorácica de mosquitos adultos e cultivo em células de mosquito (Guzman et al. 1996, Vorndam & Kuno, 1997 revisado por Gubler 1998). O isolamento viral é utilizado para o acompanhamento de estudos virológicos e também para a caracterização biológica. A viremia aparece durante o período de febre e a taxa de isolamento viral é maior nas amostras coletadas até seis dias após o início da doença (Kao et al. 2005).

A caracterização molecular de ácido nucléicos, especialmente a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), tem demonstrado grande aplicabilidade no diagnóstico de DEN-V, apresentando maior sensibilidade que o isolamento viral (WHO 2009). É um teste baseado na extração, purificação, amplificação dos ácidos nucléicos e detecção do produto amplificado. Através da PCR, o material genético pode ser detectado diretamente no soro de pacientes, no meio de cultura de células de mosquito infectadas e em larvas e adultos de mosquitos

tritutados (Lanciotti et al. 1992, Chan et al. 1994, Urdaneta et al. 2004, Cecílio et al. 2009). A PCR usando transcriptase reversa (RT-PCR) foi desenvolvida para estudo de vários vírus RNA, e tem revolucionado os diagnósticos de laboratório. No caso de DENV, a RT-PCR permite uma rápida identificação sorotipo-específico (Gubler 1998, WHO 2009). O método é sensível, reprodutível e pode ser usado para detectar RNA viral em amostras clínicas, tecidos de autópsia, mosquitos adultos e larvas. Foram desenvolvidos vários métodos que utilizam oligonucleotídeos iniciadores de regiões diferentes do genoma viral, como por exemplo, os genes que codificam as proteínas C-prM, proteína E, NS1 e NS5 (Figueiredo et al. 2008, Vilela et al. 2010).

Mais recentemente a PCR em tempo real (qRT-PCR) também tem sido utilizada como ferramenta para diagnóstico de dengue (Gurukumar et al. 2009, Poloni 2009, Waggoner et al. 2013). É um teste rápido e que pode fazer diagnóstico qualitativo (presença-ausência do vírus) ou quantitativo, contabilizando o RNA viral obtido da amostra. Após o passo inicial de amplificação do alvo escolhido (primeira PCR), são usadas sondas fluorescentes que se ligam à fita dupla de DNA, permitindo a detecção do produto da reação em tempo real, sem a necessidade de eletroforese (WHO 2009).

A detecção sorológica é muito utilizada no diagnóstico das infecções virais, uma vez que estas induzem uma resposta imunológica específica mediada por anticorpos, que persiste por tempo variável podendo, dessa forma, ser detectável por meio de várias técnicas (Flores 2007). Testes sorológicos têm sido utilizados para o diagnóstico da infecção pelo dengue-vírus, como inibição de hemaglutinação (HI), fixação do complemento (CF), teste de soroneutralização de redução de placa (PRNT), ensaio imunoenzimático com imunoglobulina G (IgG) indireta (IgG-ELISA) (Monath 1990, Gubler 1998, De Paula & Fonseca 2004). Dos testes citados, a PRNT é a ferramenta mais específica para diagnóstico de infecção causada por DEN-V (Russell et al. 1967, CDC 2013b). Esse teste permite avaliar a interação entre anticorpos presente no soro dos pacientes e o vírus inoculado em placas, medindo-se o efeito da neutralização da infectividade viral na formação de placas de lise em células suscetíveis (WHO 2007).

O ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) é um dos testes sorológicos mais utilizados, principalmente por sua alta sensibilidade e praticidade na execução, sendo capaz de detectar tanto anticorpos de fase aguda (IgM), de fase convalescente (IgG) e mesmo de antígenos (De Paula & Fonseca 2004, Tran et al. 2006).

1.7. Culicídeos de fragmentos florestais inseridos em área urbana

A família Culicidae possui 3.523 espécies distribuídas em 112 gêneros por todas as regiões do globo (Harbach 2012), sendo que a diversidade de mosquitos varia de acordo com as regiões biogeográficas. Na região Neotropical são encontradas 31% das espécies conhecidas, sendo os ambientes de Floresta Tropical os mais diversos e menos conhecidos. Nas regiões Oriental (30 %), Afrotropical e Australásia (22 %) Neártica (5 %) e Paleártica (3 %) são descritas diferentes porcentagens do total da riqueza de culicídeos (Rueda 2008, Guedes 2012).

No Brasil, existem cerca de 500 espécies descritas, sendo 20 destas com grande importância epidemiológica médica e veterinária. Para Minas Gerais existem 119 espécies registradas em 168 municípios do Estado (Maciel 1962).

Os culicídeos são insetos que apresentam ampla diversificação no que se refere a locais escolhidos como criadouros, sendo considerados ubiquistas por suas formas larvares serem encontradas em pequenas coleções formadas por água da chuva, mas também em remansos e grandes coleções d'água, com diferentes graus de concentração de nutrientes. A diversificação também ocorre quanto ao hábito hematofágico das fêmeas adultas, que podem se alimentar em diversos vertebrados, principalmente mamíferos e aves (Forattini 2002).

A fragmentação de habitats é uma das mais importantes alterações ambientais na paisagem global, gerando consequências para a biodiversidade, seja na paisagem e/ou nos fragmentos florestais remanescentes (Mesquita 2009). Os fragmentos remanescentes inseridos em áreas urbanas são importantes para a persistência de várias espécies da flora e fauna, sendo muitas vezes único refúgio para diversas espécies (Briani et al. 2001).

Estes espaços podem ser explorados por culicídeos que apresentam diferentes graus de sinantropia, o que pode propiciar o contato com humanos (Urbinatti et al. 2001, Barbosa et al. 2003). A possibilidade de encontro de vetores de patógenos com a população humana incentiva o estudo da fauna presente em remanescentes de mata, seja esta de caráter silvestre, domiciliado ou na iminência de se tornar ambivalente (Barbosa et al. 2003).

Além de refúgio, nos remanescentes de mata os culicídeos podem obter repasto sanguíneo de diferentes hospedeiros, sendo médios e grande mamíferos normalmente mais utilizados como fonte de alimentação sanguínea (Alencar et al. 2005, Ponlawat & Harrington 2005, Lorosa et al. 2010), o que não exclui os pequenos mamíferos como fonte (Rao 1984).

Coletas de culicídeos em remanescente de mata urbana tem sido realizadas em diversos municípios brasileiros, como em Linhares (ES) (Rezende et al. 2011), Curitiba (PR) (Barbosa et al. 2003), Belo Horizonte (MG) (Silva & Neves 1989) e Recife (PE) (Albuquerque et al. 2000), tanto para monitoramento de espécies com enfoque mais ecológico, quanto para levantamento de potenciais espécies vetoras de patógenos.

As fêmeas da maior parte das espécies de culicídeos exercem hematofagia e durante a espoliação sanguínea causam incômodo ao hospedeiro, podendo ainda transmitir patógenos como vírus, bactérias, helmintos e protozoários (Forattini 2002). Além de apresentar importância quanto à transmissão de patógenos ao homem, como dengue, febre amarela, malária e filariose, o estudo da culicidofauna também permite avaliar o grau de alteração ocorrida em determinada região (Montes 2005).

Os culicídeos podem ser considerados bioindicadores de alterações ambientais pelo aumento, diminuição ou ausência de determinada(s) espécie(s). Espécies do gênero *Anopheles*, subgênero *Kerteszia*, são encontrados em estreita relação com ambientes silvestres e caracterizam ambientes conservados, principalmente de florestas primárias. A Tribo Sabethini engloba espécies silvestres que podem ser encontradas em áreas de vegetação secundária com perturbação antrópica não acentuada e a tribo Mansonini apresenta espécies com tendência a se adaptar a ambientes com alto grau de antropização, assim como *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) e *Culex (C.) quinquefasciatus* Say, 1823 (Dorville 1996).

1.8. Pequenos mamíferos de fragmentos florestais inseridos em área urbana

A fauna de mamíferos no Brasil é rica, com mais de 650 espécies descritas (Reis 2006). Para o Estado de Minas Gerais, são consideradas 236 espécies de mamíferos, o que engloba 35% das espécies do país, nos diversos biomas do Estado: Mata Atlântica, Caatinga, Campos Rupestres e de Altitude e Cerrado (Chiarello et al. 2008). As espécies de mamíferos do Estado estão distribuídas em 10 das 12 ordens que ocorrem no Brasil (Fig. 9), sendo Rodentia e Chiroptera as mais diversas (Gerais 2009).

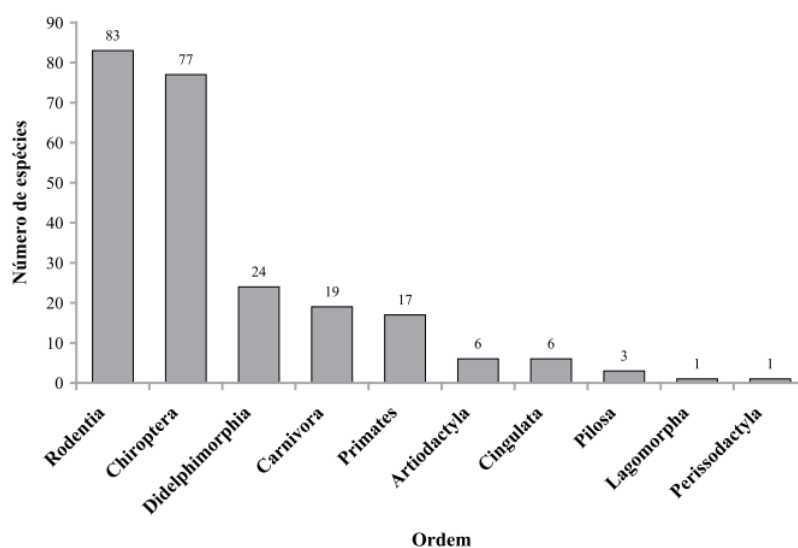


Figura 9- Número de espécies de mamíferos por ordem no Estado de Minas Gerais (Minas 2009).

Minas Gerais é um Estado onde a diversidade de tipos de ambiente, aliada a diferenças climáticas, grande variação na altitude e tipologias vegetacionais, proporcionam a ocorrência de altos índices de endemismo e diversidade de mamíferos. Os dois biomas brasileiros considerados como *Hotspots* mundiais, regiões com elevada diversidade e endemismo e sob alto grau de ameaça, estão presentes em Minas Gerais: o Cerrado e a Mata Atlântica (Myers et al. 2000).

O grupo denominado de pequenos mamíferos engloba espécies pertencentes às ordens Rodentia, Didelphimorphia e Lagomorpha, com 108 espécies conhecidas para Minas Gerais, sendo 83 roedores, 24 marsupiais e um coelho (Biota Minas 2009). Em 2011 o Instituto Estadual de Florestas (IEF) lançou uma compilação das informações sobre a fauna de Minas Gerais, onde apresentou um atlas de espécies de mamíferos encontradas em Unidades de Conservação (IEF 2011).

Briani et al. (2001) constataram que *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (gambá de orelha branca) se adapta a ambientes alterados por ação antrópica, sendo sua predominância um indicador de degradação ambiental. É uma das espécies de mamíferos silvestres mais comuns no Brasil Central e apresenta grande relevância ecológica, atuando no controle populacional de insetos e alguns pequenos mamíferos, além de ser um efetivo dispersor de sementes (Cáceres 2002). É frequentemente observado em ambientes antrópicos rurais e urbanos, apresentando alta sinantropia. Apresenta hábitos crepusculares e noturnos, e por ser onívoro e oportunista, pode se adaptar a diferentes ambientes, o que o torna um disseminador

de doenças entre o homem, animais domésticos e silvestres (Muller et al. 2005). Outro marsupial comumente encontrado em área de mata é o *Gracilinanus microtarsus*, ou catita, espécie encontrada mais comumente na Mata Atlântica, mas não se restringindo somente a este bioma, tendo então possibilidade de se adaptar a ambientes alterados pelo homem (Umetsu & Pardini 2006).

Cerradomys subflavus (Wagner, 1842), o rato do mato, é um roedor que possui habitat terrestre, em formações florestadas abertas da Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal, sendo considerado dispersor de sementes (Grenha et al. 2010). *Guerlinguetus ingrami* Thomas 1901 (caxinguelê) é encontrado do sudeste da Bahia ao norte do Rio Grande do Sul, possui hábito diurno e arborícola, preferindo estratos baixos e intermediários na Mata Atlântica, Cerrado ou Caatinga. É um mamífero escansorial, primariamente frugívoro/granívoro, mas que utiliza também na sua dieta fungos, além de outras partes vegetais, como casca de árvores e flores (Ribeiro et al. 2010). Também apresentam comportamento de predação e dispersão de sementes (Mendes & Júnior 2011).

O coelho do mato ou tapiti, *Sylvilagus brasiliensis* (Linnaeus, 1758) tem como habitat borda de matas e apresenta hábitos noturnos, sendo muitas vezes utilizado na alimentação humana (Alves et al. 2013).

A espécie *Akodon cursor* (Wagner, 1842), ou rato da mata, habita formações florestais, áreas abertas adjacentes e campos de altitude ao longo da Mata Atlântica e é considerado como possível reservatório de hantavírus (Brasil 2002b). É endêmico no Brasil e América do Sul sendo encontrada na Mata Atlântica. Aparentemente, a ação antrópica não interfere quanto à sua abundância (Geise 2012). Apresenta hábito alimentar onívoro, mas com certa preferência insetívora (Finotti et al. 2012).

Os roedores conhecidos como ratinhos do arroz, *Oligoryzomys* sp., habitam formações florestais, Mata Atlântica e Cerrado (OPAS/MS 2008). Este é um gênero que apresenta 28 espécies, sendo nove descritas para o Brasil, apresentando informações anatômicas de limites morfológicos e diferenças regionais mal estabelecidas, o que dificulta a sua identificação específica (Machado et al. 2011). Outro roedor, o rato do capim *Necromys lasiurus* (Lund, 1840) (= *Bolomys lasiurus*), habita em regiões ecótonas Cerrado-Mata Atlântica, sendo dominante em habitats do Cerrado, Cerradão e Campo Sujo (OPAS/MS 2008, Mesquita 2009). A espécie desempenha papel no ciclo de algumas zoonoses. Além de transmitir hantavírus, pode participar do ciclo epidemiológico da peste bubônica, principalmente na epizootização da doença no nordeste do Brasil (Brasil 2002b).

O estudo de pequenos mamíferos presentes em remanescentes de mata urbana é relevante, uma vez que a fragmentação afeta a fauna de diferentes formas, principalmente por criar populações pequenas e parcialmente isoladas (Briani et al. 2001) e pode muitas vezes ser a única oportunidade de preservação de algumas espécies (Barros 2007).



Figura 10- Espécies de pequenos mamíferos **A.** *Akodon cursor*; **B.** *Cerradomys subflavus*; **C.** *Necomys lasiurus*. **D.** *Oligoryzomys* sp.; **E.** *Guerlinguetus ingrami*; **F.** *Didelphis albiventris*; **G.** *Gracilinanus microtarsus*; **H.** *Sylvilagus brasiliensis*.

2 JUSTIFICATIVA

A dengue é uma arbovirose que tem seu agente etiológico, o dengue-vírus, transmitido por *A. aegypti* no Brasil e *A. albopictus* no Sudeste Asiático. Atualmente, a única medida disponível para interromper a cadeia de transmissão do vírus causador dessa grave doença é o combate aos vetores envolvidos em sua transmissão (Gubler 1998, Forattini 2002, WHO 2006), uma vez que não há vacina nem medicação específica (WHO 2009). Os casos sintomáticos de dengue são submetidos principalmente a suporte terapêutico, como repouso, uso de antipiréticos, reidratação e transfusão de sangue em casos graves (WHO 2009).

Não há relato no Brasil, até o presente momento, do envolvimento do *A. albopictus* na transmissão de dengue (Degalliér et al. 2003, Alencar et al. 2008), apesar da espécie já ter sido encontrada naturalmente infectada com o vírus causador desta arbovirose (Serufo et al. 1993, Cecílio et al. 2009, Figueiredo et al. 2010). Assim, faz-se necessário conhecer o papel do *A. albopictus* na epidemiologia da dengue no país e ainda subsidiar programas de controle e de monitoramento da espécie (Focks 2003, Siqueira et al. 2005, Eiras & Resende 2009).

O mosquito *A. albopictus* presente em áreas remanescentes de mata urbana pode ser um elo na transmissão de arboviroses silvestres para o homem, uma vez que apresenta comportamento eclético quanto ao hábito alimentar e, nesses locais, tem maior proximidade com humanos (Teixeira et al. 1999).

Estudos sobre a circulação viral entre *A. albopictus* e seus hospedeiros vertebrados permitem agregar conhecimento à compreensão da eco-epidemiologia de dengue e torna-se de grande relevância para o melhor entendimento de possíveis focos silvestres da doença.

O levantamento da fauna de culicídeos e de pequenos mamíferos presentes em remanescentes de mata urbana é necessário para o entendimento da dinâmica de alteração ambiental, principalmente de caráter antrópico (Barros 2007, Silva et al. 2010). Com isso, estabelecem-se fatores de risco existentes em determinados habitats, que podem ser relacionados à circulação dos agentes virais entre os animais silvestres, domésticos e vetores.

Embora a dengue seja uma doença de caráter urbano, transmitida homem a homem através do comportamento hematofágico de fêmeas de culicídeos, estudos sorológicos e de sequenciamento viral realizados na África, Ásia e Guiana Francesa em primatas não humanos e pequenos mamíferos sugerem que estes hospedeiros podem atuar como reservatórios para

este vírus, mantendo um ciclo silvestre da doença (De Thoisy et al. 2004, Fagbami et al. 1977 *apud* De Thoisy et al. 2009).

Considerando-se que no Brasil não existem relatos deste ciclo silvestre para o vírus da dengue, o presente estudo visa também investigar os potenciais reservatórios silvestres presentes em áreas urbanas na manutenção dessa arbovirose.

3 OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Detectar a presença de dengue-vírus em *A. albopictus* em pequenos mamíferos silvestres presentes em remanescente de Cerrado e Mata Atlântica em área urbana de Minas Gerais

3.2 - Objetivos específicos

Avaliar a estrutura da comunidade dos culicídeos e relacioná-la com fatores abióticos;

Avaliar a estrutura da comunidade de pequenos mamíferos e relacioná-la com fatores abióticos;

Verificar a presença de *Dengue virus* em *A. albopictus* capturados;

Verificar a presença de *Dengue virus* em pequenos mamíferos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Área de estudo

A área de estudo está localizada na Unidade Fazendinha do Instituto Metodista Izabela Hendrix, no bairro de Santo Antônio de Roça Grande, município de Sabará/MG, Brasil ($19^{\circ} 53' 9''\text{S}$ e $43^{\circ} 48' 45''\text{W}$). O município pertence à região metropolitana de Belo Horizonte, distante aproximadamente 50 km da capital mineira (Fig. 11). Apresenta população estimada de 126.000 habitantes, com clima subtropical úmido (classificação climática de Köppen-Geiger: Cwa), pertencendo à cadeia da Serra da Piedade. A área está inserida em uma região de transição entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica. A temperatura média anual fica em torno de 20°C , com umidade relativa do ar de 79 %. A precipitação média anual é de 1.400 mm, com período chuvoso entre outubro e abril e período de seca entre maio e setembro (IBGE 2013).

O bairro de Roça Grande possui grande importância histórica, uma vez que foi um dos primeiros arraiais do Estado de Minas Gerais, ainda no século XVIII, sendo parada de bandeirantes a caminho do sertão (Sabará 2013b).



Figura 11- A. Mapa do Estado de Minas Gerais destacado em vermelho o município de Sabará, MG. B. Região Metropolitana de Belo Horizonte, com destaque para o município de Sabará (Fonte: http://www.slideshare.net/patri_lab/crescimento-urbano-de-sabar-mg-modificacao-e-conservao-da-cidade-segundo-seus-instrumentos-legais-de-planejamento acessado em 30/04/2013).

A Unidade Fazendinha possui 31,4 hectares entre áreas construídas e vegetação. A área construída é composta por uma edificação principal onde funcionou uma escola até dezembro de 2012. A área de vegetação apresenta uma paisagem montanhosa com fortes rupturas de declive e vale encaixado à margem do Rio das Velhas, estando inserido na área de transição dos Biomas Mata Atlântica e Cerrado (Fig. 12). O entorno da Fazendinha apresenta densa ocupação urbana desordenada, sendo que os moradores do bairro possuem estreita relação com a área, onde realizam atividades de caça ilegal, soltam animais domésticos (cachorros, cavalos e vacas), além de afetarem a vegetação por meio da coleta de lenha, queimadas ilegais, utilização de trilhas para chegarem até a parte baixa do local, dentre outras atividades (Madeira et al. 2008, Rilson Barbosa, *comunicação pessoal*). A vegetação é de floresta ombrófila densa, em vários estádios de regeneração, cortada por diversas trilhas, algumas delas usadas pela população local.

Para o presente estudo foram utilizadas três trilhas e a área ao entorno da edificação principal.



Figura 92- Unidade Fazendinha em Sabará/MG, sua edificação principal (Escola) e delimitação das trilhas nas áreas de Cerrado (Trilha 1 - vermelho) e Mata Atlântica (Trilha 2- roxo e Trilha 3- laranja). (Fonte: Google Earth, 2013).

A Trilha 1 apresenta fitopaisagem condizente com Cerrado, com vegetação arbustiva e espaçada, ampla claridade e predominância de cascalho no solo. É o local com maior ação antrópica, visível pela incidência tanto de lixo quanto de diversos animais domésticos (Fig. 13).



Figura 13- Vista da Unidade Fazendinha em Sabará, MG mostrando área transicional de Cerrado (à direita), onde foi demarcada a Trilha 1, e Mata Atlântica (à esquerda).

As Trilhas 2 e 3 se diferenciam da primeira por apresentarem ambiente mais sombreado, com fitopaisagem de Mata Atlântica, vegetação arbórea e densa cobertura vegetal. Nessas trilhas o solo é coberto por folhagem e há formação de húmus. A Trilha 2 (mata preservada) apresenta uma nascente que perpassa grande parte do local e possui mata ciliar preservada. É a área com menor interferência antrópica, devido principalmente à dificuldade de acesso (Fig. 14A). A Trilha 3 (mata com interferência) apresenta vegetação com maior porte, com algumas árvores alcançando cerca de 20 a 30 metros. Esta trilha também apresenta interferência antrópica, porém menos acentuada que na Trilha 1 (Fig. 14B).

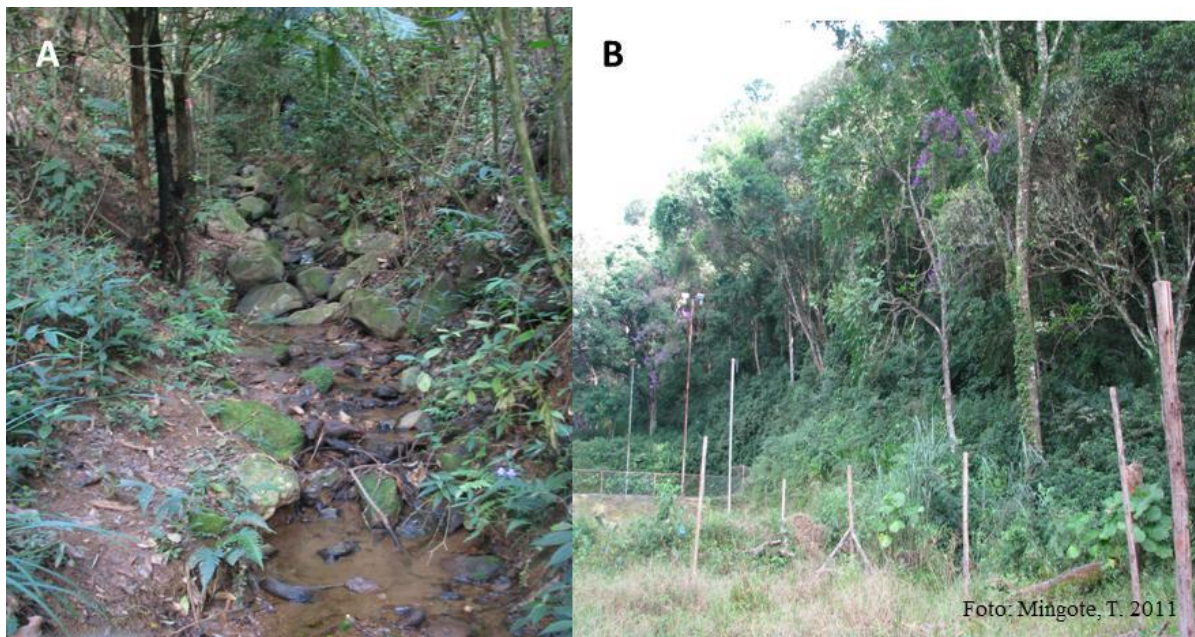


Figura 104- Vista da Unidade Fazendinha em Sabará/MG mostrando a área de Mata Atlântica. A. Trilha 2 e B. Trilha 3.



Figura 11- Edificação principal da Unidade Fazendinha, Sabará/MG, denominada de área da Escola. A. parte anterior da edificação com entrada principal; B. parte lateral da edificação; C. e D. exemplos de localização da armadilha BG-Sentinel® na área da Escola.

Em cada uma das trilhas foram demarcados 15 pontos com auxílio de fitas amarradas nos galhos e nos arbustos. Os pontos de uma mesma trilha foram equidistantes 20 metros, dando uma extensão aproximada de 300 metros.

A edificação principal da Unidade Fazendinha foi denominada de Área da Escola. No local encontram-se salas de aula, cozinha industrial e dormitórios, utilizados durante a semana pelos alunos dos cursos de gastronomia e agroecologia oferecidos pelo Instituto Metodista Izabela Hendrix. Nos fins de semana a área também era utilizada para a realização de seminários e retiros. No seu entorno foram instaladas seis armadilhas BGS, tentando-se abranger toda a área ao seu redor (Fig. 15).

4.2 - Coleta e identificação dos mosquitos

Para a coleta de adultos de culicídeos foram utilizadas armadilhas BG-Sentinel[®] (BioGents GmbH) (BGS). A armadilha possui um cilindro de tecido branco, com 60 cm de altura por 35 cm de diâmetro, um tubo central preto e, no seu interior, um ventilador que funciona por energia elétrica (12 V). Um saco coletor retém os insetos capturados, impedidos de sair pela sucção realizada pelo ventilador (Fig. 16) (Krockel et al 2006). Em todas as armadilhas foi adicionado o atraente BG-Lure[®] (BGL), composto que contém: amônia, ácido lático e ácido capróico, substâncias encontradas na pele humana que auxiliam na captura dos mosquitos (Geier et al. 2006).

As armadilhas BGS foram adaptadas para bateria de 12 V e 18 A, para serem utilizadas nas trilhas, ou seja, distante da rede elétrica. Essa adaptação permitiu o funcionamento da armadilha por 24 horas ininterruptas. Em cada armadilha foi adicionado uma embalagem de isopor contendo em seu interior aproximadamente 1 Kg de gelo seco (Oficina do Gelo Ltda.) como fonte de gás carbônico (CO₂). Nas tampas das embalagens foram feitas aberturas de aproximadamente 3 mm para introdução de um tubo de silicone (3 mm X 1,5 m), por onde o fluxo do gás (0,69 g/min estimado) foi conduzido do interior do isopor direto para a parte superior da armadilha (Fig. 16). Em cada trilha foram instaladas três BGS, distantes 100 m aproximadamente uma das outras, sendo outras seis armadilhas alocadas ao redor da Área da Escola, equidistantes 50 m.

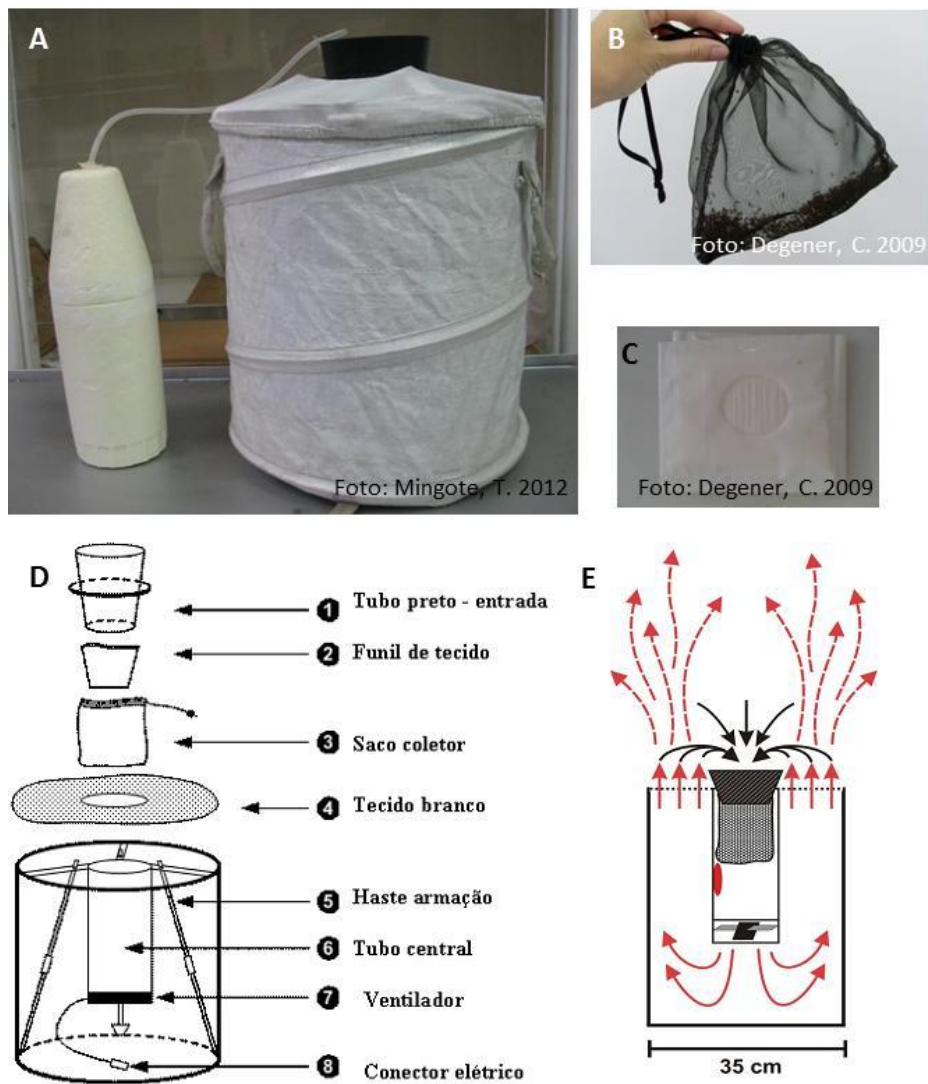


Figura 126- A. Armadilha BG-Sentinel® com liberador de gás carbônico; B. Saco coletor dos insetos; C. Atraente BG-Lure® D. Partes componentes da armadilha; E. Esquema de funcionamento da armadilha (Biogents 2006).

As coletas foram realizadas por quatro dias consecutivos, uma vez por mês por 12 meses (abril/2011 a maio/2012). Em dezembro/2011 e abril/2012 não houve coleta devido às intensas chuvas.

Todas as armadilhas foram instaladas no primeiro dia de coleta e do segundo ao quinto dias as mesmas foram vistoriadas, diariamente, na parte da manhã. Em cada vistoria os sacos coletores eram trocados, assim como as baterias e os liberadores de CO₂. Os sacos coletores com os mosquitos coletados eram encaminhados para o LabEQ, onde foram estocados em freezer -20 °C para posterior triagem, contagem e sexagem. Todos os culicídeos, exceto

espécimes de *A. albopictus* e *A. aegypti*, foram montados em alfinete e triângulo entomológicos e fixados com esmalte incolor para unhas. Os exemplares alfinetados foram identificados com auxílio de chaves dicotômicas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994, Forattini 2002) sob microscópio estereoscópico (40 x). Os exemplares identificados foram etiquetados e dispostos na coleção científica do LabEQ. O projeto possui licença de coleta de culicídeos para fins científicos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente – IBAMA (nº 27247-1/2011 SISBIO).

Aedes albopictus e *A. aegypti* foram identificados sem montagem em alfinete. As fêmeas tiveram os abdômens separados do restante do corpo, sob microscópio estereoscópico, sendo aqueles estocados em freezer – 20 °C para estudo da paridade. As cabeças e tórax de *A. albopictus* foram armazenados em freezer - 70 °C para realização da detecção viral por PCR. Todos os machos desta espécie também foram estocados em freezer -80°C para realização da PCR.

4.3 - Estudo da paridade

As fêmeas de *A. albopictus* e *A. aegypti* foram analisadas quanto a seu estado fisiológico (paridade) segundo Detinova (1962). Os abdômens congelados foram colocados em lâmina de vidro com pequena gota de água destilada. Após o descongelamento, a gota foi seca com papel absorvente. Com o auxílio de agulhas de seringa de insulina (1 mL), exerceu-se tração entre o 7º e 8º segmentos abdominais. À medida que as vísceras foram surgindo, ficaram aderidas à superfície seca da lâmina de vidro. Em seguida, adicionou-se outra gota de água destilada nas vísceras, que foram cobertas por lamínula de vidro. O material foi analisado em microscópio óptico (aumento 200x).

As fêmeas cujas extremidades das traqueólas presentes nos ovários estavam enoveladas foram consideradas fêmeas nulíparas, ou seja, que nunca ovipositaram. Já as fêmeas oníparas ou páridas, que já haviam realizado uma ou mais posturas, foram aquelas que possuíam as extremidades das traqueólas distendidas (Detinova 1962, Reiter & Nathan 2001) (Fig. 17). Algumas fêmeas não ovipõem todos os ovos desenvolvidos, permanecendo retidos nos ovários. Estas fêmeas foram classificadas como grávidas. Ainda, fêmeas cujos abdômens continham sangue foram qualificadas como “com sangue” e, nos casos em que não foi possível realizar a paridade, as fêmeas foram classificadas como “indeterminadas”.

4.4 - Detecção de *Dengue virus* em adultos de *Aedes*

Pools de *A. albopictus* (de um a cinco espécimes) foram separados por data de coleta e sexo, em tubos plásticos estéreis de 1,5 mL. Cada *pool* foi macerado com auxílio de micropistilo em 300 µL de meio TRIzol[®] (TRIzol[®] RNA isolation reagent, Life Technologies). A extração do RNA foi realizada de acordo com o fabricante e o RNA extraído das amostras foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop[®]) e congelado a -80°C.

Para produção de DNA complementar (cDNA) foram utilizados iniciadores randômicos (Random Iniciadores, Invitrogen[™]) (1 µL) em 5 µL de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato - inibidor de RNAase) e 2 µL do RNA extraído. O cDNA obtido foi mantido a -20°C.

Foi realizada PCR em tempo Real (qRT-PCR), com auxílio do Kit SYBR Green[®] (SYBR[®] Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), com protocolo executado de acordo com o fabricante. As amostras foram testadas em duplicada, em placas de 48 *wells*, sendo D1 e TS2/TS4 os iniciadores para amplificação dos sorotipos DENV-2/DENV-4 utilizados na mesma reação, e D1, TS1/TS3 para DENV-1/DENV-3 (Lanciotti et al. 1992). Os controles positivos foram vírus DENV-1 a 4 provenientes de cultura em células C6/36 do LabVírus e o controle negativo foi o mix SYBR Green[®] sem os iniciadores.

O produto da PCR foi analisado com auxílio do software OneStep[®] versão 2.2 (Applied Biosystems) e foram observadas as temperaturas de *melting* (T_M). A T_M é definida como a temperatura na qual metade dos fragmentos de DNA está na forma desnaturada, ou seja, não pareados, e a outra metade está pareada. Na qRT-PCR, a T_M é representada pela curva de *melting*. As amostras consideradas positivas foram aquelas que apresentam uma T_M com variação de ± 1 °C do controle positivo.

4.5 - Coleta, identificação e retirada de sangue dos pequenos mamíferos

Para a coleta dos pequenos mamíferos foram utilizados dois tipos de armadilhas: a Sherman[®] (H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL), de 8x9x22 cm; e o outro foi tipo gaiola Tomahawk[®] (Tomahawk Live Trap Co., Tomahawk, Wisconsin) de 48x15x15 cm

(Fig. 18). A armadilha Sherman possui um gatilho que é desarmado quando o animal pisa na porta, fechando o espécime em seu interior. Assim, ela só pode ser aberta pelo lado de fora. A gaiola é armada com uma das extremidades presa a um pequeno gancho, onde a isca é colocada. Quando o mamífero entra na armadilha e come a isca, a extremidade é desarmada, fechando o animal no interior da gaiola. As armadilhas Sherman's foram iscadas com pequenos pedaços de abacaxi e as gaiolas, além da fruta, receberam um chumaço de algodão embebido com solução de óleo de fígado de bacalhau (Emulsão Scott®)

As armadilhas foram instaladas nas mesmas trilhas e de forma simultânea às coletas dos mosquitos, com exceção da “Área da Escola” onde houve coleta somente de mosquitos. Foram utilizados 15 pontos demarcados em cada uma das trilhas, sendo instalada uma armadilha de cada modelo por ponto. As armadilhas foram instaladas no nível do solo ou em cipós e ramos de árvores, na altura entre 0,5 m e 1,5 m, sendo uma armadilha à esquerda e outra à direita da trilha, alternando-se as posições a cada mês.

No total, foram instaladas 30 armadilhas em cada uma das três trilhas, que permaneceram em campo por quatro noites consecutivas por mês, ao longo de 12 meses.

O esforço amostral foi calculado pelo produto do número de armadilhas instaladas pela quantidade de trilhas (30x3), e o número de noites que as mesmas ficaram em campo ao longo de dose meses (4x12), sendo o esforço esperado de 4320 armadilhas/noite. Já o sucesso de captura foi realizado pela divisão do total de capturas pelo esforço amostral vezes 100 (Fonseca 1989).

Os animais capturados foram transferidos para um saco de pano limpo, com dados da trilha e ponto de coleta, sendo conduzidos para o laboratório de Biologia da Fazendinha. Todos os animais foram pesados e a contenção química realizada por anestesia geral, com administração de solução de cetamina e xilazina (5 mg/Kg de Xilazina + 90 mg/Kg de Cetamina). Imediatamente os mamíferos foram medidos (comprimento: total, do corpo, cauda, tarso e orelha), sexados e identificados de acordo com chaves dicotômicas (Emmons & Feer 1997, Eisenberg & Redford 1999, OPAS/MS 2008). Após a medição foi coletado o sangue por meio de punção cardíaca, sendo armazenado em tubos estéreis de 1,5 mL não heparinizados, onde permaneceram para formação do coágulo e posterior centrifugação e alíquotagem do soro. Tanto a contenção química quanto a coleta de sangue foram executadas por médica veterinária devidamente treinada e autorizada. Após os procedimentos, os mamíferos receberam na orelha uma anilha de metal numerada, para realização do

monitoramento durante as demais coletas. Assim que o efeito da sedação passava, os animais eram soltos nos respectivos pontos de coleta.

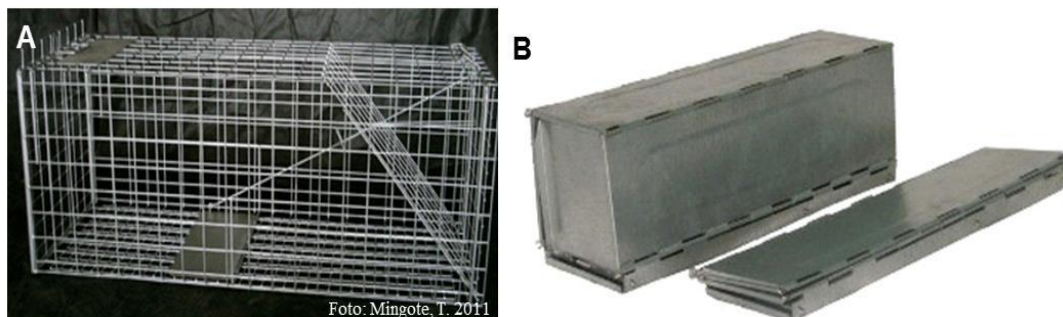


Figura 137- Armadilhas utilizadas para captura de mamíferos na Fazendinha, Sabará/MG. **A.** Gaiola; **B.** Sherman.

Durante todas as atividades de manipulação dos pequenos mamíferos foram tomadas as devidas precauções para evitar acidentes, que incluíram medidas de biossegurança nível três (CDC 1995). Na manipulação dos animais foi utilizado avental descartável, botas de borracha, luvas cirúrgicas, luvas de borracha e aparelhos para filtragem de ar em filtros "*High Efficiency Particulate Air*" (HEPA). Para manipulação de armadilhas no campo foram utilizadas luvas de borracha. Todos os instrumentos, armadilhas e área de processamento foram desinfetados após o processamento dos animais. Instrumentos e armadilhas foram limpos com solução de Lysol a 10 % e lavados com água corrente. Produtos descartáveis foram colocados em sacos de lixo autoclaváveis, lacrados e acondicionados apropriadamente até retorno à UFMG. Aparelhos de proteção respiratória e demais equipamentos também foram aspergidos e descontaminados com Lysol a 10%.

O projeto possui licença de coleta permanente de material zoológico para fins científicos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente – IBAMA (nº 2055205/2007 SISBIO).

4.6 - Testes sorológicos dos pequenos mamíferos

Soros provenientes das amostras de sangue coletadas dos pequenos mamíferos (Item 4.5) foram utilizados para detecção de anticorpos anti-DEN-V por ensaio de ELISA-IgG. Para isso, placas de 96 *wells* Nunc Maxisorp™ (Sigma-Aldrich®, USA) foram sensibilizadas com 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ de uma mistura contendo proteína E recombinante do envelope de dengue-vírus dos quatro sorotipos (50 ng do antígeno por *well* diluído em tampão carbonato a pH 9.8)

(Rocha et al 2012). Após uma incubação *overnight* a 4° C, as placas foram lavadas três vezes com 300 µL/*well* de tampão fosfato contendo PBS-T (Tween 20), bloqueadas com 1 % de gelatina (Sigma-Aldrich®, USA) em PBS-T a temperatura ambiente por 2 h.

O soro de cada mamífero foi diluído 1:100 em PBS-T com 0.1 % de gelatina e 100 µL de cada diluição foi aplicado em duplicada na placa e incubado em temperatura ambiente por 1 h. Após nova lavagem foi adicionado em cada *well* 100 µL do conjugado AG-HRP (Pierce Recombinant Protein A/G, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), diluído 1:10.000 em PBS-T com 0.1 % de gelatina. Após incubação por mais uma hora, as placas foram lavadas seis vezes, sendo adicionado o substrato di-hidroclorido-fenilenediamina e 0.03% de peróxido de hidrogênio. Decorridos 10 min de incubação, a reação foi interrompida por 40 µL/*well* de ácido sulfúrico (2M) e lido em leitor de placa em 492 nm. Os devidos controles, positivos e negativos, foram utilizados em cada corrida. O *cutoff* proposto foi obtido pela média de sete leituras negativas somadas a três desvios-padrão.

As amostras que foram ELISA-positivas passaram pelo teste de soroneutralização (PRTN) para se verificar a presença de anticorpos neutralizantes anti-dengue nos mamíferos (Pessanha et al. 2010). Os quatro sorotipos de DENV utilizados foram provenientes das culturas do LabVírus. O efeito citopático do vírus foi medido através da contagem do número de placas formadas, sendo o soro considerado neutralizante para determinado sorotipo quando foi capaz de neutralizar a formação de placas em mais de 50 % (PRTN > 50%) das duplicatas em relação aos controles.

4.7 - Detecção de dengue-vírus em pequenos mamíferos

As amostras ELISA e soroneutralização-positivas para dengue foram submetidas ao teste de PCR para confirmação. A extração do RNA e produção de cDNA foram obtidos com auxílio do kit QIAamp ®Viral RNA (Quiagen®), com utilização de iniciadores randômicos (Random Iniciadores, Invitrogen™), sendo o protocolo seguido de acordo com o fabricante.

A amplificação da região do genoma viral que corresponde à junção da proteína do capsídeo e do precursor da proteína de membrana (gene *C-prM*) foi realizada de acordo com Lanciotti et al (1992), com a primeira PCR utilizando os iniciadores D1 e D2 e tendo como produto um segmento de 511 pb. Em seguida, foi feita uma segunda reação de PCR “Nested” multiplex, utilizando o iniciador D1 (*foward*) e iniciadores mais internos (TS1, TS2, TS3 e TS4 - *reverses*) que amplificam regiões dentro da região do gene *C-prM* com tamanhos

diferentes, correspondendo aos quatro sorotipos descritos: 482 pb (DENV-1), 119 pb (DENV-2), 290 pb (DENV-3) e 392 pb (DENV-4). A PCR foi realizada tanto com o cDNA concentrado quanto diluído (1:20).

O produto de PCR foi fracionado em gel de poliacrilamida 8 %. Este foi preparado a partir de uma solução de Acrilamida (C_3H_5NO) 30%, persulfato de amônio (APS), catalisada por TEMED, tampão de TBE 10X (Tris base, ácido bórico e EDTA) e H_2O . O marcador molecular utilizado foi 1 Kb DNA Ladder (Promega, Corporation USA).

O fracionamento eletroforético foi feito no tampão de corrida TBE 10X a 100 V por 1 h. Em seguida, o gel foi fixado em solução I contendo 40% de metanol, 10% de ácido acético e 50% de H_2O , incubado por 30 min. Depois passado duas vezes por 15 min na solução fixadora II contendo 10% de metanol, 5% de ácido acético e 85% de H_2O . Na sequência foi lavado com água destilada e adicionado solução de prata 0.2 % e incubado por 20 min. O gel foi revelado em solução contendo carbonato de sódio (30 %) acrescido de 1 % de formaldeído.

4.8 - Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos utilizados neste estudo foram obtidos a partir do banco de dados do Centro de Pesquisas Tecnológicas do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE) com sensor localizado em latitude 19.877 e longitude 43.909

4.9 - Análises Estatísticas

Os dados das coletas dos mosquitos e mamíferos foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Lilliefors (K amostras).

Para comparar as coletas com e sem o gás carbônicos, foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney nas armadilhas para mosquitos.

Foram calculados o Índices de Diversidade de Shanon-Wiener ($H' = -\sum p_i \text{Log } p_i$, onde p_i = proporção da espécie em relação ao número total de espécimes coletados) e o Índice de Dominância de Berger-Parker ($D = N_{\max} / N_t$, onde N_{\max} é o número de indivíduos da espécie mais abundante e N_t é o número total de indivíduos da amostra). De forma geral, quanto maior o índice de diversidade, menor o índice de dominância.

Além do total de espécies capturadas em campo também foi estimada a riqueza, número que representa a quantidade de espécies que provavelmente ocorrem no local. As estimativas de riqueza foram calculadas utilizando-se os estimadores não-paramétricos: Chao 2, Jackknife 1, Jackknife 2 e Bootstrap, considerados ferramentas eficientes para estimar a riqueza de uma área. (Magurran 2004).

A riqueza estimada pelo Chao 2 é igual à riqueza observada somada ao quadrado do número de espécies representada por apenas um único indivíduo (*singletons*), dividido pelo dobro do número de espécies com apenas dois indivíduos (*doubletons*) em uma ou mais unidades amostrais.

Jackknife 1 e Jackknife 2 são métodos que estimam a riqueza total somando a riqueza observada (ou coletada) a um parâmetro calculado a partir do número de espécies raras e do número de amostras. A diferença entre as duas se dá pelo critério que cada uma delas considera uma espécie como rara, sendo que o Jackknife 1 considera somente o número de espécies que ocorrem em uma amostra (*uniques*) e o Jackknife 2 utiliza os “*uniques*” mas também o número de espécies que ocorrem em duas amostras (*duplicates*).

O Bootstrap utiliza dados de todas as espécies coletadas para estimar a riqueza total, não se restringindo às espécies raras. A estimativa é calculada somando-se a riqueza observada à soma do inverso da proporção de amostras em que ocorre cada espécie.

Para realizar a comparação entre as riquezas das áreas foi escolhido o estimador Jackknife 1, com intervalo de confiança de 95%.

Para comparar a abundância das espécies por local de coleta foi realizado GLM seguido por ANOVA. A comparação da composição de espécies de culicídeos entre os locais de coleta foi analisada com o auxílio de escalonamento não métrico multidimensional (NMDS) com índice de similaridade de Bray-Curtis; análise de similaridade (ANOSIM), e análise de porcentagem de similaridade (SIMPER). O NMDS faz uma representação gráfica dos dados, sendo quanto menor a distância entre os pontos no gráfico, maior a semelhança entre eles. É medido por um índice (*stress*) que quanto mais próximo de zero, melhor a representação dos dados (Clarke 1993). O ANOSIM mostra um valor estatístico R que pode variar entre -1 e 1. Quando mais próximo de -1 mais similaridade entre os locais e quanto mais próximo de 1, mais dissimilaridade, ou seja, mais diferentes são os locais de coleta uns dos outros (Clarke 1993, Melo & Hepp 2008). A análise com SIMPER permite verificar quanto cada espécie contribui, em porcentagem, para a similaridade/dissimilaridade entre os locais.

As médias de capturas foram correlacionadas com os dados meteorológicos (índice pluviométrico, temperaturas média, máxima e, umidade relativa do ar) de duas semanas antes da coleta, uma semana antes e na mesma semana da coleta, por meio da correlação de Spearman.

Para os dados de paridade de *A. albopictus* e *A. aegypti* foram calculadas as taxas de fêmeas oníparas (n. de fêmeas oníparas/oníparas + nulíparas) e fêmeas nulíparas (n. de fêmeas nulíparas/ n. de fêmeas dissecadas), além das porcentagens de todos os estados fisiológicos (oníparas, nulíparas, grávidas e com sangue) com relação ao total de fêmeas dissecadas por espécie. As proporções de fêmeas em cada um dos estados fisiológicos foram comparadas com auxílio do teste Exato de Fisher.

O nível de significância considerado para todos os testes foi $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas através dos programas BioEstat vs 5.0 (Ayres et al. 2005), EstimateS (Colwell 2006), PAST (Hammer et al. 2001) e R 2.12.2 (<http://cran.r-project.org>).

5 RESULTADOS

5.1 - Estrutura da comunidade de culicídeos e paridade:

Estrutura da comunidade. Foram coletados 3382 espécimes de culicídeos. Destes, 3221 (95 %) puderam ser identificados e classificados em dez gêneros e 26 espécies (Tab. I). Dos espécimes coletados, 3065 foram fêmeas (96 %) e 156 machos (4,0 %). Todas as análises foram realizadas somando-se machos e fêmeas da mesma espécie.

Ressalta-se que na 10^a. coleta (fevereiro/2012) todas as três armadilhas instaladas na Trilha 1 foram roubadas sendo, a partir desta data, realizado armadilhamento somente nas Trilhas 2 e 3 e na área da Escola. Portanto, justifica-se o menor número de armadilhas/noite (N=101) encontrado para o local (Tab. I).

A partir da terceira coleta (junho/2011) iniciou-se a utilização de CO₂ para se tentar aumentar o número de espécimes capturados, uma vez que o total de culicídeos das duas primeiras coletas foi baixo em todos os locais. A adição de CO₂ às armadilhas aumentou o número de culicídeos capturados, quando comparado aos das coletas realizadas com e sem a utilização do atrativo. Este aumento das capturas foi verificado tanto para *A. albopictus* (Fig. 18) quanto para *C. quinquefasciatus*, assim como para outros culicídeos considerados em conjunto (Fig. 19).

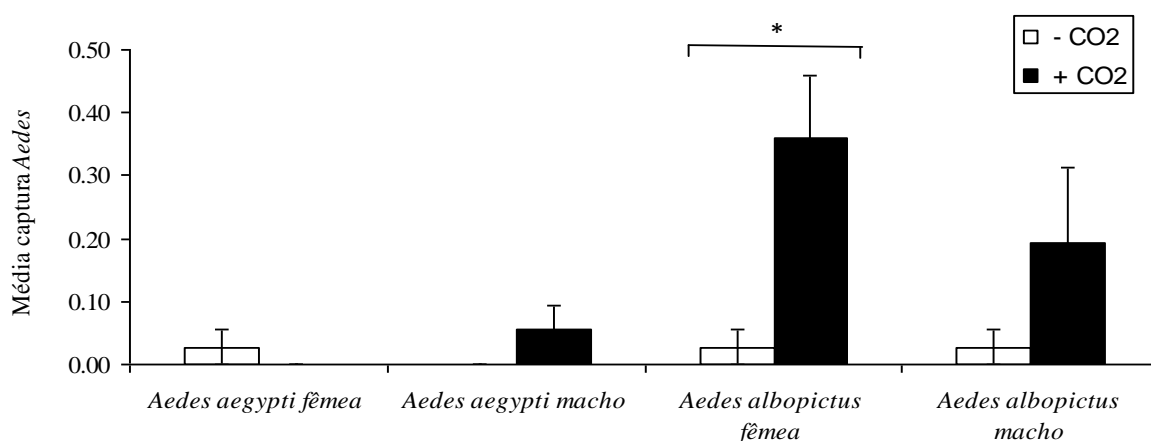


Figura 148- *Aedes* (média± erro-padrão) capturados em armadilha BG-Sentinel® iscada com e sem gelo seco. Fazendinha Sabará/MG. Asterisco (*) indica diferença significativa (Mann-Whitney, p=0,02) (n=36).

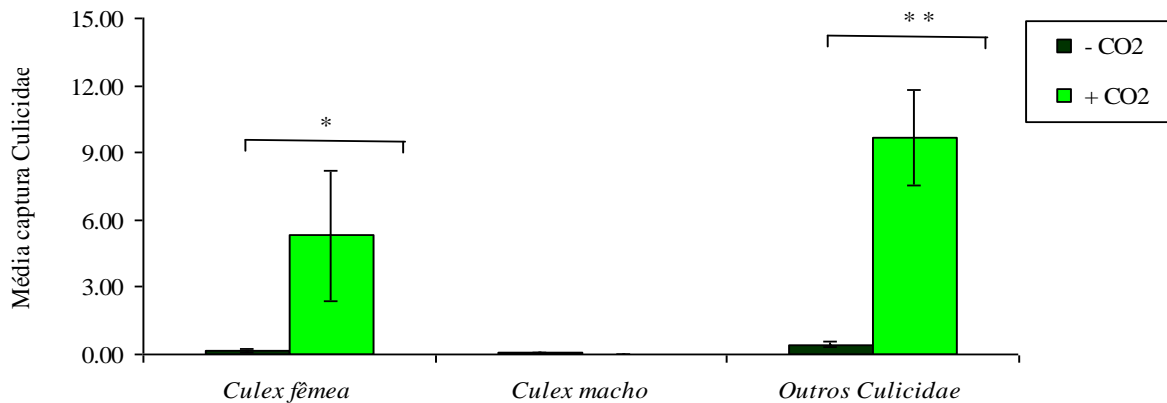


Figura 19- Culicídeos (média± erro-padrão) capturados em armadilha BG-Sentinel® iscadas com e sem gelo seco. Fazendinha Sabará/MG. Asteriscos: (*) indica diferença significativa entre fêmeas de *Culex quinquefasciatus* (Mann-Whitney, $p = 0,05$). (**) indica diferença significativa entre outros culicídeos em conjunto (Mann-Whitney, $p < 0.001$) ($n=36$).

No mês de setembro/2011 (6ª. coleta) houve um incêndio que atingiu os últimos cinco pontos da Trilha 3 porém, no mês seguinte, novas queimadas ocorreram, desta vez atingindo as três trilhas, sendo as Trilhas 1 e 3 atingidas em sua totalidade e a Trilha 2 do 2º ao 9º pontos (Fig. 20).

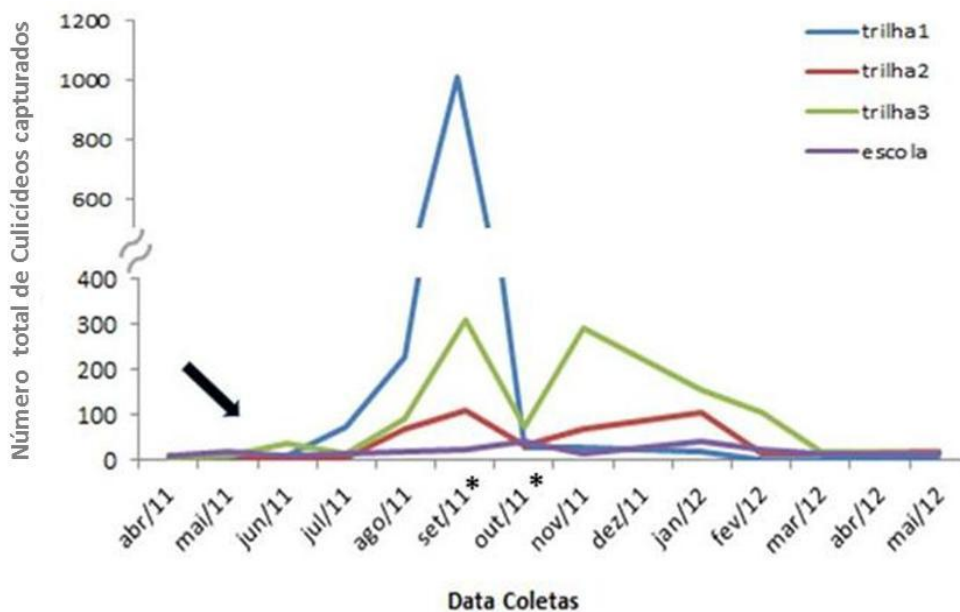


Figura 150- Total de espécimes de culicídeos por data de coleta. Fazendinha, Sabará/MG. (abril/2011-maio/2012). Seta indica o início do uso de CO₂ nas coletas. Asteriscos indicam data das queimadas.

Tabela I- Abundância total (n) e relativa (%), riqueza de espécies de Culicidae (Diptera) e Índices de Diversidade Shanon-Wiener (H') e Berger-Parker (d) por local de coleta. Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. Número de armadilhas/noite: Trilha 1 (N=101); Trilha 2 (N=132); Trilha 3 (N=138); Escola (N=252); Total (N=623).

Espécies	Trilha 1		Trilha 2		Trilha 3		Escola		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Aedes (Ochlerotatus) fluviatilis</i> (Lutz, 1904)			1	0.22	1	0.09	5	2.05	7	0.22
<i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> (Rondani, 1848)			2	0.44					2	0.06
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus 1762)	3	0.21	17	3.73	6	0.54	37	15.16	63	1.96
<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse 1895)	11	0.78	138	30.26	213	19.15	51	20.90	413	12.82
<i>Anopheles (Anopheles) punctimacula</i> Dyar & Knab, 1906			1	0.22					1	0.03
<i>Anopheles (N.) sp.</i>	9	0.64	4	0.88	2	0.18			15	0.47
<i>Anopheles (Nyssorhynchus) argyritarsis</i> Robineau-Desvoidy, 1827	2	0.14	1	0.22	4	0.36			7	0.22
<i>Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi</i> Root 1926	7	0.50	2	0.44	5	0.45	1	0.41	15	0.47
<i>Chagasia fajardi</i> (Lutz, 1904)	10	0.71	32	7.02	63	5.67	1	0.41	106	3.29
<i>Culex (Culex) declarator</i> Dyar & Knab, 1906	5	0.35							5	0.16
<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> Say, 1823	1347	95.60	28	6.14	281	25.27	142	58.20	1798	55.82
<i>Culex (Culex) sp.</i>	7	0.50	1	0.22	6	0.54	2	0.82	16	0.50
<i>Culex (Melanoconion) Seção melanoconion sp.</i>					2	0.18			2	0.06
<i>Culex (Melanoconion) sp.</i>	1	0.07	4	0.88	3	0.27	1	0.41	9	0.28
<i>Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus</i> (Dyar & Shannon,			36	7.89	133	11.96	1	0.41	170	5.28
<i>Haemagogus (Conopostegus) sp.</i>			1	0.22	2	0.18			3	0.09
<i>Limatus durhamii</i> Theobald 1901	2	0.14	178	39.04	343	30.85	1	0.41	524	16.27
<i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> (von Humboldt, 1819)			1	0.22					1	0.03
<i>Psorophora (Psorophora) cilipes</i> (Fabricius, 1805)					1	0.09			1	0.03
<i>Sabethes (Davismyia) petrochiae</i> (Shannon & del Ponte, 1928)			1	0.22					1	0.03
<i>Sabethes (Sabethes) purpureus</i> (Theobald, 1901)	3	0.21	2	0.44	6	0.54			11	0.34
<i>Sabethes (Sabethinus) idiogenes</i> Harbach, 1994	1	0.07			1	0.09			2	0.06
<i>Sabethes (Sabethoides) chloropterus</i> (von Humboldt, 1819)					1	0.09			1	0.03
<i>Sabethes (Sabethoides) tridentatus</i> Cerqueira, 1961			1	0.22	36	3.24			37	1.15
<i>Toxorhynchites theobaldi</i> (Dyar & Knab, 1906)			4	0.88	3	0.27			7	0.22
<i>Uranotaenia (Uranotaenia) geometrica</i> Theobald, 1901	1	0.07	1	0.22			2	0.82	4	0.12
Abundância Total	1409		456		1112		244		3221	
Riqueza Total	14		21		20		11		26	
Índice de Diversidade Shanon-Wiener (H')	0.28		1.73		1.77		1.20			

OBS: Porcentagem total = Índice de Dominância Berger-Parker (d)

As maiores abundâncias foram observadas na Trilha 1 e 3, com 1409 (44%) e 1112 (35%) dos culicídeos capturados, respectivamente. Na Trilha 2 foram coletados 456 (14%) e Área da Escola, local que apresentou menor abundância, 244 (7%) indivíduos foram coletados (Tab. I).

Dentre os locais de coleta, foi encontrada diferença significativa entre as abundâncias da Trilha 2 e da Escola (GLM, ANOVA, $p < 0.0001$) e entre as Trilhas 2 e 3 (GLM, ANOVA, $p = 0.0002$) (Fig. 21).

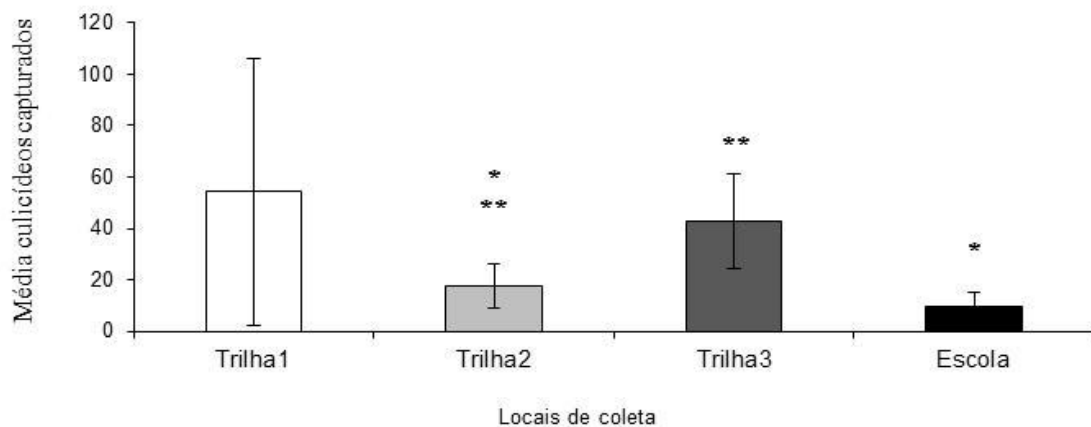


Figura 161- Abundância de culicídeos (média \pm SE) por local de coleta. Fazendinha, Sabará/MG. (abril/2011-maio/2012). Um asterisco (*): diferença significativa entre Escola e Trilha 2; Dois asteriscos (**): diferença significativa entre Trilha 2 e Trilha 3 (GLM, ANOVA, $p < 0,05$).

A análise NMDS demonstrou que houve uma maior proximidade entre os pontos pertencentes a um mesmo local de coleta, evidenciando um perfil semelhante de espécies para cada área. Também pode-se observar o distanciamento entre os pontos das diferentes áreas, o que mostra dissimilaridade quanto ao perfil de espécies entre os locais de coleta (ANOSIM, $R=0.81$, $p < 0.0001$) (Fig.22). De forma interessante, a menor média de dissimilaridade foi encontrada entre as Trilhas 2 e 3 (49.6 %) e a maior entre as Trilhas 1 e 2 (93.3 %) (Tab. II).

Tabela II- Porcentagem de dissimilaridade (SIMPER) entre as áreas de coleta e espécies que mais contribuíram para a diferença, Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. **Valores em negrito:** porcentagem entre as áreas. Demais valores: contribuição (%) de cada espécie para a dissimilaridade entre os pares de locais.

Trilha 1 e Trilha 2 (93.3 %)		Trilha 1 e Trilha 3 (74.6 %)		Trilha 1 e Escola (89.2 %)	
Espécie	%	Espécie	%	Espécie	%
C.quinq	71.2	C.quinq	42.5	C.quinq	83.7
L.durh	9.3	L.durh	13.3	A.albo	1.3
A.albo	6.4	A.albo	8.0	A.aeg	1.0
H.leuc	2.0	H.leuc	5.3	C.faja	0.6
C.faja	1.2	C.faja	2.2	A.Niss	0.6
A.aeg	0.7	S.tri	1.4	C.culex	0.4
Trilha 2 e Trilha 3 (49.6 %)		Trilha 2 e Escola (80.0 %)		Trilha 2 e Escola (83.4 %)	
Espécie	%	Espécie	%	Espécie	%
C.quinq	16.3	L.durh	31.8	L.durh	31.8
L.durh	10.8	A.albo	18.5	A.albo	18.5
A.albo	7.5	C.quinq	9.1	C.quinq	9.1
H.leuc	6.3	H.leuc	7.2	H.leuc	7.2
C.faja	3.0	C.faja	5.6	C.faja	5.6
S.tri	2.1	A.aeg	2.2	A.aeg	2.2

OBS: C.quinq: *Culex quinquefasciatis* ; L.durh: *Limatus durhamii* ; A.albo: *Aedes albopictus*
H.leuco: *Haemagogus leucocelaenus* ; C.faja: *Chagasia fajardi* ; A.aeg: *Aedes aegypti* ;
S.tri: *Sabethes tridentatus* ; A.Niss: *Anopheles (Nyssshorynchus)* sp.; C.culex: *Culex (Culex)* sp.

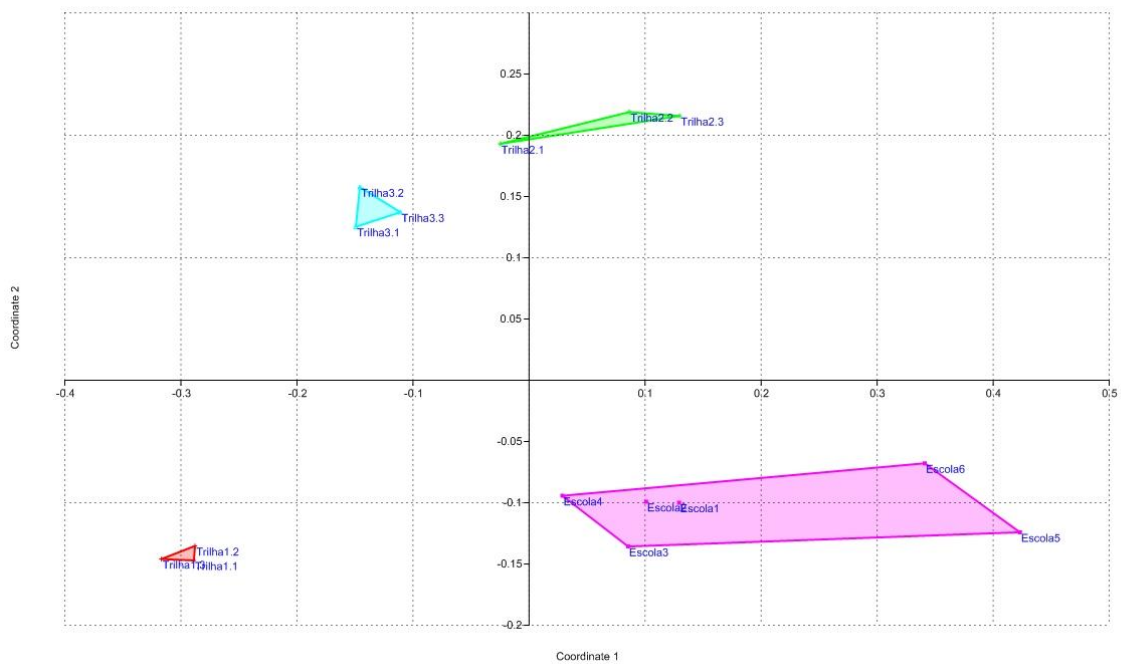


Figura 172- Distribuição das espécies por locais de coleta pela análise de escalonamento não métrico multidimensional (NMS). Em sentido horário: primeiro quadrante à esquerda: Trilha 3; segundo quadrante: Trilha 2; terceiro quadrante: escola; quarto quadrante: Trilha 1.

Em todos os locais de coleta o Bootstrap foi o estimador mais próximo da riqueza observada e o Jackknife 2 foi o que apresentou os maiores valores. Tanto O Chao 2 quanto o Jackknife 1 foram estimadores que demonstraram valores intermediários de riqueza esperada (Fig. 23). As curvas de acumulação de espécies construídas para avaliar a cobertura do esforço amostral não alcançaram a assíntota, ou seja, mesmo com o grande esforço amostral supõe-se que a diversidade local não tenha sido devidamente amostrada.

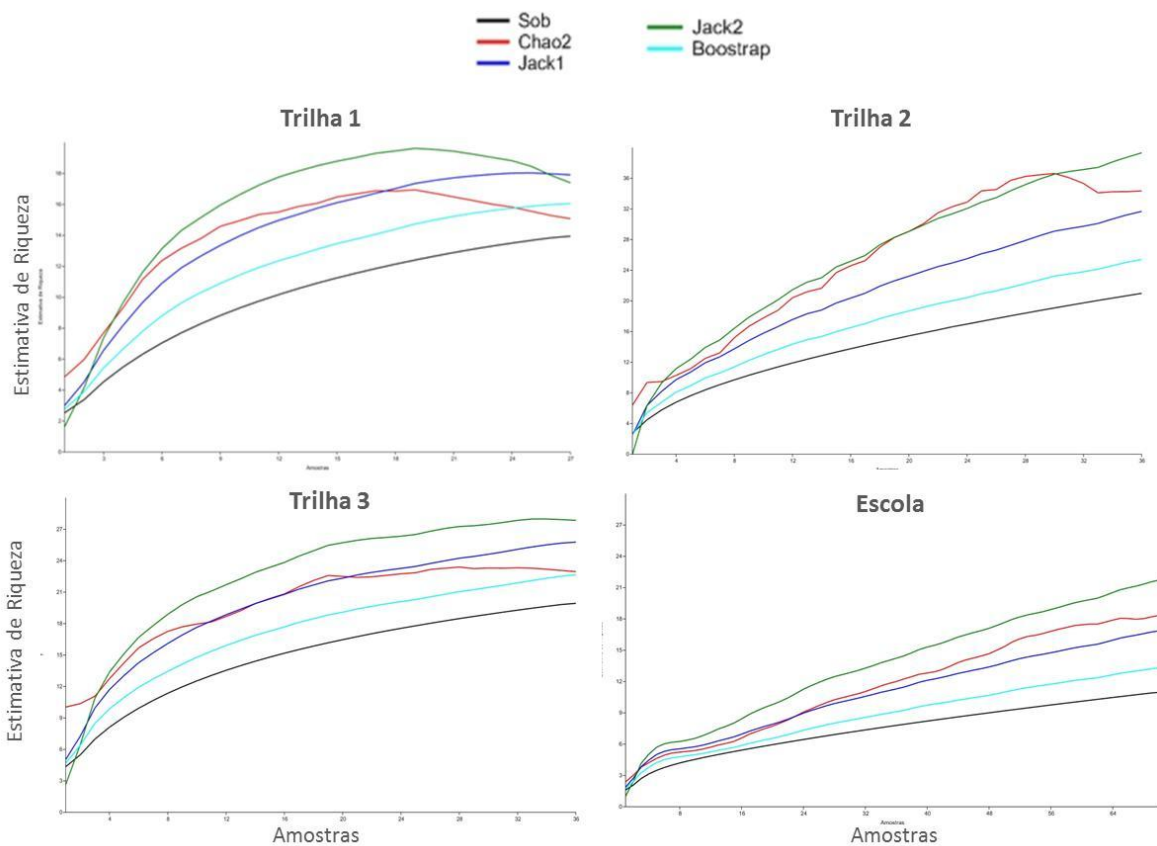


Figura 183- Curva de acumulação de espécies de culicídeos para cada uma das áreas de coleta, Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 – Maio/2011 baseada nos índices não-paramétricos utilizados. Sob: riqueza observada; Chao2, Jack1, Jack2 e Bootstrap: estimadores de riqueza.

A Trilha 1 e Área da Escola apresentaram riqueza de espécies semelhante, com os intervalos de confiança (95 %) do estimador Jackknife 1 sobrepostos. Nas demais áreas houve diferença entre as riquezas estimadas. (Fig. 24)

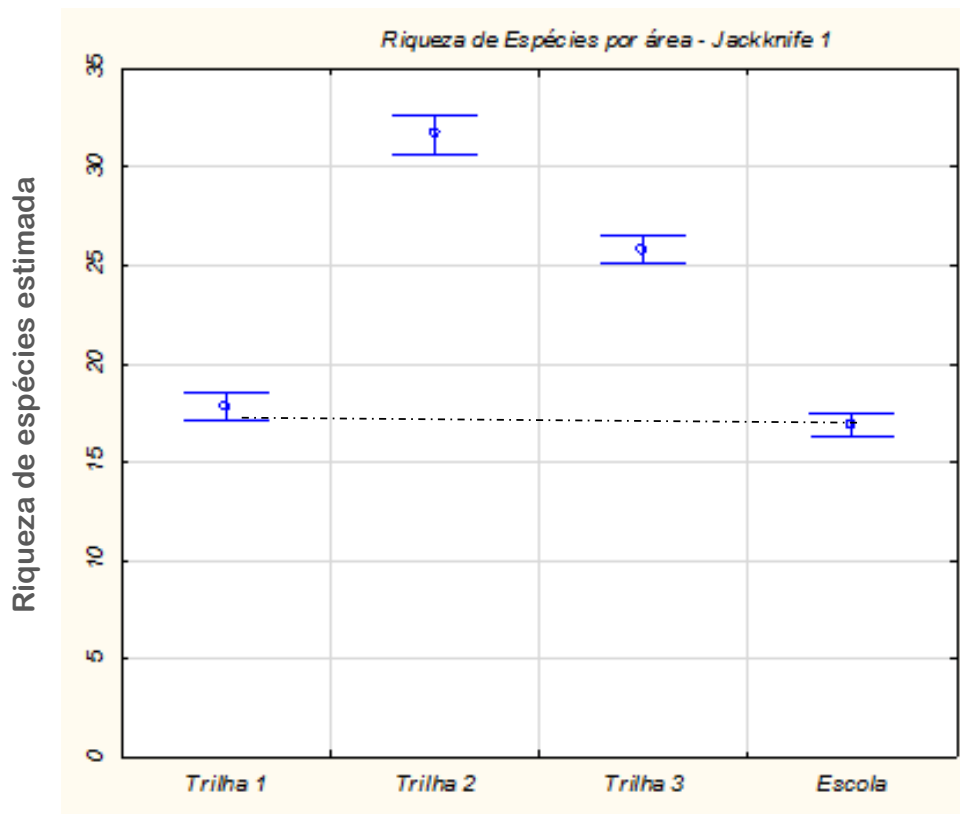


Figura 194- Comparação entre as estimativas de riqueza geradas com o estimador Jackknife 1 entre as áreas de coleta. Intervalo de confiança (IC=95 %) é mostrado pelas barras. Linha pontilhada indica a sobreposição dos IC's da Trilha 1 e Escola.

O maior índice de diversidade de espécies de culicídeos foi verificado na Trilha 3 [Shanon-Wiener (H') = 1.7750] com a presença de 20 das 26 espécies identificadas, seguido pela Trilha 2 (H') = 1.7267 com 21 espécies. Apesar de terem sido coletadas somente 11 espécies na Escola, o índice de diversidade (H' = 1.1993) foi maior do que o da Trilha 1 (H' = 0.2813), onde 14 espécies foram coletadas (Tab. I).

Considerando o número total de culicídeos capturados, *Culex quinquefasciatus* foi a espécie dominante [Berger-Parker (d) = 0.5582], seguida por *Limatus durhamii* (d = 0.1627) *A. albopictus* (d = 0.1282), *Haemagogus leucocelaenus* (d = 0.0528), *Chagasia fajardi* (d = 0.0329) e *A. aegypti* (d = 0.0196) (Tab. I).

Oito (31 %) das 26 espécies foram encontradas nos quatro locais de coleta, sendo cinco delas pertencentes ao grupo das mais abundantes; seis (23 %) estavam presentes em três locais, quatro (15 %) em duas áreas e oito (31 %) foram encontradas somente em um dos locais de coleta (Tab. I). A espécie *C. declarator* foi coletada exclusivamente na Trilha 1. Na

Trilha 2 quatro espécies foram exclusivas e, na Trilha 3, outras três espécies. Na área da Escola não houve coleta exclusiva de nenhuma espécie.

Tanto *A. aegypti* quanto *A. albopictus* foram encontrados em todos os locais de coleta, mostrando sua dispersão pela área experimental. A predominância de *A. albopictus* na área de Mata (Trilhas 2 e 3) pode indicar que mesmo tendo mobilidade entre diversos habitats, a espécie tenha preferência por locais menos urbanizados e maior presença de vegetação.

Fatores abióticos: A espécie *C. quinquefasciatus* teve correlação negativa significativa somente com a temperatura mínima de duas semanas anteriores às coletas [Spearman (r_s) = -0.63, $p < 0.03$]. *Aedes albopictus* foi capturado em todos os meses de coleta e apresentou as maiores correlações com os índices pluviométricos de duas semanas antes das coletas ($r_s = 0.74$, $p < 0.006$) e da semana de coleta ($r_s = 0.80$, $p < 0.002$). Correlações significativas também foram encontradas com a temperatura média na semana de coleta ($r_s = 0.61$, $p < 0.03$), temperatura mínima na mesma semana ($r_s = 0.58$, $p < 0.04$) e URA de duas semanas anteriores às coletas de *A. albopictus* ($r_s = 0.76$, $p < 0.003$) (Tab. III).

Para *H. leucocelaenus* a correlação significativa foi observada para o índice pluviométrico e URA de duas semanas anteriores às coletas ($r_s = 0.58$, $p < 0.04$; $r_s = 0.78$, $p < 0.0029$) (Tab. III).

Chagasia fajardi apresentou correlação significativamente negativa quanto ao índice pluviométrico de duas semanas anteriores às coletas ($r_s = -0.88$, $p < 0.0001$) e também na semana da coleta ($r_s = -0.65$, $p < 0.02$). Também foi negativa a correlação entre temperatura média na semana de coleta ($r_s = -0.61$, $p < 0.03$), temperatura mínima e URA de duas semanas anteriores às coletas ($r_s = -0.78$, $p < 0.0023$; $r_s = -0.61$, $p < 0.03$, respectivamente). *Aedes aegypti* teve correlação significativa com o índice pluviométrico de duas semanas anteriores às coletas ($r_s = 0.69$, $p < 0.0127$) e na semana de coleta ($r_s = 0.76$, $p < 0.0045$). Todas as temperaturas na semana da coleta tiveram correlação com as capturas de *A. aegypti*. As espécies *Anopheles darlingi*, *L. durhamii* e as demais encontradas no presente trabalho não apresentaram correlação significativa com nenhum dos dados meteorológicos (Tab. III).

Tabela III- Coeficientes de Correlação (r_s) das espécies de culicídeos Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011-Maio/2012. Pluvio = Índice Pluviométrico; Temp Média = Temperatura Média; Temp Máxima = Temperatura Máxima; Temp Mínima = Temperatura Mínima; URA = Umidade Relativa do Ar; 2 sem= duas semanas antes das coletas; 1 sem= uma semana antes das coletas; sem= semana das coletas.

Espécies	Pluvio			Temp Média			Temp Máxima			Temp Mínima			URA			
	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem	
<i>Aedes aegypti</i>	(r_s)	0.69	0.26	0.76	0.30	0.62	0.68	0.06	0.42	0.60	0.30	0.62	0.68	0.37	0.16	0.44
	(p)	0.013	0.417	0.005	0.348	0.032	0.014	0.844	0.173	0.040	0.348	0.032	0.014	0.234	0.621	0.157
<i>Aedes albopictus</i>	(r_s)	0.74	0.46	0.80	0.10	0.18	0.62	-0.27	0.00	0.51	0.48	0.41	0.59	0.77	0.37	0.17
	(p)	0.006	0.137	0.002	0.762	0.572	0.033	0.404	ns	0.090	0.118	0.183	0.045	0.003	0.236	0.602
<i>Anopheles darlingi</i>	(r_s)	-0.31	-0.39	-0.04	-0.23	0.35	-0.10	0.12	0.41	0.00	-0.23	0.35	-0.10	0.02	-0.33	-0.10
	(p)	0.320	0.204	0.895	0.480	0.263	0.754	0.717	0.191	ns	0.480	0.263	0.754	0.943	0.299	0.754
<i>Chagasia fajardi</i>	(r_s)	-0.89	-0.65	-0.66	-0.52	-0.15	-0.61	0.03	0.04	-0.51	-0.79	-0.47	-0.61	-0.62	-0.51	-0.28
	(p)	0.000	0.023	0.020	0.086	0.636	0.034	0.923	0.895	0.092	0.002	0.121	0.037	0.032	0.092	0.376
<i>Culex quinquefasciatus</i>	(r_s)	-0.57	-0.35	-0.22	-0.49	-0.02	-0.25	0.00	0.16	-0.21	-0.63	-0.34	-0.27	-0.36	-0.39	-0.32
	(p)	0.053	0.269	0.498	0.106	0.948	0.430	ns	0.618	0.513	0.028	0.286	0.404	0.245	0.208	0.308
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	(r_s)	0.58	0.33	0.32	-0.07	-0.03	0.42	-0.40	-0.12	0.37	-0.07	-0.03	0.42	0.78	-0.02	-0.23
	(p)	0.047	0.296	0.309	0.837	0.918	0.174	0.193	0.718	0.230	0.837	0.918	0.174	0.003	0.959	0.474
<i>Limatus durhamii</i>	(r_s)	-0.10	-0.41	-0.15	-0.02	-0.03	0.18	0.20	0.01	0.21	-0.02	-0.03	0.18	-0.01	-0.46	-0.55
	(p)	0.768	0.185	0.640	0.948	0.923	0.586	0.527	0.966	0.505	0.948	0.923	0.586	0.983	0.133	0.064

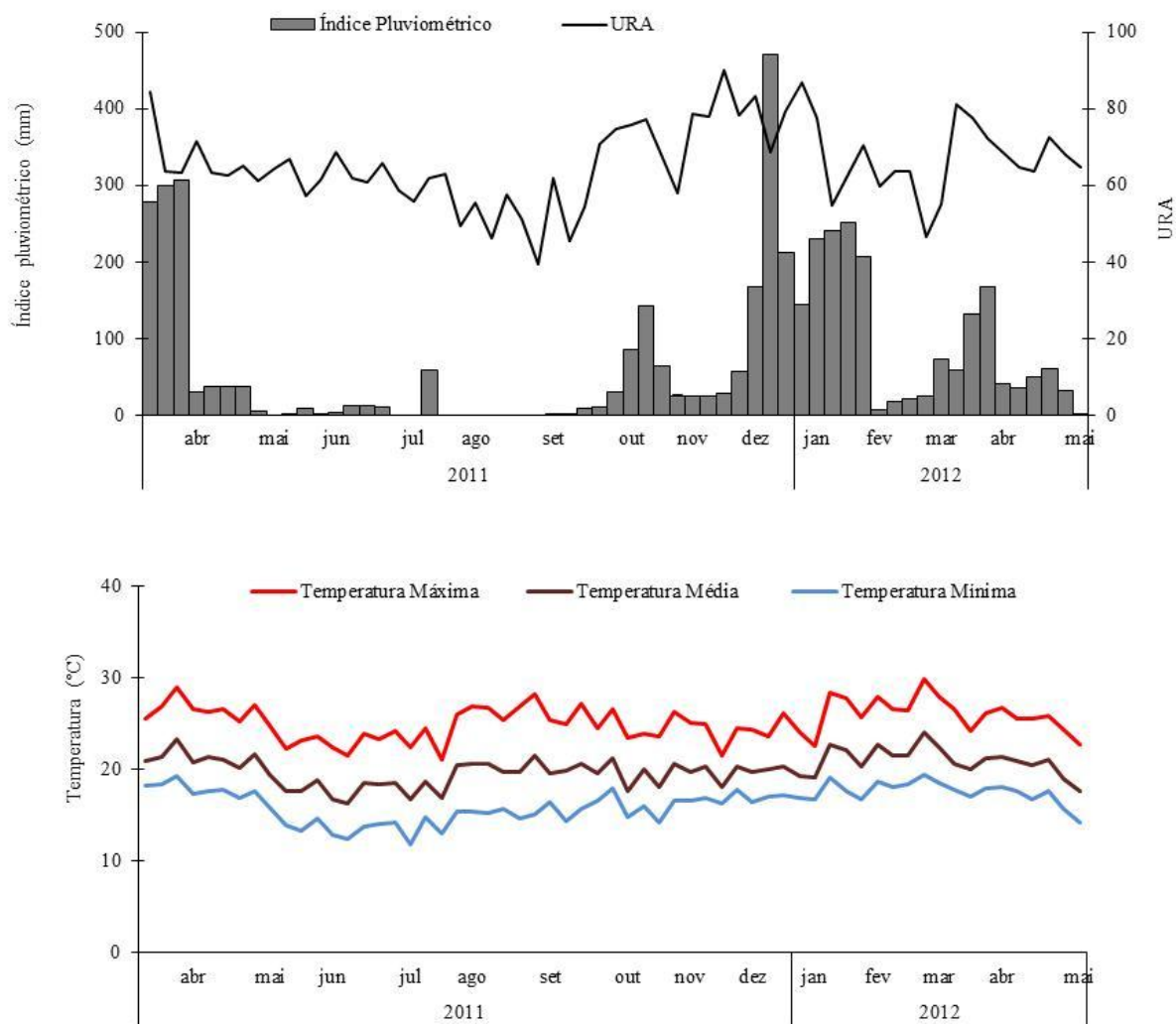


Figura 205- Dados abióticos do período de coletas (abril/2011 a maio/2012). **A.** Índices pluviométricos e Umidade Relativa do Ar (URA); **B.** Temperaturas Máxima, Média e Mínima. Fonte: CPTEC/INPE.

Paridade: A análise da paridade foi realizada em 355 (92%) das 395 fêmeas de *A. albopictus* e *A. aegypti* capturadas, pois alguns espécimes estavam danificados impossibilitando assim a visualização de suas estruturas internas. Deste total analisado, 305 (86%) eram *A. albopictus*, e 50 (14%) *A. aegypti*.

Para *A. albopictus* 47% foram classificadas como oníparas, 23 % como nulíparas, 18 % como grávidas, 2% com sangue e 10 % foram indeterminadas. A maioria das fêmeas de *A. aegypti* estava grávida (50%), 34% foram nulíparas; oníparas e indeterminadas totalizaram 8% cada. Nenhuma fêmea desta espécie continha sangue no abdômen (Tab. IV). As taxas de

paridade (onípara/onípara + nulípara) para *A. albopictus* foram de 67 % e para *A. aegypti* foram 81 %, com diferença significativa entre a proporção de oníparas e nulíparas (Exato de Fisher, $p = 0.01$).

O estado fisiológico das fêmeas de *A. albopictus* foi semelhante entre os locais de coleta com relação à maior proporção de oníparas em detrimento das nulíparas. A maior porcentagem de grávidas foi encontrada na Escola e somente nas Trilhas 2 e 3 foram observadas fêmeas com sangue. Para *A. albopictus* e *A. aegypti* observou-se uma maior proporção de oníparas nas trilhas e a maior porcentagem de fêmeas grávidas na área da Escola (Tab. IV).

Tabela IV- Estado fisiológico (%) de fêmeas de *Aedes* por local de coleta, Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 a maio/2012.

	Estado Fisiológico Fêmeas <i>Aedes</i> (%)					Total
	Nulípara	Onípara	Grávida	Sangue	Indeterminada	
<i>Aedes albopictus</i>						
Trilha 1	0.33	1.64	0.33		0.66	2.95
Trilha 2	6.89	17.05	3.28	0.66	3.93	31.80
Trilha 3	15.41	24.59	3.28	0.98	5.25	49.51
Escola	0.66	3.93	10.82		0.33	15.74
Total	23.28	47.21	17.70	1.64	10.16	100.00
<i>Aedes aegypti</i>						
Trilha 1	2.00	2.00				4.00
Trilha 2	2.00	16.00	6.00		6.00	30.00
Trilha 3	2.00	8.00	2.00			12.00
Escola	2.00	8.00	42.00		2.00	54.00
Total	8.00	34.00	50.00	0.00	8.00	100.00

Ao longo das coletas percebeu-se um perfil semelhante dos estados fisiológicos para cada espécie estudada. *Aedes albopictus* manteve a predominância de fêmeas nulíparas em quase todos os meses, com exceção de maio de 2011, quando as fêmeas grávidas foram observadas em maior quantidade e em janeiro de 2012, com a predominância de fêmeas nulíparas. Para *A. aegypti* as fêmeas grávidas foram predominantes, com exceção dos meses de abril e outubro de 2011, quando as fêmeas nulíparas estavam ligeiramente em maior quantidade (Fig. 26).

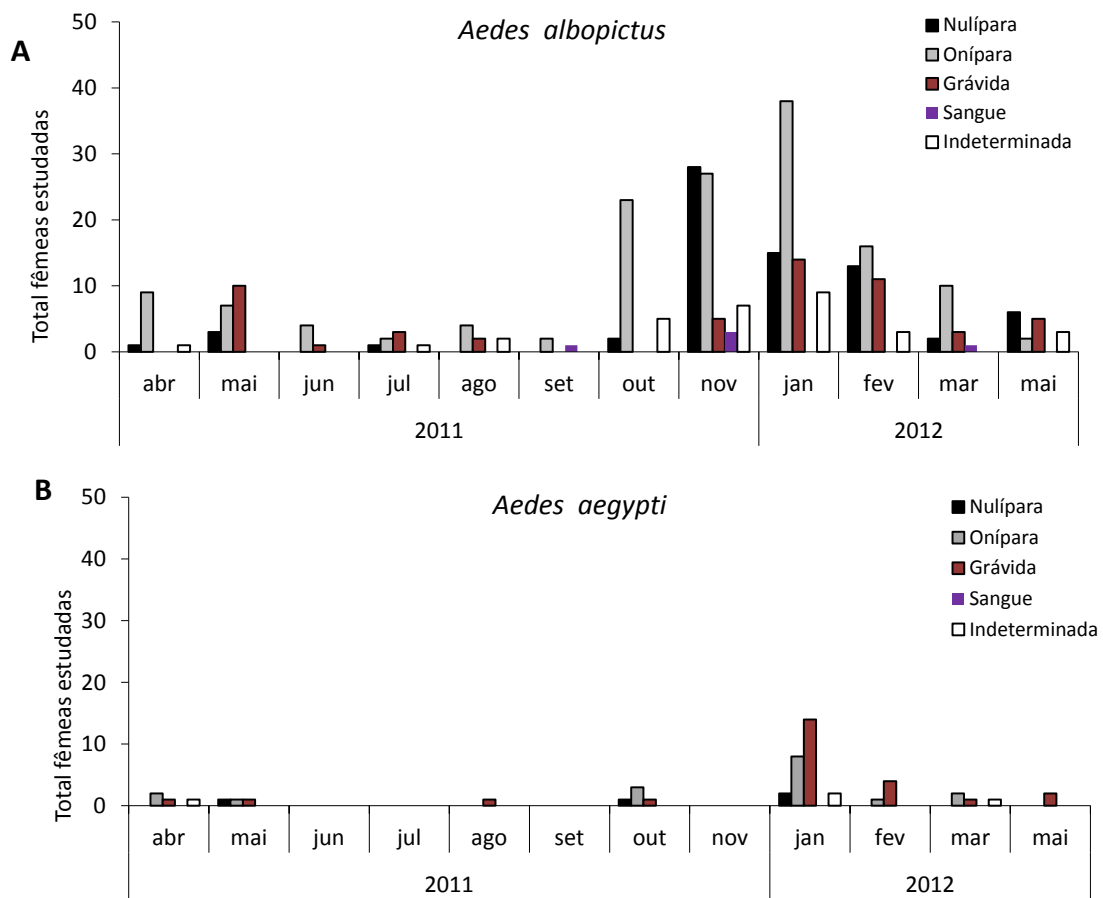


Figura 26- Estado fisiológico de fêmeas de *Aedes* por mês de coleta, Unidade Fazendinha, Sabará/MH. Abril/2011 a maio/2012. **A.** *Aedes albopictus*; **B.** *Aedes aegypti*.

5.2 - Estrutura da comunidade de pequenos mamíferos:

Estrutura da comunidade: Foram registradas oito espécies de pequenos mamíferos terrestres, distribuídos em três ordens, quatro famílias e oito gêneros (Tab. V e Fig. 27). Durante os doze meses de coleta obteve-se um esforço amostral de 3715 armadilhas/noite que resultou em 176 capturas de 111 indivíduos, correspondendo a um sucesso de captura de 4.73 % (Tab. V).

Ressalta-se que na 10^a. coleta (fevereiro/2012) todas as armadilhas instaladas na Trilha 1 foram roubadas sendo, a partir desta data, realizado armadilhamento e coletas somente nas Trilhas 2 e 3. Portanto, justifica-se o menor esforço amostral (EA) encontrado para o local (Tab. V).

Não houve diferença entre as abundâncias dos pequenos mamíferos nas três Trilhas amostradas (GLM, ANOVA, $p > 0.05$).

Nas Trilhas 1 e 2 o Chao 2 foi o estimador mais próximo da riqueza observada e o Jackknife 1 foi o que apresentou os maiores valores. Na Trilha 3 o Bootstrap foi o estimador mais próximo da riqueza observada. O Jackknife 1 foi o estimador que demonstrou valores intermediários de riqueza esperada nas três áreas (Fig. 27). As curvas de acumulação de espécies construídas para avaliar a cobertura do esforço amostral alcançaram a assíntota, nas Trilhas 1 e 2, indicando que houve boa amostragem da diversidade local, o que não ocorreu na Trilha 3.

Tabela V- Abundância total, absoluta (n) e relativa (%), Esforço Amostral (EA), Sucesso de Captura (SC) e Índices de Diversidade Shanon-Wiener (H') e de Dominância Berger-Parker (d) de pequenos mamíferos por local de coleta, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012.

Espécies	Nome popular	Trilha 1		Trilha 2		Trilha 3		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%
- Ordem Rodentia									
Família Cricetidae	<i>Akodon cursor</i> (Winge, 1887)					1	4.17	1	0.90
	<i>Cerradomys subflavus</i> (Wagner, 1842)	11	21.57					11	9.91
	<i>Necomys lasiurus</i> (Lund, 1840)	31	60.78					31	27.93
	<i>Oligoryzomys</i> Bang, 1900 sp.			1	2.78	3	12.50	4	3.60
Família Sciuridae	<i>Guerlinguetus ingrami</i> Thomas 1901					1	4.17	1	0.90
- Ordem Didelphimorphia									
Família Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i> Lund, 1840	8	15.69	28	77.78	17	70.83	53	47.75
	<i>Gracilinanus microtarsus</i> (Wagner, 1842)			7	19.44	2	8.33	9	8.11
- Ordem Lagomorpha									
Família Laporidae	<i>Sylvilagus brasiliensis</i> (Linnaeus, 1758)	1	1.96					1	0.90
Abundância Total		51		36		24		111	
Riqueza total		4		3		5		8	
Índice de Diversidade Shanon-Wiener (H')		0.92		0.51		0.80			
EA		1075		1320		1320		3715	
SC		4.74%		2.72%		1.80%		4.70%	

OBS: Porcentagem total = Índice de Dominância Berger-Parker (d)

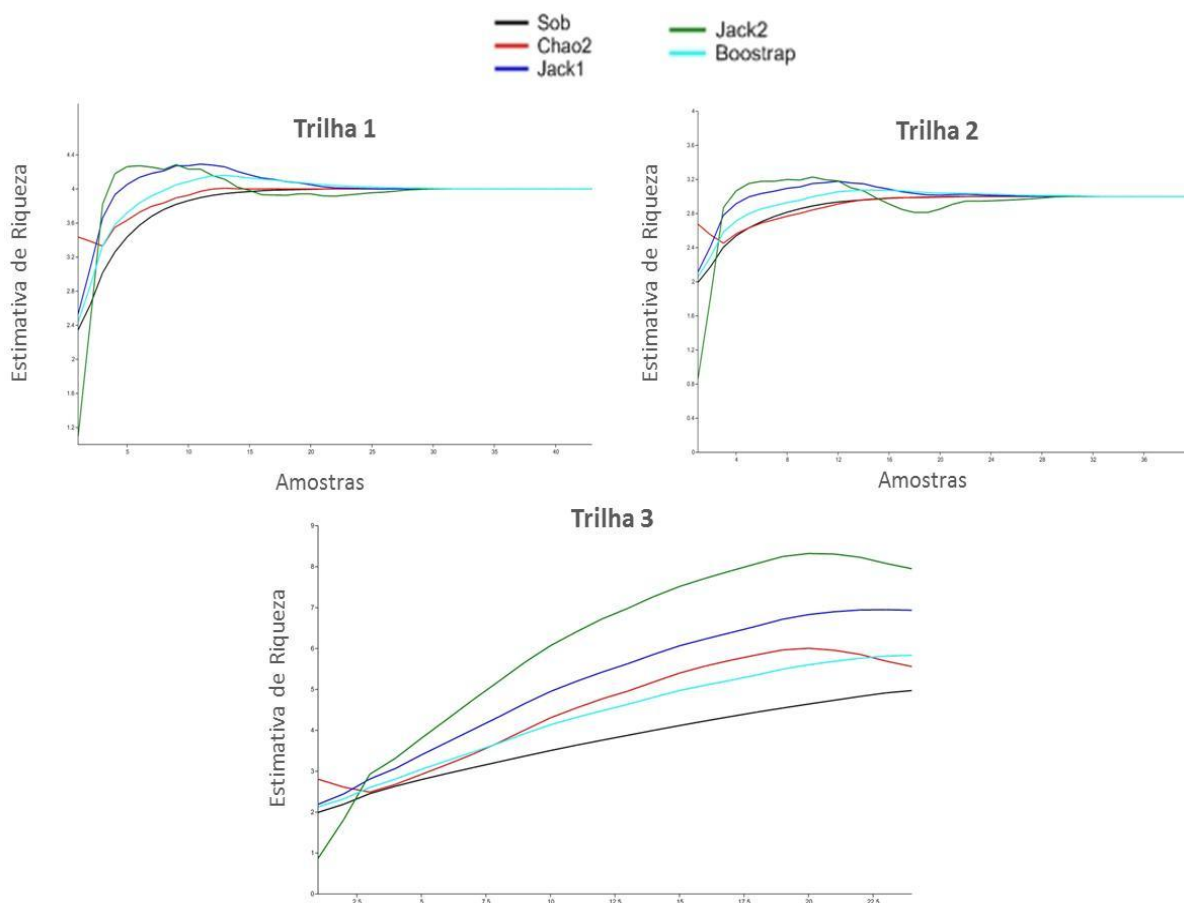


Figura 217- Curva de acumulação de espécies de pequenos mamíferos para cada uma das áreas de coleta, Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 – Maio/2011 baseada nos índices não-paramétricos utilizados. Sob: riqueza observada; Chao2, Jack1, Jack2 e Bootstrap: estimadores de riqueza.

O levantamento demonstrou uma dominância relativa de marsupiais, que representaram 56% dos indivíduos coletados, sendo *D. albiventris* a espécie mais abundante, responsável por 48% deste montante (Tab. V, Fig. 28).

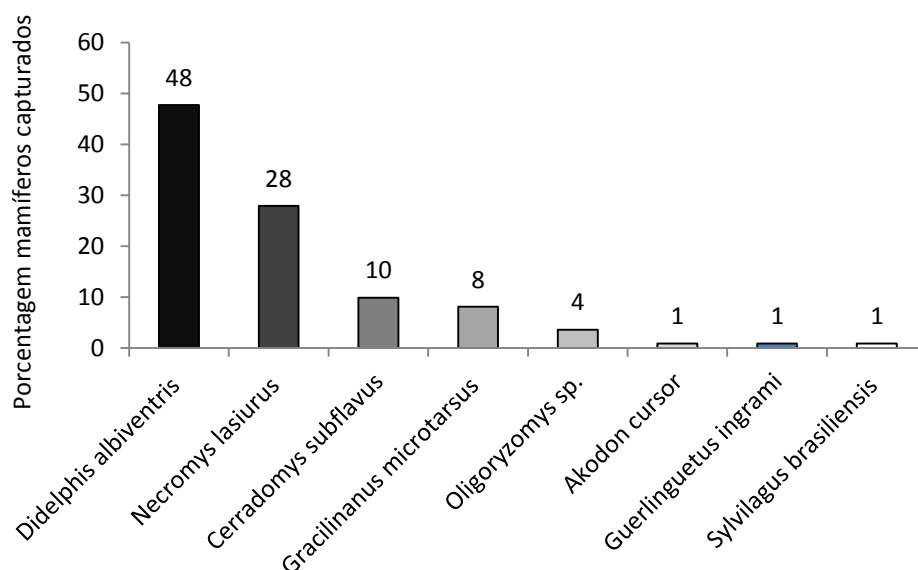


Figura 228- Frequência relativa (%) das espécies de pequenos mamíferos coletadas na Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012.

A maior abundância de espécimes coletados ocorreu na Trilha 1 (46 %), seguido pela Trilha 3 (32 %) e a Trilha 2 (22 %) (Tab. VI). A Trilha 3 apresentou o maior número de espécies coletadas, seguido pela Trilha 1 e, por último, a Trilha 2. *Didelphis albiventris* foi a espécie dominante nas Trilhas 2 e 3, enquanto na Trilha 1 *N. lasiurus* foi a mais abundante dentre as espécies coletadas (Fig. 29).

As espécies *N. lasiurus*, *C. subflavus* e *S. brasiliensis* foram coletadas somente na Trilha 1; *A. cursor* e *G. ingrami* foram exclusivas da Trilha 3. Somente nas Trilhas 2 e 3 foram capturados exemplares de *G. microtarsus* e *Oligoryzomys sp.*. A única espécie encontrada em todas as áreas foi *D. albiventris* (Fig. 29)

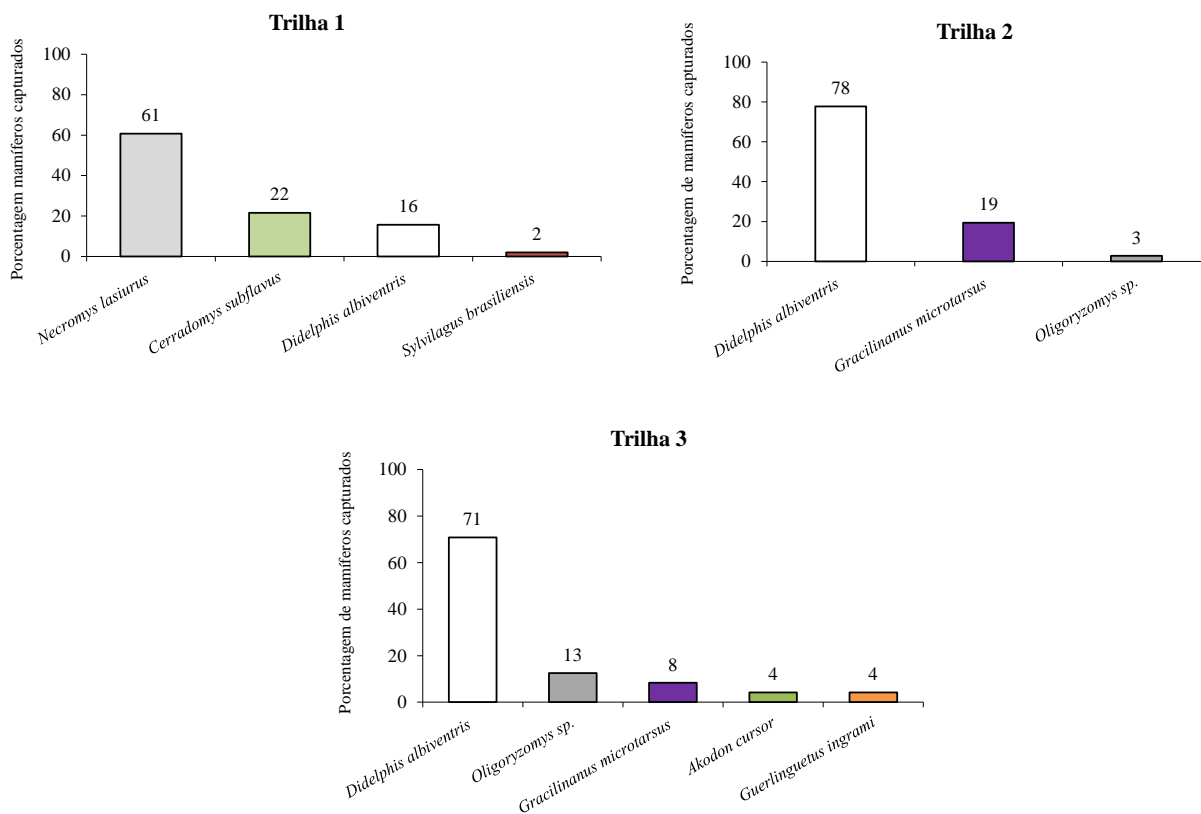


Figura 29- Frequência relativa (%) das espécies de pequenos mamíferos por local de coleta. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012.

Como em cada coleta os mamíferos receberam anilhas numeradas, pode-se verificar a ocorrência de recapturas, sendo efetuados 65 registros de pequenos mamíferos. Somente três espécies foram recapturadas, sendo *D. albiventris* a mais frequentemente encontrada. Na Trilha 2 houve o maior número de recapturas dentre os locais de coleta (Tab. VI).

Tabela VI- Número de espécimes de pequenos mamíferos recapturados na Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012. 2ª a 7ª (segunda à sétima recapturas).

Recapturas	Espécies	Trilha 1		Trilha 2		Trilha 3		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%
2ª	<i>Didelphis albiventris</i>	2	13.3	13	41.9	10	50.0	25	38.5
	<i>Necomys lasiurus</i>	6	40.0	1	3.2			7	10.8
	<i>Gracilinanus microtarsus</i>			1	3.2				
3ª	<i>Didelphis albiventris</i>	1	6.7	10	32.3	6	30.0	17	26.2
	<i>Necomys lasiurus</i>	3	20.0					3	4.6
4ª	<i>Didelphis albiventris</i>	2	13.3	3	9.7	2	10.0	7	10.8
5ª	<i>Didelphis albiventris</i>	1	6.7	1	3.2	1	5.0	3	4.6
6ª	<i>Didelphis albiventris</i>			2	6.5			2	3.1
7ª	<i>Didelphis albiventris</i>					1	5.0	1	1.5
	Total		15		31		20		66

Fatores abióticos: Nenhuma das espécies foi capturada em todos os meses de coleta. *Akodon cursor* foi coletada somente em abril/2011, *G. ingrani* em setembro/2011 e *S. brasiliensis* em julho/2011. *Cerradomys subflavus* foi coletada entre abril e julho/2011 e depois somente em novembro do mesmo ano. *Didelphis albiventris* não foi coletada somente em setembro e outubro de 2011. Esta espécie, juntamente com *G. microtarsus*, foram as únicas a serem coletadas entre janeiro e maio de 2012.

O período que apresentou maior incidência de capturas foi de abril a agosto/2011, enquanto os meses de janeiro, abril e maio/2012 apresentaram a menor incidência do número de indivíduos capturados (Tab. VII).

Analisando-se os dados meteorológicos e as coletas dos mamíferos, observou-se correlação positiva de *A. cursor* com índice pluviométrico de duas semanas anteriores às coletas [Spearman (r_s) = 0.63, $p < 0.02$]. A espécie *N. lasiurus* apresentou correlação negativa para URA de duas semanas e uma semana antes das coletas ($r_s = -0.63$, $p < 0.02$; $r_s = -0.77$, $p < 0.003$) respectivamente. A espécie *S. brasiliensis* também apresentou correlação negativa, porém com relação à temperatura média ($r_s = -0.64$, $p < 0.024$) e temperatura mínima ($r_s = -0.67$, $p < 0.018$) de duas semanas anteriores às coletas. As demais espécies não apresentaram nenhum tipo de correlação com os dados abióticos (Tab. VIII).

Tabela VII- Abundância absoluta das espécies de pequenos mamíferos por data de coleta, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012.

	Coletas												Total	
	abr/11	mai/11	jun/11	jul/11	ago/11	set/11	out/11	nov/11	jan/12	fev/12	mar/12	mai/12		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<i>Akodon cursor</i> (Winge, 1887)	1													1
<i>Cerradomys subflavus</i> (Wagner, 1842)	3	3	2	2				1						11
<i>Didelphis albiventris</i> Lund, 1840	15	4	5	3			9	6	2	5	3	1		53
<i>Gracilinanus microtarsus</i> (Wagner, 1842)		1	2	1	1			1	1	1	1			9
<i>Guerlinguetus ingrami</i> Thomas 1901						1								1
<i>Necomys lasiurus</i> (Lund, 1840)	1	1		6	11	11		1						31
<i>Oligoryzomys</i> Bang 1900 sp.		1		1	1		1							4
<i>Sylvilagus brasiliensis</i> (Linnaeus, 1758)				1										1
Total	20	10	9	14	13	12	10	9	3	6	4	1		111

Tabela VIII- Coeficientes de Correlação (r_s) das espécies de mamíferos da Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011-Maio/2012. Pluvio = Índice Pluviométrico; Temp Média = Temperatura Média; Temp Máxima = Temperatura Máxima; Temp Mínima = Temperatura Mínima; URA = Umidade Relativa do Ar; 2 sem= duas semanas antes das coletas; 1 sem= uma semana antes das coletas; sem= semana das

Espécies	Pluvio			Temp Média			Temp Máxima			Temp Mínima			URA		
	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem	2 sem	1 sem	sem
<i>Akodon cursor</i>															
(r_s)	0.63	0.75	-0.06	0.27	0.48	0.20	0.26	0.45	0.25	0.34	0.45	0.25	-0.01	0.04	0.29
(p)	0.028	0.005	0.846	0.211	0.477	0.152	0.416	0.141	0.436	0.275	0.146	0.437	0.031	0.058	0.223
<i>Cerradomys subflavus</i>															
(r_s)	0.13	0.33	-0.35	-0.17	-0.15	0.00	-0.11	-0.22	0.00	-0.10	-0.04	-0.08	-0.18	0.12	-0.03
(p)	0.681	0.291	0.262	0.598	0.651	0.997	0.737	0.487	0.991	0.750	0.891	0.807	0.567	0.715	0.938
<i>Didelphis albiventris</i>															
(r_s)	0.55	0.57	-0.01	0.11	0.33	0.09	0.00	0.21	0.15	0.30	0.47	0.15	0.24	0.42	0.48
(p)	0.063	0.053	0.982	0.727	0.297	0.786	1.000	0.511	0.644	0.342	0.121	0.643	0.445	0.179	0.114
<i>Gracilinanus microtarsus</i>															
(r_s)	-0.13	-0.24	0.04	-0.39	-0.37	-0.02	-0.40	-0.44	-0.06	-0.40	-0.27	-0.16	-0.14	0.02	-0.20
(p)	0.684	0.459	0.892	0.212	0.240	0.955	0.198	0.151	0.846	0.199	0.398	0.618	0.671	0.952	0.536
<i>Guerlinguetus ingrami</i>															
(r_s)	-0.27	-0.22	-0.19	-0.05	0.16	0.01	0.27	0.33	0.06	-0.22	-0.26	0.08	-0.43	-0.62	-0.17
(p)	0.398	0.487	0.553	0.885	0.618	0.984	0.401	0.296	0.842	0.497	0.413	0.813	0.158	0.030	0.594
<i>Necomys lasiuris</i>															
(r_s)	-0.47	-0.30	-0.38	-0.16	-0.03	-0.12	0.23	0.18	-0.07	-0.48	-0.49	-0.14	-0.63	-0.77	-0.48
(p)	0.127	0.340	0.220	0.621	0.934	0.716	0.470	0.569	0.819	0.114	0.110	0.672	0.027	0.003	0.111
<i>Olygoryzomys sp.</i>															
(r_s)	-0.54	-0.28	-0.23	-0.21	-0.19	-0.24	-0.06	-0.17	-0.23	-0.27	-0.16	-0.27	-0.24	0.00	-0.14
(p)	0.067	0.373	0.478	0.506	0.547	0.452	0.853	0.596	0.463	0.388	0.618	0.389	0.450	0.996	0.673
<i>Silvylagus brasiliensis</i>															
(r_s)	-0.27	-0.04	-0.19	-0.64	-0.35	-0.45	-0.47	-0.27	-0.58	-0.67	-0.30	-0.51	-0.28	0.00	-0.13
(p)	0.398	0.914	0.551	0.024	0.260	0.138	0.122	0.388	0.049	0.018	0.344	0.093	0.371	0.997	0.681

coletas.

5.3 Dengue vírus em *Aedes albopictus* capturados:

Para a detecção de dengue-vírus foram testados por qRT-PCR 31 *pools* de *A. albopictus* (Tab. X). Destes 19 (61 %) foram positivos para um dos sorotipos, sendo 16 (84 %) dos *pools* positivos para DENV-1 ou DENV-3 e três (16 %) para DENV-2 ou DENV-4. Houve ainda detecção, em três amostras (25, 29 e 31), de coinfecção para DENV-1 ou DENV-3 e DENV-2 ou DENV-4 (Fig. 31 a 35). Nas Trilhas 2 e 3 houve detecção de *pools* de *A. albopictus* positivos para dengue-vírus (Tab. IX e Fig. 30).



Figura 230- Localização dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para DENV nos locais de coleta da Unidade Fazendinha, Sabará/MG, Abril/2011 - Maio/2012. Número no marcador indica quantidade de *pools* positivos em cada ponto de coleta.

Tabela IX- Amostras (*pools*) de *Aedes albopictus* submetidas a qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix por local de coleta, total de amostras positivas e porcentagem de positividade por local. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012.

	<i>Pools</i>	Positivos	%
Trilha 1	1	0	0%
Trilha 2	9	6	66%
Trilha 3	21	13	62%
	31	19	61%

Tabela X- Total de amostras (*pools*) de *Aedes albopictus* submetidas a qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. F(♀): total de fêmeas no *pool*; M(♂): total de machos no *pool*; +: amostras positivas para DENV-1 ou DENV-3 e DENV-2 ou DENV-4. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011 - Maio/2012.

Amostra (<i>pool</i>)	Local	<i>Aedes albopictus</i>		DENV-1 ou DENV-3	DENV-2 ou DENV-4
		F (♀)	M (♂)		
1	Trilha 2	1			+
2	Trilha 2	1			
3	Trilha 3	3		+	
4	Trilha 3		4		
5	Trilha 3	2		+	
6	Trilha 2	2			
7	Trilha 1	1			
8	Trilha 3		1		+
9	Trilha 3	2		+	
10	Trilha 2	2		+	
11	Trilha 3	2		+	
12	Trilha 3	8			
13	Trilha 3	2		+	
14	Trilha 3	1		+	
15	Trilha 3	1		+	
16	Trilha 3	1			
17	Trilha 3		3	+	
18	Trilha 3		2	+	
19	Trilha 3	8			
20	Trilha 3		2		+
21	Trilha 3	7			
22	Trilha 3		1	+	
23	Trilha 2	1			
24	Trilha 2		1	+	
25	Trilha 2	6		+	+
26	Trilha 2		1	+	
27	Trilha 3	2			
28	Trilha 3		1		
29	Trilha 2	4		+	+
30	Trilha 3	9			
31	Trilha 3	3		+	+
Total		69	16	16	6

As amostras positivas no qRT-PCR foram submetidas à PCR convencional para se tentar detectar os sorotipos específicos. Em nove delas (47 %) pode-se inferir a confirmação

dos sorotipos: em três amostras (33 %) para DENV-1 (9, 10 e 26), quatro (45 %) para DENV-2 (1, 13, 20 e 28) e duas (22 %) (8, 25) para DENV-2 e DENV-4 concomitantemente (Tab. XI). Nas demais amostras não houve amplificação.

Tabela XI- PCR convencional das amostras de *Aedes albopictus* submetidas ao qRT-PCR e positivas para DENV. D1: amostra positiva para DENV-1; D2: amostra positiva para DENV-2; D2 e D4: amostras positivas concomitantemente para DENV-2 e DENV-4; “-“: amostras não amplificadas. Para resultados da qRT-PCR vide Tab. X.

Nº Amostra qRT-PCR	Data coleta	Resultado qTR-PCR	PCR	
			DENV-1 ou DENV-3	DENV-2 ou DENV-4
1	nov/11	D2/D4	-	D2
3	nov/11	D1/D3	-	-
5	nov/11	D1/D3	-	-
8	nov/11	D2/D4	-	D2 e D4
9	nov/11	D1/D3	D1	-
10	nov/11	D1/D3	D1	-
11	nov/11	D1/D3	-	-
13	nov/11	D1/D3	-	D2
14	set/11	D1/D3	-	-
15	set/11	D1/D3	-	-
17	nov/11	D1/D3	-	-
18	nov/11	D1/D3	-	-
20	nov/11	D2/D4	-	D2
22	nov/11	D1/D3	-	-
24	nov/11	D1/D3	-	-
25	nov/11	D1/D3 e D2/D4	-	D2 e D4
25	nov/11	D2/D4	-	-
26	nov/11	D1/D3	D1	-
29	nov/11	D1/D3 e D2/D4	-	D2
31	nov/11	D1/D3 e D2/D4	-	-

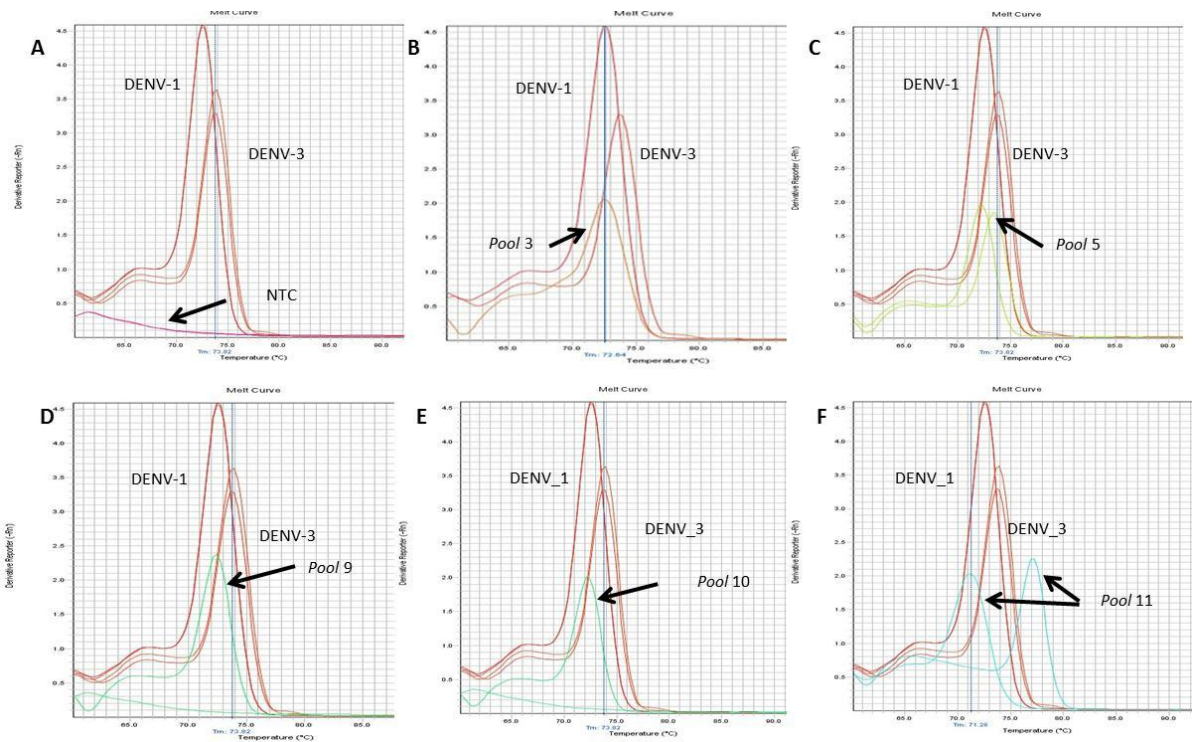


Figura 241- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos pools de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-1/DENV-3 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. A. Curvas do controle positivo: DENV-1 (72.62), DENV-3 (73.82) e controle negativo (NTC). B. a F. curvas das amostras 3, 5, 9, 10 e 11 (vide Tab. X).

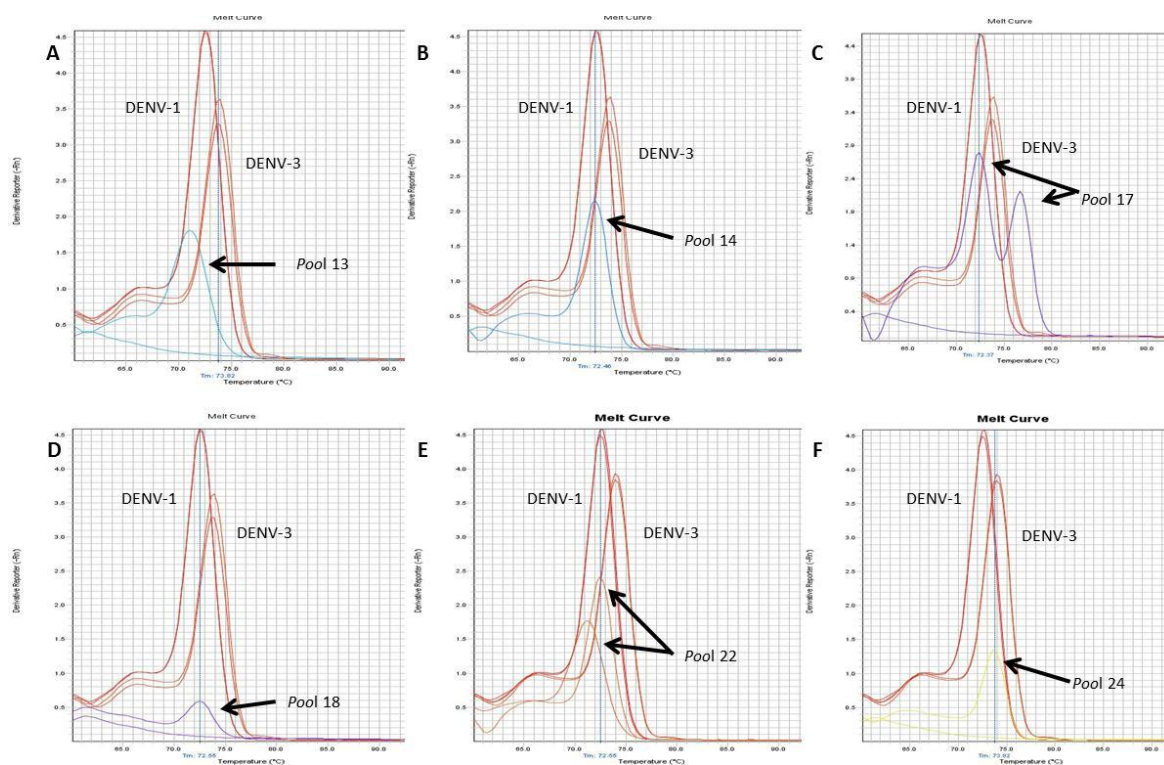


Figura 252- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-1/DENV-3 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. A. a F. curvas das amostras 13, 14, 17, 18 e 22 e 24 (vide Tab. X).

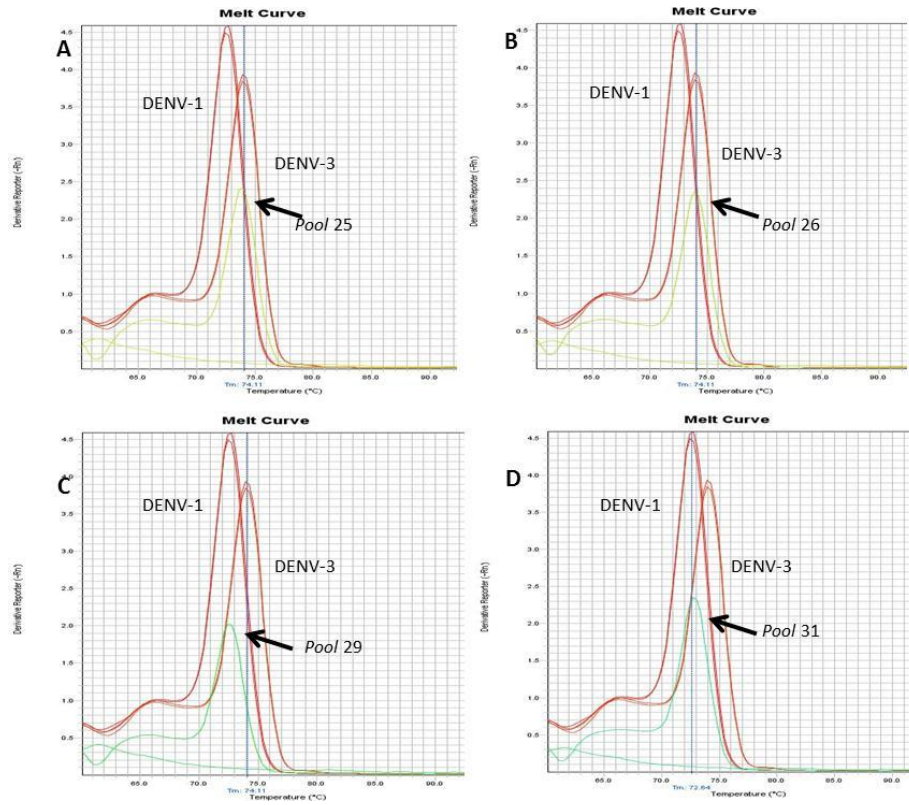


Figura 263- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos pools de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-1/DENV-3 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. **A.** a **D.** curvas das amostras 25, 26, 29 e 31 (vide Tab. X).

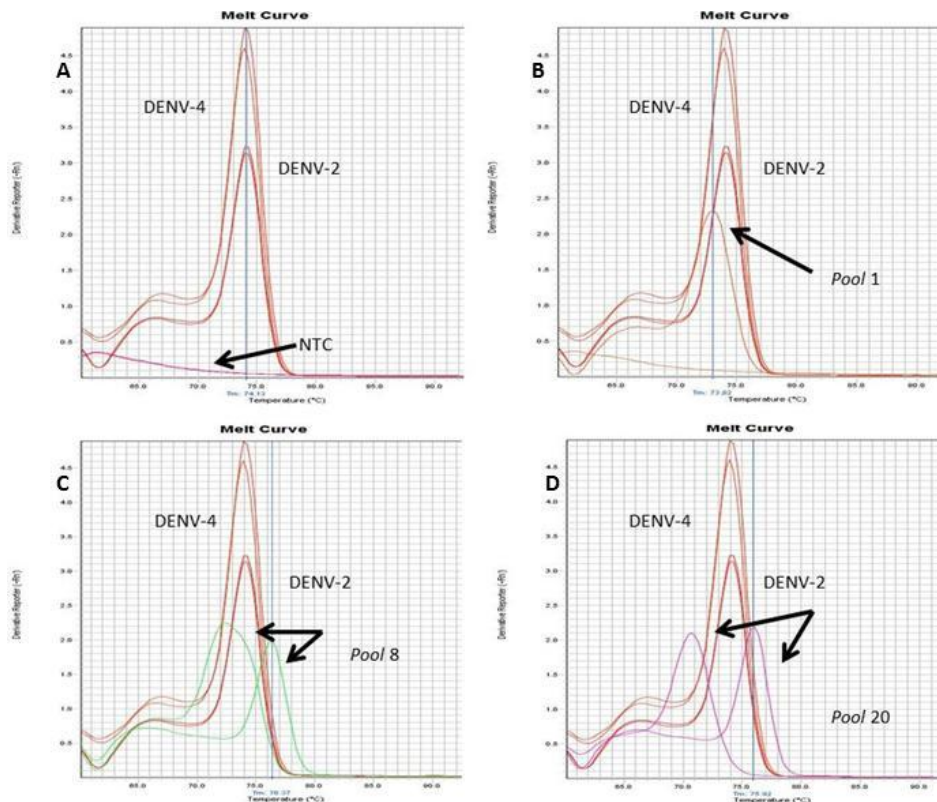


Figura 274- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-2/DENV-4 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. **A.** Curvas do controle positivo: DENV-2 (74.13), DENV-3 (73.98) **B.** a **D.** curvas das amostras 1, 8 e 20 (vide Tab. X).

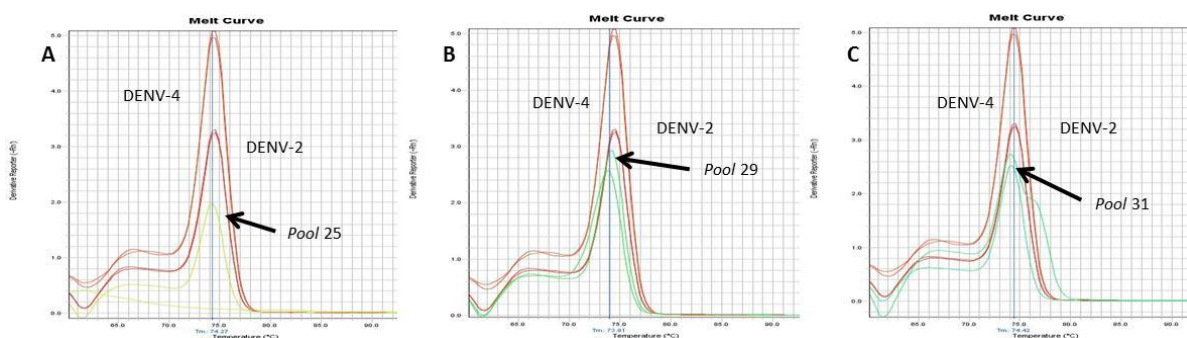


Figura 285- Curva da temperatura de *melting* (T_M) dos *pools* de *Aedes albopictus* positivos para os sorotipos DENV-2/DENV-4 por qRT-PCR utilizando SYBR Green® Master Mix. Seta indica a curva das amostras. **A.** a **C.** curvas das amostras 25, 26, 29 e 31 (vide Tab. X).

5.4 Dengue virus em pequenos mamíferos:

Dos 176 espécimes de pequenos mamíferos coletados (Item 5.1.2) foram obtidas 114 (65 %) amostras de sangue, pertencentes a sete das oito espécies capturadas. Espécimes que apresentavam qualquer tipo de debilidade física ou ainda fêmeas que estavam grávidas não tiveram o sangue retirado, por isso não foi obtido material para análise de todos os animais coletados.

Os soros provenientes dos sangues foram submetidos ao teste IgG-ELISA para uma triagem inicial contra anticorpos específicos anti-dengue. Dentre todas as 114 amostras testadas, 11 (10 %) apresentaram positividade, que variou entre 3.4 % para *N. lasiurus* e 27.5 % para *C. subflavus* (Tab. XII).

Tabela XII- Número total de soros de pequenos mamíferos testados por IgG-ELISA e respectivas porcentagens para amostras positivas e negativas. Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2001-Maio/2012.

Espécie	Amostras	ELISA-Positivos		ELISA-Negativos	
		n	%	n	%
<i>Didelphis albiventris</i>	64	6	9.4	58	90.6
<i>Cerradomys subflavus</i>	11	3	27.3	8	72.7
<i>Necromys lasiurus</i>	29	1	3.4	28	96.6
<i>Oligoryzomys sp.</i>	4	1	25.0	3	75.0
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	4	0	0.0	4	100.0
<i>Guerlinguetus ingrami</i>	1	0	0.0	1	100.0
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	1	0	0	1	100.0
Total	114	11		103	

Alíquotas de nove das 11 amostras positivas para IgG-ELISA foram submetidas ao teste de soroneutralização (PRNT). Não foram testadas todas as amostras por não haver soro suficiente para a realização dos experimentos. Das amostras analisadas, seis apresentaram PRNT > 50%, ou seja, o soro testado foi capaz de neutralizar a formação de placas citopáticas em mais de 50% quando comparadas com o controle, indicando a presença de anticorpos específicos anti-dengue (Tab. XIII).

Tabela XIII- Número total de soros de pequenos mamíferos testados por soroneutralização (PRNT) e respectivas porcentagens de redução de placa para cada sorotipo de DENV. Números em negrito com PRNT > 50 %. N. amostras (PCR): código utilizado nos testes de PCR das respectivas amostras (vide Fig. 37). Unidade Fazendinha, Sabará/MG. Abril/2011-Maio/2012.

N. Amostras (PCR)	Espécies	Coleta (mês/ano)	Local (Trilha)	DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
				MP	%	MP	%	MP	%	MP	%
1	<i>Cerradomys subflavus</i>	abr/11	1	8.0	53	32.5	29	35.0	24	29.0	21
2	<i>Cerradomys subflavus</i>	abr/11	1	13.0	0	36.0	22	36.0	22	21.5	41
3	<i>Didelphis albiventris</i>	abr/11	3	10.0	0	28.0	39	36.5	21	1.0	97
-	<i>Oligoryzomys sp.</i>	mai/11	3	18.0	0	32.5	29	45.5	1	41.5	0
4	<i>Didelphis albiventris</i>	mai/11	2	18.0	0	29.0	37	38.0	17	2.5	93
5	<i>Cerradomys subflavus</i>	jun/11	1	10.0	41	32.0	30	48.0	0	11.5	68
-	<i>Necromys lasiurus</i>	set/11	1	24.0	0	42.5	8	-	-	52.0	0
6	<i>Didelphis albiventris</i>	nov/11	2	21.0	0	32.0	30	45.0	0	5.0	86
7	<i>Didelphis albiventris</i>	nov/11	3	17.0	0	32.5	29	47.5	0	3.5	90
CV				17.0		46.0		45.0		36.5	

MP: média do número de placas formadas

CV: controle positivo (número de placas formadas)

Sete amostras positivas para soroneutralização (amostras 1 a 7 Tab. XIII) e uma positiva para ELISA (amostra 8 Fig. 36) foram então submetidas à PCR para detecção viral, uma vez que destas foi possível a extração de RNA e produção de cDNA. A amostra 1 foi positiva para DENV-1, a amostra 2 foi positiva para DENV-2, a amostra 8 para DENV-3 e as amostras 3, 4, 5, 6 e 7, para DENV-4 (Fig. 37).

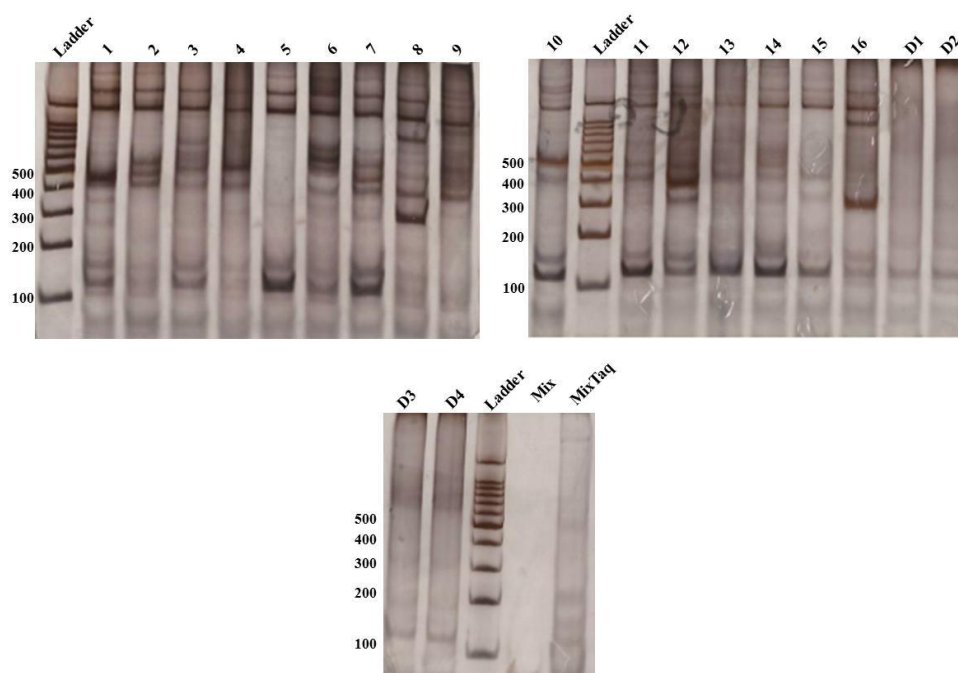


Figura 296- Gél de poliacrilamida 8 % das amostras de oito pequenos mamíferos positivos para dengue-vírus por PRNT ou ELISA. Ladder: padrão de bandas (100 a 500 pb); Linhas 1 a 8 (amostras com cDNA diluído (1:20)); Linhas 9 a 18 (repetição em sequência das amostras 1 a 8, com cDNA não diluído); D1-D4: controle-positivo para os quatro sorotipos. Mix e MixTaq: controles negativos. DENV-1: 482 pb; DENV-2: 119 pb; DENV-3: 288 pb; DENV-4: 394 pb.

Tabela XIV- Comparação entre as metodologias de detecção de DENV utilizadas nas amostras de soros de pequenos mamíferos da Unidade Fazendinha, Sabará/MG, Abril/2011 - Maio/2012. ELISA (IgG-ELISA); PRNT (soroneutralização); PCR (RT-PCR). + / -: reação positiva (+) ou negativa (-) para cada uma das técnicas utilizadas; **na**: análise não realizada. Numeração ao lado do nome específico é a mesma utilizada nas amostras que foram submetidas à PCR (vide Fig. 37).

Espécie	ELISA	PRNT		PCR	
		+ / -	DENV	+ / -	DENV
<i>Cerradomys subflavus</i> (1)	+	+	1	+	1
<i>Cerradomys subflavus</i> (2)	+	+	-	+	2
<i>Didelphis albiventris</i> (3)	+	+	4	+	2/4
<i>Oligoryzomys sp.</i>	+	+	-	na	na
<i>Didelphis albiventris</i> (4)	+	+	4	+	2/4
<i>Cerradomys subflavus</i> (5)	+	+	4	+	2
<i>Necromys lasiurus</i>	+	-	-	na	na
<i>Didelphis albiventris</i> (6)	+	+	4	+	2
<i>Didelphis albiventris</i> (7)	+	+	4	+	2
<i>Didelphis albiventris</i> (8)	+	na	na	+	3
<i>Didelphis albiventris</i>	+	na	na	na	na

6 DISCUSSÃO

6.1 - Estrutura da comunidade dos culicídeos

O presente trabalho realizou capturas de mosquitos adultos em área de remanescente de mata urbana, utilizando a armadilha BGS em um período de 12 meses. Apesar de ter sido desenvolvida com o objetivo de capturar fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Kroeckel et al. 2006), a armadilha apresenta aplicação também para capturar outras espécies de culicídeos, urbanas ou silvestres (Gama et al. 2012, Hepairai et al. 2013). Foram encontrados dez gêneros e 26 espécies, semelhante às 25 espécies pertencentes a nove gêneros encontradas por Gama et al. (2012) em Porto Velho (RO). Neste mesmo trabalho 96 % dos espécimes coletados foram fêmeas e 4 % de machos, diferente da proporção de 1.5 % de machos encontrada no presente trabalho. Sabe-se que machos são encontrados ao redor de humanos à procura de fêmeas para cópula (Hartberg 1971 *apud* Maciel-de-Freitas et al 2006) e, de acordo com Gadelha & Toda 1985 eles são um indicativo seguro da presença de criadouro próximo. Desta forma, especula-se que a captura de machos pela BGS esteja relacionada à estrutura e composição da armadilha, que simulam um hospedeiro humano (Kröckel et al 2006, Maciel-de-Freitas et al 2006), a proximidade destas a um criadouro ou mesmo algum tipo de feromônio sexual que atraia os machos para o local onde as fêmeas estejam (Paixão 2011).

A utilização de CO₂ em armadilhas é bastante relatada para aumentar a captura de culicídeos em áreas silvestres principalmente (Reeves 1990, Canyon & Hii 1997, Meeraus et al. 2008). Os resultados do presente trabalho corroboram a literatura, indicando que o uso do CO₂ aumenta a abundância de culicídeos capturados em remanescente de mata urbana.

As áreas onde foram realizadas as coletas na Unidade Fazendinha em Sabará demonstraram ter um perfil próprio de espécies encontradas, de acordo com a análise de NMDS. As altas porcentagens de dissimilaridade encontradas confirmam este perfil, sendo as áreas de mata (Trilhas 2 e 3) mais semelhantes quanto ao perfil de espécies do que as áreas de campo e mata (Trilha 1 e Trilha 2; Trilha 1 e Trilha 3 respectivamente) e ainda mata e área construída (Trilha 2 e Escola; Trilha 3 e Escola respectivamente). De forma interessante percebe-se que, apesar das áreas de coleta serem relativamente próximas (alguns pontos entre diferentes locais distavam cerca de 100 m), há uma preferência das espécies por determinados habitats.

Todos os métodos superestimaram a riqueza máxima em todos os locais de coleta. Isso pode ser explicado pelo fato dos estimadores se apoiarem na heterogeneidade dos dados para realizar suas estimativas. A cada ocorrência de uma espécie rara (Colwell 2006), aumenta a heterogeneidade, fazendo com que os estimadores considerem uma maior probabilidade de encontrar novas espécies.

As espécies dominantes *C. quinquefasciatus*, *L. durhamii*, *A. albopictus*, *H. leucocelaenus*, *C. fajardi* e *A. aegypti* demonstram um conjunto que pode representar o caráter heterogêneo de exploração e preferência por habitats da família. *Culex quinquefasciatus* é encontrado associado a áreas com alto impacto antrópico como, por exemplo, o crescimento urbano desordenado, e que apresentam deficiência em infraestrutura básica como falta de esgoto e drenagem. Ao contrário de outras espécies, que tem sua diversidade reduzida com alterações ambientais, *C. quinquefasciatus* apresenta sua população aumentada, o que a torna a espécie predominante em locais impactados (Brasil 2011b). A presença dominante da espécie na Trilha 1 evidencia a proximidade da população do entorno com o local de coleta, o mesmo ocorrendo em menor intensidade na Trilha 3 na Área da Escola. Na Trilha 2 também houve captura de *C. quinquefasciatus*, sendo o local com a menor índice de dominância encontrado, o que pode ser explicado pelo menor grau de perturbação antrópica e a dificuldade de acesso aos pontos de coleta.

Limatus durhamii apresenta larvas que são encontradas em criadouros naturais eventualmente predando larvas de outras espécies de culicídeos (Lopes 1999). A espécie pode ser coletada em ambientes silvestres, mas também em área de peridomicílio, o que confere uma mobilidade entre áreas preservadas e antropicamente alteradas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). No presente trabalho a espécie foi encontrada nos quatro locais de coleta, sendo em maior abundância nas áreas de mata (Trilhas 2 e 3).

A espécie *A. albopictus* é considerada de caráter silvestre no Brasil, mas, desde a sua introdução no país na década de 1980, vem sendo encontrada em áreas rurais, urbanas e suburbanas e cada vez mais próxima de ambientes antrópicos (Borges 2001, Gomes 2008), algumas delas aproveitando-se dos mesmos tipos de criadouros de *A. aegypti* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Essa mudança de comportamento da espécie pode ser verificada pelo encontro da espécie em todos os locais de coleta, apesar de apresentar maior abundância na área de mata, representada pelas Trilhas 2 e 3. Interessantemente, 20% das capturas na área da Escola foram de *A. albopictus*, provavelmente devido à proximidade desse local com a

área de mata da Trilha 2, sugerindo uma mudança de preferência por habitats mais antropizados ou ainda uma adaptação a estes.

Haemagogus leucocelaenus tem habitat predominantemente florestal, sendo considerado silvestre, mas pode ser encontrada em remanescentes de mata urbana, possuindo criadouros em cascas de frutas, ocos de árvores e internódios de bambus (Barbosa et al. 2003). Apresentam hábitat acrodendrofílico, ou seja, preferem picar em copas de árvores, mas também são encontrados próximos ao nível do solo. A espécie foi coletada basicamente nas Trilhas 2 e 3, corroborando a literatura com relação ao seu habitat preferencial.

Chagasia fajardi são mosquitos essencialmente silvestres, com hematofagia associada a copa de árvores e têm criadouros em pequenas coleções de água limpa, geralmente em encostas de montanhas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Apesar da Trilha 2 apresentar as características descritas anteriormente e apresentar maior abundância relativa para a espécie, observou-se na Trilha 3 um maior número de espécimes coletados (Tab. I). Um único exemplar foi encontrado na Área da Escola, enquanto 10 espécimes foram capturados na Trilha 1, o que pode sugerir que a espécie tenha preferência silvestre mas pode transitar dentre diferentes habitats contíguos.

Aedes aegypti é espécie antropofílica e endofílica, sendo associada com habitats humanos. Foi encontrada em todos os locais de coleta, sendo a maior porcentagem na Área da Escola, o que evidencia sua preferência por locais antropizados (Consoli & Oliveira 1994).

Sabethes (S.) tridentatus foi encontrada basicamente na Trilha 3, sendo um único exemplar coletado na Trilha 2. De forma semelhante às demais espécies da tribo Sabethini que foram coletados [*S. (S.) chloropterus*, *S. (S.) idiogenes*, *S. (D.) petrochiae* e *S. (S.) purpureus*], *S. tridentatus* é estritamente silvestre e sensível a alterações ambientais, sendo o reduzido número de exemplares capturados indicativo de alguma perturbação ambiental (Dorville 1996) ou ainda um indicativo de que a metodologia utilizada talvez não tenha sido apropriada para o grupo.

Espécimes do gênero *Anopheles* também foram coletados da Unidade Fazendinha. *Anopheles (N.) darlingi* foi encontrado nas quatro áreas de coleta, sendo a Trilha 1 o local onde o houve o maior número de capturas, seguido pela Trilha 3. A espécie também é considerada antropofílica e endofílica no Brasil, associada à ocupação e/ou alteração antrópica (Consoli & Oliveira 1994). *Anopheles (N.) argyritarsis* foi encontradas nas três Trilhas, sendo o maior número de capturas encontrado na Trilha 3. É uma espécie que possui como criadouros diversas coleções d'água naturais, mas que também pode colonizar

criadouros artificiais como caixas d'água (Silva et al. 2008). Um único exemplar de *A. (A.) punctimacula* foi coletado na Trilha 2. A baixa taxa de captura de espécimes desse gênero pode ter sido decorrente da ausência de criadouros que permitissem a reprodução em maior número desses insetos ou, ainda, da metodologia utilizada. A utilização de armadilhas como a BG-Malária (adaptação da BGS) podem aumentar a captura de anofelinos, principalmente *A. darlingi*, além de permitir um menor dano aos exemplares coletados (Gama et al. 2013).

A espécie *C. declarator* foi encontrada somente na Trilha 1 e *A. scapularis*, *A. punctimaculata*, *P. ferox* e *S. Petrochiae* somente na Trilha 2. *Uranotaenia. geometrica* foi identificada em todos os locais de coleta, exceto na Trilha 3. Todas essas espécies foram amostradas em baixa abundância, o que dificulta as inferências com relação à preferência por determinado habitat dentre os locais de coleta.

Uma vez que algumas espécies de culicídeos são sensíveis a alterações ambientais, antrópicas ou não, estes podem exercer importante papel de bioindicadores de qualidade de área (Dorville 1996). Na Trilha 1, que apresentou a maior abundância de culicídeos dentre as demais áreas de coleta, *C. quinquefasciatus* foi a espécie dominante. Devido a essa predominância, o índice de diversidade desta trilha foi o menor, uma vez que quanto maior a dominância de espécies menor a diversidade do local. Apesar de ser uma área com características de solo e vegetação condizentes com Cerrado, a grande ação antrópica, evidenciada principalmente pelo encontro de lixo por toda a extensão da trilha, pode ter modificado o perfil de espécies do local. Com isso, o levantamento da composição da comunidade dessa fitopaisagem fica comprometido. A proximidade do local com as demais áreas de coleta (cerca de 200 m de distância) pode favorecer o deslocamento entre os locais de coleta e justificar o encontro de espécies silvestres como *C. fajardi*, *A. albopictus*, *L. durhamii* *Sabethes* spp. nessa trilha.

Na Área da Escola também houve predominância de espécies sinantrópicas (*C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*). De forma interessante, *A. albopictus* também foi coletada na área, demonstrando que a espécie pode transitar entre as áreas, ou adapta-se a cada uma delas. Assim como na Trilha 1, na Área da Escola houve coleta de espécies silvestres, como *L. durhamii*, *U. geometrica* e *C. fajardi*. A proximidade com as demais áreas pode justificar a presença destas espécies, carreadas pelo vento ou mesmo esporadicamente atraídas para o local.

A maior diversidade de espécies nas Trilhas 2 e 3 indica um certo grau de manutenção das características naturais do local. A Trilha 2, de acesso mais difícil, não possuía lixo ou

vestígios de utilização frequente pelos alunos e/ou moradores. As espécies dominantes, *L. durhamii* e *A. albopictus*, que podem apresentar mobilidade entre áreas preservadas e antropicamente alteradas representaram, juntas, cerca de 70% das capturas realizadas no local.

A Trilha 3 apresentou o maior índice de diversidade, onde espécies silvestres e sinantrópicas foram coletadas. Observou-se a presença de lixo e trilhas paralelas à principal, utilizada para realização das coletas. Mesmo sendo em menor intensidade que a Trilha 1, a presença humana propiciou o encontro de espécies como *C. quinquefasciatus* (25,2%) e *A. aegypti* (0,5%), mas também de espécies conhecidamente de caráter silvestre, como *L. durhamii*, *H. leucocelaenus*, *S. tridentatus*.

Estudos da fauna de culicídeos em fragmentos de mata são relevantes, uma vez que o local pode ser utilizado como refúgio para muitas espécies de mosquitos e de hospedeiros para a hematofagia (Barbosa et al. 2003). Coletas de larvas e adultos em remanescente de mata em Curitiba (PR) encontraram espécies como *Culex* (*C.*) grupo *coronator*, que apresenta facilidade de adaptação a ambientes alterados, espécies de *Mansonia*, que ocorrem em área urbana normalmente associada a vegetação aquática e ainda *H. (C.) leucocelaenus* e espécimes da tribo Sabethini, consideradas de hábito silvestre por habitarem preferencialmente ambientes florestais, sendo importantes na transmissão de febre amarela (Barbosa et al. 2003).

Em Belo Horizonte (MG) foram realizadas coletas de culicídeos adultos com isca humana e capturador de Castro, ao longo de 12 meses, entre 1989 e 1990, na Estação Ecológica da UFMG. Nessa área, um remanescente de mata inserida no interior do *campus* da universidade, foram capturados exemplares de *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Limatus* e *Psorophora* (Silva & Neves 1989). Nas coletas de mosquitos adultos realizadas com armadilha CDC iscada com CO₂ no Parque Ecológico da Cantareira, um remanescente urbano de mata da região metropolitana de São Paulo (SP), verificou-se a presença de 28 espécies distribuídas em 10 gêneros (*Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Haemagogus*, *Limatus*, *Ochlerotatus*, *Sabethes*, *Tricoproson*, *Wyeomyia*). A ausência de *Anopheles (Kerteszia)*, somada à presença de espécimes da Tribo Sabethini e da espécie *Culex (Melanoconion) vaxus*, que possui hábito hematofágico ecléticos podendo ser encontrados em ambientes naturais ou artificiais, indica que o Parque é fragmento de mata com características silvestres e interferência antrópica (Montes 2005).

Considerando as características biológicas e ecológicas das espécies de culicídeos coletadas, a Unidade Fazendinha pode ser considerada como fragmento de mata urbana com

manchas preservadas, apresentando características silvestres e interferência antrópica direta, de forma concomitante.

Com relação aos fatores abióticos, Silva & Neves (1989) coletaram *A. albopictus* em Belo Horizonte (MG) ao longo de todo ano, exceto nos meses de agosto e setembro, que apresentaram os menores índices pluviométricos. Em Sabará (MG) a espécie foi encontrada ao longo de todas as coletas e, mesmo nos meses de seca, continuou sendo capturada, apesar da diminuição da população. Provavelmente deve-se à sua preferência silvestre, que proporciona criadouros nos meses em que a pluviosidade é muito baixa ou inexistente ou ainda à diferença metodológica utilizada nos trabalhos. O mesmo não foi observado para *A. aegypti* que não foi coletada em julho de 2011, mês com o menor índice pluviométrico. A ausência de captura pode ser justificada pelo fato da espécie de apresentar preferência por criadouros artificiais, que normalmente são mais escassos nos meses de seca, diminuindo a população em campo a níveis não detectáveis pela metodologia de coleta escolhida.

O perfil fisiológico das fêmeas estudadas indicou uma idade mais avançada da população em campo. A predominância de fêmeas nulíparas (mais novas) era esperada nas capturas com a armadilha BGS, uma vez que esta foi utilizada com o atraente sintético de odor humano, como ocorrido no estudo de marcação e recaptura realizado por Maciel-de-Freitas et al. (2006) no Rio de Janeiro (RJ) e por Williams et al. (2006) na Austrália. No entanto, observou-se no presente estudo que a maioria das fêmeas era onípara (párida), para *A. albopictus*, ou estavam grávidas, como *A. aegypti*. As fêmeas oníparas normalmente estão em maior quantidade no ambiente que não recebe medida de controle para estes vetores. Este fato pode representar a ausência dessas medidas no local, o que permite a permanência das fêmeas mais velhas no ambiente. Já o encontro significativo de fêmeas grávidas de *A. aegypti* pode estar relacionado com a proximidade da área de estudo a regiões urbanizadas do município ou mesmo da Área da Escola, que pode propiciar disponibilidade de alimento e criadouros.

Paixão (2007) em capturas realizadas com a BGS na cidade de Fortaleza (CE) encontrou maior número de fêmeas páridas (grávidas ou com sangue) comparado com outras metodologias para captura de mosquitos adultos. Em estudos realizados na área urbana de Belo Horizonte (MG), Moraes (2009) encontrou maior porcentagem de fêmeas grávidas de *A. aegypti* entre as capturas com a BGS, assim como Ázara (2013) também detectou maior porcentagem de fêmeas oníparas em coletas realizadas na área urbana de Manaus (AM).

Todos estes estudos evidenciam um perfil semelhante de idade das fêmeas, que pode resultar em maior probabilidade de transmissão do vírus da dengue, uma vez que ao se

infectar pela primeira vez, realizando repasto sanguíneo em hospedeiros em período de viremia, estas ficam aptas a transmitir o vírus ao longo de todo o restante de sua vida, que pode variar de 20 a 30 dias em campo (Hoeck et al. 2003).

Do ponto de vista epidemiológico é muito importante avaliar o estado fisiológico das fêmeas de vetores, uma vez que quanto mais velha a população em campo, maior a probabilidade de transmissão de patógenos.

6.2 Estrutura da comunidade de pequenos mamíferos:

A área da Fazendinha, Sabará (MG) apresenta uma paisagem montanhosa com fortes rupturas de declive e vale encaixado à margem do Rio das Velhas, estando inserido na área de contato dos Biomas Mata Atlântica e Cerrado. No presente trabalho foram realizadas coletas de oito espécies de pequenos mamíferos não voadores ao longo de 12 meses (abril/2011 a maio/2012) no local.

No período de junho a setembro de 2008 foi realizado um levantamento da fauna de pequenos mamíferos na Fazendinha, sendo amostradas áreas de Cerrado e de Mata Atlântica. Foram coletados 35 indivíduos pertencentes a oito espécies. As capturas na área de Cerrado corresponderam a 57% do total de espécimes coletados, enquanto a área de Mata apresentou 43% (Madeira 2009). Comparando as coletas do presente estudo com as realizadas nas mesmas localidades em 2008, as capturas na área do Cerrado corresponderam a 46 % do total, sendo 54 % na área de Mata. No entanto, considerando-se somente os mesmos meses de coleta, estas porcentagens alteram-se para 73 % e 27 % respectivamente, sendo que esta discordância pode ser devida a diferença nos fatores abióticos entre as duas datas de coleta ou mesmo alterações físicas decorrentes das queimadas ou aumento da utilização da área pela população local.

Das oito espécies coletadas por Madeira et al. (2009) (*Gracilinanus* sp., *D. albiventris*, *Monodelphis domestica*, *N. lasiurus*, *Cerradomys* sp., *Rhipidomys mastacalis*; *Guerlinguetus* sp. e *Sylvilagus brasiliensis*), *M. domestica* e *R. mastacalis* foram encontradas somente naquele ano e *Akodon cursor* e *Oligoryzomys* sp. apenas no presente trabalho. Estas espécies habitam formações florestais, áreas abertas adjacentes e campos de altitude ao longo da Mata

Atlântica e Cerrado. Como no trabalho realizado em 2008 foram amostradas somente duas estações, pode-se, talvez, justificar o encontro de *A. cursor* e *Oligoryzomys* sp nas coletas realizadas em 2011 e 2012, sendo desconhecido o motivo da ausência das outras duas espécies no presente trabalho.

Em um fragmento de mata do Estado de São Paulo foram realizadas coletas de pequenos mamíferos utilizando armadilhas do tipo Sherman e gaiolas, iscadas com banana e bacon (Briani et al. 2001). Com sucesso de captura variando entre 5% e 15%, foram capturados 10 espécies de mamíferos. No presente trabalho o sucesso de captura total foi de 4.73 %, sendo mais baixo do que Briani et al. (2011) encontraram e dentro da faixa de 4 % a 20 % que Mesquita (2009) encontrou em fragmentos conectados florestais no Sul de Minas. O CDC considera como sucesso de captura ‘razoável’ aquelas que atingem acima de 10 % mas, devido a fatores como sazonalidade, local de coleta, metodologias escolhidas e esforço amostral dentre outros, essa porcentagem pode variar, sem, contudo, interferir na qualidade e nas análises dos dados obtidos (CDC 1994).

Entre os anos de 2007 e 2008 foram realizadas coletas de mamíferos utilizando armadilhas Tomahawk e Sherman na Estação Ecológica da UFMG, um remanescente de mata com transição entre Cerrado e Mata Atlântica. Foram capturados marsupiais (*D. albiventris* e *Marmosops incanus*) e roedores (*Necromys lasiurus*, *Oryzomys* sp.), além de terem sido realizadas observações da presença de *S. brasiliensis* e *G. ingrani*, por visualização direta das espécies ou presença de vestígios, destacando a importância de remanescentes urbanos na manutenção da diversidade biológica local (Silva 2008). Assim como na Fazendinha, a Estação Ecológica da UFMG apresenta intensa movimentação de pessoas em seu interior, sendo semelhantes também nas espécies de pequenos mamíferos encontradas. Sete das oito espécies identificadas neste estudo foram encontradas na UFMG, demonstrando perfil análogo na composição faunística dos dois remanescentes de mata.

Com o intuito de se monitorar comunidades de pequenos mamíferos inseridos em pequenos fragmentos florestais conectados por corredores de vegetação no sul de Minas Gerais, realizaram-se coletas ao longo de um ano, utilizando o método de captura-marcação-recaptura com armadilhas Tomahawk e Sherman. Do total de indivíduos capturados, 59% foram roedores e 41% marsupiais. Foram registradas 12 espécies, algumas conhecidas por serem exclusivas de fragmentos (*M. incanus*, *N. lasiurus* e *N. squamipes*) e outras, como *Cerradomys subflavus*, *D. albiventris*, *G. microtarsus* e *O. nigripes*, estando presentes tanto nos fragmentos como nos corredores amostrados (Mesquita 2009). Na Fazendinha a maior

porcentagem de coleta foi de marsupiais (56 %) e cinco espécies foram comuns nos dois estudos (*C. subflavus*, *D. albiventris*, *G. microtarsus*, *Olygoryzomys* sp. e *N. lasiurus*).

Estudos realizados em fragmentos florestais de diferentes tamanhos em Minas Gerais constataram os marsupiais foram os pequenos mamíferos mais comumente encontrados (Fonseca 1989), o que corrobora os dados encontrados no presente estudo. Na Unidade Fazendinha *D. albiventris* foi a única espécie encontrada em todos os locais de coleta, sendo mais abundante nas Trilhas 2 e 3. A presença de mata pode propiciar uma maior disponibilidade de fontes alimentares, o que justificaria seu encontro mais frequente nessas localidades.

A espécie *C. subflavus* foi encontrada somente na Trilha 1, assim como *N. lasiurus*. As espécies são encontradas em formações abertas e florestais de Cerrado e regiões transicionais Cerrado-Mata Atlântica, sendo dominantes em Cerrado, Cerradão e campo sujo (OPAS/MS 2008, Mesquita 2009). Levando-se em consideração as preferências de habitats das espécies, estando a distribuição restrita ao Cerrado no presente trabalho, considera-se que a sua ocorrência é coerente com o descrito na literatura.

Gracilinanus microtarsus é espécie encontrada na Mata Atlântica, apesar de não se restringir a ela. Em Sabará a espécie foi coletada somente na área de Mata (Trilhas 2 e 3), mas coletas realizadas em plantação de eucalipto em São Paulo indicaram a possibilidade da espécie se adaptar a ambientes alterados pelo homem (Umetsu & Pardini 2007).

A espécie *G. ingrami* possui preferência por estratos baixos e intermediários de Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado ou Caatinga. Possui importante papel na recuperação de ambientes degradados e fragmentados, principalmente por ser predador e dispersor de sementes em áreas tropicais (Mendes & Júnior 2011). Na Fazendinha em Sabará (MG) um único exemplar foi capturado em gaiola na Trilha 3, apesar de ser sido visualizada várias vezes próximo à Área da Escola, o que pode indicar que *G. ingrami* apresenta no local um comportamento sinantrópico.

O coelho do mato *S. brasiliensis* tem como habitat borda de matas e apresenta hábitos noturnos. A espécie foi coletada uma única vez na Trilha 1, que faz divisa com uma pequena mata, onde foi demarcada a Trilha 2, sendo o seu habitat na Fazendinha condizente com o descrito na literatura (Hoffman & Andrew 2005). A espécie tem sido descrita como “saborosa”, sendo utilizada na alimentação humana (Alves et al. 2013), podendo este ser um dos motivos para sua baixa frequência de captura nas armadilhas instaladas no local.

A espécie *A. cursor* foi capturada uma vez na Fazendinha, na coleta de abril de 2011 em uma gaiola instalada na área de Mata (Trilha 3). É encontrada em formações florestais, áreas abertas adjacentes e campos de altitude ao longo da Mata Atlântica e é considerado como endêmica no Brasil e América do Sul. Em coletas realizadas em 2008 foram capturados três indivíduos da espécie na área de mata da Trilha 2 (Madeira 2008). Apesar da ação antrópica, aparentemente, não interferir quanto à sua abundância (Geise 2012), no presente estudo a única coleta desta espécie pode indicar a diminuição de sua população frente à perturbação antrópica encontrada na área.

Oligoryzomys sp. habita formações florestais, Mata Atlântica e Cerrado (OPAS/MS 2008). No presente trabalho quatro exemplares do gênero foram coletados: um na Trilha 2 e três na Trilha 3, estando então restrita à área de mata da Fazendinha. O gênero possui informações anatômicas de limites morfológicos e diferenças regionais mal estabelecidas, o que dificulta a sua identificação específica (Machado et al. 2011). Dessa forma, optou-se no presente trabalho pela classificação genérica dos espécimes coletados.

Além de seu papel ecológico na dispersão de sementes, *A. cursor*, *N. lasiurus* e algumas espécies de *Oligoryzomys* são consideradas como reservatórios de hantavírus (Brasil 2002b, Figueiredo et al. 2010, Limongi et al. 2013), podendo também participar do ciclo epidemiológico da peste bubônica (Brasil 2013). Tais fatos incentivam a realização de trabalhos relacionando monitoramento e inquéritos epidemiológicos em remanescentes de mata, que podem servir de habitat para a espécie.

Com exceção de *G. ingrani* que não apresenta um *status* quanto ao seu estado de conservação, todas as demais espécies coletadas neste trabalho têm seu estado de conservação considerado pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) como pouco preocupantes.

6.3 Dengue virus em *Aedes albopictus*:

No presente trabalho constatou-se a presença de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 em *A. albopictus* coletados em área de remanescente de mata urbana, no município de Sabará (MG). Desde 1993 vem-se detectando exemplares da espécie naturalmente infectados com DENV no

Brasil (Serufo et al. 1993, Ibañez-Bernal et al. 1997, Cecílio et al. 2009, Figueiredo et al. 2010), sendo estes relatos cada vez mais frequentes. Mesmo assim, o MS, responsável no país pela elaboração de medidas de controle da dengue no país, não considera o *A. albopictus* como vetor do DENV, focando o combate ao vetor exclusivamente para *A. aegypti* (Brasil 2002a, 2013a). Cecílio et al. (2009) afirmam que a utilização de estratégias de controle para *A. albopictus*, seguindo os mesmos parâmetros empregados para *A. aegypti* pode ser um risco para o controle de dengue no país, por desconsiderarem as características intrínsecas tanto do *A. albopictus* quanto dos locais por ele habitados.

Alguns aspectos podem contribuir para a espécie ser considerada como vetora de DENV no Brasil. Uma das principais seria sua competência vetorial. Sabe-se que em condições laboratoriais *A. albopictus* é capaz de se infectar e transmitir DENV e diversos outros arbovírus (febre amarela, Oropouche, Encefalite Japonesa, Vírus do Oeste do Nilo, Zica) (Shroyer 1986, Hawley 1988, Estrada-Franco & Craig 1995, Lambert et al. 2010). Aliada a essa competência, pode-se citar sua maior susceptibilidade a diferentes vírus em comparação com o *A. aegypti* (Mitchell 1995). Além da competência vetorial, características biológicas e ecológicas como comportamento eclético de hematofagia (incluindo a antropofilia), adaptação a diferentes habitats, grande valência ecológica (Borges 2001, Gratz 2004), favorecem a expansão e adaptação da espécie em praticamente todo o país. Em alguns municípios de Minas Gerais, por exemplo, o *A. albopictus* é a espécie dominante, superando em abundância o *A. aegypti*, o que aumenta o contato da espécie com o ser humano (Mitchell 1995).

Com a utilização de diferentes técnicas de detecção viral (qRT-PCR e PCR convencional), pode-se detectar *pools* de *A. albopictus*, das coletas da Fazendinha, infectados com os três sorotipos de *Dengue virus*. A utilização de mais de um recurso auxilia na elucidação do resultado e, mesmo que não ocorra sobreposição de resultados, muitas vezes devido às diferenças inerentes da própria técnica, estes podem ser considerados mais confiáveis quando obtidos em conjunto (Cordeiro 2012).

Dos *pools* de mosquitos positivos para DENV, dois foram confirmados com DENV-4. De acordo com o MS, o sorotipo DENV-4 somente foi reconhecido como circulante no Brasil em 2011 (Brasil 2011), apesar de em 2005 amostras de pacientes em Manaus (AM) já terem detectado o sorotipo na cidade (Figueiredo et al. 2005). A presença dos diferentes sorotipos de

dengue na Fazendinha sugere: (a) que o local já apresenta os vírus circulantes, num ciclo silvestre; (b) vetores podem ter entrado em contato com a população humana e, com isso, fazer o *tráfico viral* (Marcondes & Tauil 2011), estabelecendo um ciclo retrógrado urbano-silvestre (Teixeira et al. 1999).

A presença de dois *pools* co-infectados por DENV-2 e DENV-4, sendo uma com um único macho da espécie (amostra 8) e outra um *pool* com seis fêmeas (amostra 25) pode levantar questionamentos sobre a infectividade deste vetor. Como as seis fêmeas foram testadas em conjunto, não se sabe se a co-infecção ocorreu em um único espécime ou em mais de um deles. O encontro de machos infectados pode indicar transmissão vertical e ter importante papel em épocas interepidêmicas ou mesmo nas épocas de seca (Cecílio et al. 2009). A espécie também já apresentou co-infecção por diferentes arbovírus como *Dengue virus* e Chikungunya (Vazeille et al. 2010). A importância epidemiológica de espécies vetoras co-infectadas por diferentes vírus, ou por mais de um sorotipo de DENV, por exemplo, ainda é desconhecida, necessitando a avaliação de outros parâmetros epidemiológicos para se estabelecer sua importância (Pessanha et al. 2011).

Apesar de não terem sido obtidos dados de circulação viral em pacientes e nem em mosquitos no município de Sabará, constata-se a circulação concomitante dos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 desde 2011 em Belo Horizontes.

O município de Sabará fica distante aproximadamente 30 Km da capital mineira. Com a expansão e especulação imobiliária nas cidades da região metropolitana de Belo Horizonte, tem havido um movimento de desconcentração demográfica da capital para outros municípios, assim como para Sabará (Matos 1999). Essa mudança de perfil, aliada aos movimentos pendulares (residir em um município e trabalhar em outro), induz a um aumento do fluxo populacional e, conseqüentemente, de patógenos carreados de um local para outro, incluindo-se o dengue-vírus. Ressalta-se que a área experimental, Fazendinha, era intensamente utilizada pelos moradores, alunos e pelos próprios professores, a sua maioria moradores de Belo Horizonte (Rilson Barbosa, *comunicação pessoal*). Essa migração diária de pessoas pode colaborar diretamente com a circulação viral da população humana para os mosquitos do local. Ressalta-se que *A. albopictus* foi detectado ao longo dos 12 meses de trabalho na Fazendinha, em todas as áreas coletadas, o que favorece ainda mais o contato vetor-humanos.

Houve encontro de espécimes infectados com DENV nas Trilhas 2 e 3. Como somente um *pool* de *A. albopictus* pertencente à Trilha 1 foi testado, esta ausência de positividade no local pode ter sido devido à baixa amostragem. Nenhum *pool* pertencente à área da Escola foi testado para DENV, o que não permitiu inferir sobre a transição de vetores infectados no local. Mas, sabendo-se que a espécie transita entre todos os locais coletados da área experimental, há possibilidade de haver indivíduos infectados por DENV também nesses locais, considerando sua capacidade de dispersão, proximidade entre as áreas coletadas e condições favoráveis para manutenção do seu ciclo evolutivo.

Aedes albopictus é considerado por alguns autores como espécie antropofílica (Gratz et al. 2004, Benedict et al 2007). Por outro lado, há relatos de que a espécie não seja tão adaptada a ambientes urbanos e sua reduzida antropofilia em relação ao *A. aegypti* pode torná-la um vetor menos eficiente (Rezza 2012). Os resultados do presente trabalho sugerem a mobilidade da espécie entre ambientes abertos (Cerrado), área construída (Escola) e ainda área de Mata (Trilhas 2 e 3), evidenciando certa flexibilidade para transitar entre diferentes habitats. Mesmo tendo a maior abundância relacionada à área de Mata, o encontro de *A. albopictus* nos demais locais de coleta indica que a espécie possa realizar todo seu ciclo biológico no local, desde a postura de ovos até a alimentação sanguínea.

Coletas de *A. albopictus* utilizando a BGS em Nova Jersey (USA) detectaram sangue de roedores, cachorros, gatos e gambás, além do homem, no conteúdo intestinal (Egizi et al. 2013). Considerando a presença da espécie principalmente em área de mata, com ocorrência de mamíferos não primatas que podem ser utilizados na alimentação sanguínea da espécie, e ainda sua suscetibilidade a vários patógenos, *A. albopictus* pode vir a participar de ciclos enzoóticos de agentes etiológicos possivelmente presentes nesses mamíferos, incluindo dengue.

Levando-se em consideração o evidente contato de *A. albopictus* com DENV, o número crescente de trabalhos reportando a expansão e adaptação da espécie em diversos ambientes, além das características inerentes à espécie, deve haver um questionamento sobre a tomada de decisão e as medidas preconizadas para o combate à transmissão do vírus no país.

6.4 *Dengue virus* em pequenos mamíferos:

No Brasil, este é o primeiro relato de sorologia e virologia positivas para dengue-vírus em roedores e marsupiais. Inquéritos sorológicos e investigações epidemiológicas indicam o contato de primatas com o dengue-vírus e os incluem na manutenção de ciclos silvestres de dengue (Peiris et al. 1993, Gubler 1998, Silva et al. 1999, Moncayo et al. 2004). Mais recentemente esse tipo de levantamento tem sido realizado também com mamíferos não primatas, incluindo roedores, gambás e morcegos na Guiana Francesa (De Thoisy et al. 2004, 2009). Comparando os resultados encontrados na Fazendinha, Sabará (MG) com aqueles da Guiana Francesa percebeu-se que, apesar das ordens serem semelhantes, nenhuma das espécies aqui testadas foi analisada anteriormente. Assim, registra-se pela primeira vez sorologia positiva para dengue em *D. albiventris* e *C. subflavus*.

As amostras positivas para DENV foram coletadas entre abril e novembro de 2011. Em todos os locais de coleta houve positividade das amostras, em pelo menos uma das metodologias de detecção utilizadas. De forma semelhante ao discutido para os mosquitos, a utilização de diferentes técnicas pode ser considerada um modo mais confiável de se obter resultados quando obtidos em conjunto (Cordeiro 2012). Pode-se citar, por exemplo, o ELISA e a PCR. Ambos são testes confiáveis, utilizados para uma grande variedade de diagnósticos mas, muitas vezes, os resultados positivos para ELISA não são reproduzidos na PCR, devido a uma baixa carga viral nas amostras analisadas. Apesar disso, os dois testes, que podem ser complementares, são extremamente válidos.

Desconhece-se o real papel das espécies de pequenos mamíferos na epidemiologia da dengue. Especula-se que possam ser hospedeiros definitivos, secundários ou acidentais ou ainda que possam atuar como reservatórios permitindo a manutenção do vírus no local, sendo fonte para infecção dos mosquitos e para transmissão interepidêmica da doença (De Thoisy et al. 2009). Questionamentos sobre duração da viremia, patologia ou mesmo mudança de comportamento nos pequenos mamíferos infectados por DENV podem ser levantados, sendo a elucidação destas e outras perguntas solucionadas, talvez, com estudo mais aprofundados sobre a relação vetor-vírus-hospedeiro em ambientes silvestres, inseridos ou não em áreas urbanas. Sendo assim, a investigação da ocorrência de ciclo de dengue silvestre nas Américas, com foco nos mosquitos e mamíferos não humanos em áreas de mata, são imprescindíveis,

mesmo que ainda não tenham sido relatados casos ou mesmos surtos relacionados a essas áreas (Marcondes & Tauil 2011).

Considerando o encontro de *A. albopictus* infectados com DENV no presente trabalho, além de sua distribuição e abundância nas áreas de coleta da Fazendinha, parece haver contato destes mosquitos com os pequenos mamíferos presentes no local. Apesar de ainda não ter sido realizado o sequenciamento para se comparar se os vírus circulantes nos mamíferos são semelhantes àqueles encontrados nos mosquitos, especula-se que a espécie vetora utilize-se dos vertebrados como fonte para o seu repasto. O hábito hematofágico eclético e oportunista do *A. albopictus*, a presença em todos os locais coletados e a confirmação de positividade para DENV são indícios que sugerem o envolvimento da espécie na transmissão do vírus para os pequenos mamíferos. Pode-se questionar como estaria sendo realizada a transmissão entre os participantes da cadeia. Os mosquitos estariam sendo infectados ao realizar repasto sanguíneo na população que utiliza a área (professores, funcionários, alunos, invasores), transmitindo para os pequenos mamíferos ou se os vírus, mantidos em replicação nos mamíferos ali existentes, seriam adquiridos pelos mosquitos no momento do repasto sanguíneo nos hospedeiros não humanos.

Pensando ainda na possibilidade do ciclo silvestre de dengue, estudos com outras espécies de culicídeos, como *H. leucocelaenus* também têm demonstrado infectividade para DENV, tornando a questão da transmissão em áreas de mata ou remanescentes de mata urbana bem mais complexa e mais comum do que a relatada (Marcondes & Alencar 2010, Figueiredo et al. 2010).

A situação atual de dengue é preocupante, considerando-se como área de transmissão somente o ambiente urbano. Com a possibilidade de áreas silvestres servirem como “refúgios” para DENV, o quadro tende a se agravar, sendo as atuais medidas de controle utilizadas ineficazes ou inadequadas para atender a um novo panorama epidemiológico da doença (Marcondes & Tauil 2011).

7 - CONCLUSÕES

- A armadilha BGS é uma ferramenta capaz de capturar diferentes espécies de culicídeos em ambientes diversos;
- A utilização do CO₂ nas armadilhas BGS em remanescente de mata urbana aumentou a abundância de espécimes coletados;
- O perfil de espécies de culicídeos foi diferente entre as quatro áreas de coleta da Unidade Fazendinha, Sabará (MG);
- Considerando as características biológicas e ecológicas das espécies de culicídeos coletadas, a Unidade Fazendinha pode ser considerada como fragmento de mata urbana com manchas preservadas, apresentando características silvestres e interferência antrópica direta, de forma concomitante;
- O perfil fisiológico das fêmeas estudadas indicou uma idade mais avançada da população em campo, que pode resultar em maior probabilidade de transmissão do dengue-vírus;
- Das oito espécies de pequenos mamíferos encontradas na Fazendinha, quatro possuem relação com a manutenção, amplificação e disseminação de diferentes patógenos, o que estimula a condução de pesquisas futuras relacionando monitoramento e inquéritos epidemiológicos em remanescentes de mata;
- Constatou-se a presença de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 em *A. albopictus* coletados em área de remanescente de mata urbana, no município de Sabará (MG) com a utilização de qRT-PCR e PCR convencional, sendo um macho de *A. albopictus* detectado com co-infecção de DENV-2 e DENV-4;
- Pela primeira vez no Brasil tem-se a detecção sorológica e virológica para DENV em pequenos mamíferos (roedores e marsupiais);

- Foram detectados os quatro sorotipos conhecidos de DENV em duas espécies de pequenos mamíferos, *D. albiventris* e *C. subflavus*.
- Pequenos mamíferos e o mosquito *A. albopictus* parecem participar de um ciclo não urbano de dengue;
- Com o novo quadro relatado de possível transmissão e manutenção de dengue em áreas de remanescente de mata urbana, a abrangência da doença se altera o que, conseqüentemente, leva ao questionamento e um olhar diferenciado para a metodologia de controle da doença frente a um novo quadro epidemiológico relatado.

8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas coletas de culicídeos realizadas em Sabará, verificou-se que a composição das espécies de culicídeos variou de acordo com os locais, sugerindo que mesmo em pequenos fragmentos de mata há preferência dos mosquitos por determinados habitats. De forma generalizada, a Unidade Fazendinha pode ser considerada como fragmento de mata com características silvestres e interferência antrópica.

Essa característica da mata urbana, que é muitas vezes intensamente utilizada pela população ao redor, faz com que o local seja referência e, ao mesmo tempo, reflexo das ações e acontecimentos ao seu redor. Provavelmente a exposição da área às pessoas e vice-versa fez com que os mamíferos e mosquitos entrassem em contato com o dengue-vírus. Especula-se que esse fluxo viral possa ser da área para a população humana, da população humana para a área ou ainda as duas situações concomitantemente.

No Brasil, este é o primeiro relato de sorologia e virologia positivas para dengue-vírus em roedores e marsupiais. Apesar de não se saber ao certo qual o real papel dessas espécies na epidemiologia da doença, especula-se que ocorra a manutenção do vírus no local, fazendo dos pequenos mamíferos uma fonte para infecção dos mosquitos e para transmissão intepidêmica da doença.

Uma vez que pequenos mamíferos também podem ser utilizados como fonte alimentar para as fêmeas de *A. albopictus*, a espécie pode vir a participar de ciclos enzoóticos de diversos patógenos presentes nesses mamíferos, incluindo a dengue. Também há possibilidade de que outras espécies de culicídeos também estejam participando desse ciclo de transmissão silvestre da dengue como *H. leucocelaenus*.

Com o novo quadro relatado de possível transmissão e manutenção de dengue em áreas de remanescente de mata urbana, a abrangência da doença se altera o que, conseqüentemente, leva ao questionamento e um olhar diferenciado para a metodologia de controle da doença frente a um novo quadro epidemiológico relatado.

Como perspectivas para o trabalho tem-se a realização do sequenciamento dos sorotipos encontrados, para se verificar se são genótipos circulantes na população humana ou se são silvestres. Pretende-se também realizar novos inquéritos populacionais e sorológicos em pequenos mamíferos nas áreas de borda de remanescentes de mata, para se verificar o fluxo desses animais entre a mata e as residências locais. Estudos para se identificar a fonte alimentar dos *A. albopictus* nesse tipo de habitat podem ajudar a elucidar a preferência por

determinados hospedeiros. Também planeja-se fazer coletas e testes de detecção de DENV em outras espécies de mosquitos para se conhecer melhor a epidemiologia e a dinâmica de transmissão de dengue em remanescentes de mata urbana.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFPMB 2012. *Dengue and Chikungunya Vector Control Pocket Guide*. United States of America.
- Acosta AOA, Maito RM, Granja F, Cordeiro JS, Cardoso MN, Corado AL, Honorato R, Naveca FG 2011. *Dengue virus type 4, Roraima, Brazil. Emerging infectious diseases* 17: 1979–1980.
- Albuquerque CD, Melo-santos MAV, Bezerra MAS, Silva DF 2000. Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área de Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 34: 314–315.
- Alencar CHMD, Albuquerque LMD, Aquino FD, Soares TMCB, Soares CB, Raimos Júnior AN, Lima JWO, Pontes RJS 2008. Potencialidades do *Aedes albopictus* como vetor de arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária. *Revista APS* 11: 459–467.
- Alencar J, Lorosa ES, Silva JSS, Lopes CM, Guimarães AE 2005. Observações Sobre Padrões Alimentares de Mosquitos (Diptera : Culicidae) no Pantanal Mato-Grossense. *Neotropical entomology* 34: 681–687.
- Ali A, Nayar JK 1997. Invasion, spread and vector potential of *Aedes albopictus* in the USA and its control possibilities. *Medical Entomological Zoologia* 48: 1–9.
- Alves RRN, Alves N, Pereira T, Oliveira R, Rosa IL 2013. Wild Animals Used as Food Medicine in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1–12.
- Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, AS S 2005. BioEstat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.
- Azara TMF, Degener CM, Roque RA, Ohly JJ, Geier M, Eiras ÁE 2013. The impact of CO₂ on collection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* Say by BG-Sentinel® traps in Manaus, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 229–232.
- Barata EAMDF, Costa IAP, Chiaravalloti-Neto F, Glasser CM, Barata MS, Natal D 2001. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil * *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. *Revista de Saúde Pública* 35: 237–242.
- Barbosa AA, Navarro-Silva MA, Calado D 2003. Atividade de Culicidae em remanescente florestal na região urbana de Curitiba (Paraná, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 59–63.
- Barreto ML, Teixeira MG 2008. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados* 22: 53–72.

- Barros RSM 2007. Medidas de diversidade biológica. : 1–13.
- Beketov M a, Yurchenko Y a, Belevich OE, Liess M 2010. What environmental factors are important determinants of structure, species richness, and abundance of mosquito assemblages? *Journal of Medical Entomology* 47: 129–139.
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley W a, Lounibos LP 2007. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 7: 76–85.
- Borges SMA 2001. Importância de *Aedes albopictus* nas Américas. : 99pp.
- Braga IA, Gomes ADC, Nelson M, Mello RDCG, Bergamaschi DP, Souza JMP 2000. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição , para detecção de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 347–353.
- Braga IA, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: History of control in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 113–118.
- Braks M a H, Honório N a, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *Journal of Medical Entomology* 40: 785–794.
- Brasil 2001. *Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor*. Brasília.
- Brasil 2002a. *Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento*. Brasília.
- Brasil 2002b. *Manual de Controle de Roedores*. Brasília.
- Brasil 2006. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Brasília.
- Brasil 2009. *Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue*. Brasília.
- Brasil 2011a. *Isolamento do sorotipo DENV4 em Manaus / AM*. Brasília.
- Brasil 2011b. *Guia de Vigilância do Culex quinquefasciatus*. Brasília.
- Brasil 2013a. *Levantamento rápido de índices para Aedes aegypti – LIRAA – para vigilância entomológica do Aedes aegypti no Brasil*. Brasília.
- Brasil M da S 2013b. Ministério da Saúde - Hantavírus.
- Briani D, Santori R, Vieira M, Gobbi MVN 2001. Mamíferos não-voadores de um fragmento de mata mesófila semidecídua , do interior do Estado de São Paulo , Brasil. *Holos Environment* 1: 141–149.

- Brito MD, Marques GR a. M, Marques CC a., Tubaki RM 1986. Primeiro encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Estado de São Paulo (Brasil). *Revista de Saúde Pública* 20: 1986.
- CDC 1967. *Ovitrap surveys*. Atlanta, Geórgia.
- CDC 1995. *Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testes*.
- CDC 2013a. Dengue Maps. : <http://www.healthmap.org/dengue/>.
- CDC 2013b. Dengue. : <http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/laboratory.h>.
- Cancrini G, Pietrobelli M, Frangipane di Regalano AF, Tampieri MP, Torre A della 1995. Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. *Parassitologia* 37: 141–145.
- Canyon DV, Hii JLK 1997. Efficacy of Carbon Dioxide, 1-Octen-3-ol, and lactic Acid in Modified Fay-Prince Traps as Compared to Man- Landing Catch of *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 13: 66–70.
- Castro-Gomes A 1998. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. *IESUS* 7: 49–57.
- Castro-Gomes ADC, Bitencourt MD, Natal D, Luis P, Pinto S, Mucci LF, Paula MBD, Roberto P, Ecologia DD 1999. *Aedes albopictus* em área urbana do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. *Revista de Saúde Pública* 33.
- Castro-Gomes AD, Silva NN, Bernal RTI, Leandro ADS, Camargo NJD, Silva AM, Ferreira AC, Ogura LC, Oliveira SJ, Moura SM 2007. Especificidade da armadilha Adultrap para capturar fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 216–219.
- Castro-Gomes AD, Souza JMPD, Pimentel D, Jair LF, Roberto V, Leite OF, Rangel O, Souza SSL, Guimarães NSN, Lima VLC 2005. Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. *Revista de Saúde Pública* 39: 206–210.
- Castro-Gomes A, Torres MAN, Gutierrez MFC, Lemos FL, Lima MLN, Martins JF, Costa ZGA 2008. Registro de *Aedes albopictus* em áreas epizoóticas de febre amarela das Regiões Sudeste e Sul do Brasil (Diptera: Culicidae). *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 17: 71–76.
- Causey CE 1964. *The role of small mammals in maintenance of arbovirus in the Brazilian Amazon Forest*. Belém.

- Cecílio a B, Campanelli ES, Souza KPR, Figueiredo LB, Resende MC 2009. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 69: 123–127.
- Chiarello AG, Aguiar LMDS, Cerqueira R, Melo FR, Rodrigues FHG, Silva VM 2008. *Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil*.
- Clarke K 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117–143.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of *Dengue virus* replication and pathogenesis. *Journal of virology* 80: 11418–11431.
- Colwell RK 2006. EstimateS - Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples.
- Consoli R, Oliveira R 1994. *Classificação e principais espécies de importância sanitária*. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Cordeiro MT 2012. Laboratory diagnosis for dengue. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 54 Suppl 1: S10–2.
- Corte R dos S La 2003. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). 37: 671–673.
- Cáceres NC 2002. Food Habits and Seed Dispersal by the White-Eared Opossum *Didelphis Albiventris* in Southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 37: 1–9.
- Câmara FP, Lúcia R, Theophilo G, Teixeira G, Regina S, Gonçalves F, Câmara DCP, Matos RCD 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 192–196.
- Deen J, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 368: 170–173.
- Degallier N, Marcus J, Teixeira S, Soares S, Regilene D, Pinto SCF, Jesus AD, Chaib M, Vasconcelos PFC, Oliveira E 2003. *Aedes albopictus* may not be vector of *Dengue virus* in human epidemics in Brazil. 37: 386–387.
- Detinova TS 1962. *Age-grouping methods in Diptera of medical importance*. Geneva, Switzerland.
- Dorville LFM 1996. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in Southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in literature. *Study Neotropical Fauna and Environment* 31: 68–78.

- Egizi A, Healy SP, Fonseca DM 2013. Rapid blood meal scoring in anthropophilic *Aedes albopictus* and application of PCR blocking to avoid pseudogenes. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 16: 122–128.
- Eiras ÁE 2011. Culicídeos. In: Neves DP, Melo AL, Vitor RWA (Eds.), *Parasitologia Humana*, Atheneu, Belo Horizonte, p. 546.
- Eiras ÁE, Resende MC 2009. Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Cadernos de Saúde Pública* 25: 545–558.
- Eisenberg JF, Redford KH 1999. *Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. The University of Chicago Press, London.
- Emmons LH, Feer L 1997. *Neotropical Rainforest Mammals. A Field Guide*. University of Chicago, Chicago.
- Estrada-Franco JG, Craig GBJ 1995. *Biology, Disease relationships and control of Aedes albopictus*. PAHO, Washington, D.C.
- FUNED 2012. *Nova orientação para realização de isolamento viral para dengue e febre amarela*. Belo Horizonte.
- Facchinelli L, Koenraadt CJM, Fanello C, Kijchalao U, Valerio L, Jones JW, Scott TW, Torre A della 2008. Evaluation of a sticky trap for collecting *Aedes* (*Stegomyia*) adults in a dengue-endemic area in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 904–909.
- Fagbami AH, Monath TP, Fabiyi A 1977. *Dengue virus* infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans. *Transactions of The Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* 71: 60–65.
- Farajollahi A, Kesavaraju B, Price DC, Williams GM, Healy SP, Gaugler R, Nelder MP 2009. Field efficacy of BG-Sentinel and industry-standard traps for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and West Nile virus surveillance. *Journal of medical entomology* 46: 919–925.
- Fay RW, Eliason DA 1966. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 26: 531.
- Fay RW, Perry AS 1965. Laboratory studies of ovipositional preference of *Ae. aegypti*. *Mosquito News* 25: 276.
- Fay RW, Prince WH 1970. A modified visual trap for *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 30: 20–23.
- Fernández Z, Forattini P 2003. Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e história reprodutiva Survival. *Revista de Saúde Pública* 37: 285–291.

- Figueiredo MLG, C Gomes A de, Amarilla A a, S Leandro A de, S Orrico A de, Araujo RF de, S M Castro J do, Durigon EL, Aquino VH, Figueiredo LTM 2010. Mosquitoes infected with *Dengue viruses* in Brazil. *Virology journal* 7: 152–156.
- Figueiredo RMPD, Naveca FG, Bastos MDS, Viana SDS, Gomes MP, Costa CA 2008. *Dengue virus*. *Emerging infectious diseases* 14: 667–669.
- Finotti R, Santos MM, Cerqueira R 2012. Diet, digestive tract gross anatomy and morphometry of *Akodon cursor* Winge (Sigmodontinae): relations between nutritional content, diet composition and digestive organs. *Mammalia* 76: 81–89.
- Focks DA 2003. *A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors*. Geneva, Switzerland.
- Fonseca GAB 1989. Small mammals species diversity in brazilian tropical primary and secondary forests of different sizes. *Revista Brasileira de Zoologia* 6: 381–421.
- Forattini O 1986. Identificação de *Aedes* (*Stegomyia*) *Albopictus* (Skuse) no Brasil. *Revista de Saúde Pública* 20: 244–245.
- Forattini O 2002. *Culicidologia Médica Volume 2*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Castro-Gomes A 1993. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 1--Parity of blood seeking *Anopheles* (*Kerteszia*) in south-eastern Brazil. *Revista de saúde pública* 27: 1–8.
- Fávaro EA, Dibo MR, Mondini A, Ferreira AC, Barbosa AAC, Eiras ÁE, Barata EAMF, Chiaravalloti-neto F 2006. Physiological state of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs in Mirassol, Sao Paulo, Brazil. *Journal of vector ecology* 31: 285–291.
- Fávaro E a, Mondini A, Dibo MR, Barbosa A a C, Eiras AE, Chiaravallotii-Neto F 2008. Assessment of entomological indicators of *Aedes aegypti* (L.) from adult and egg collections in São Paulo, Brazil. *Journal of vector ecology* : 33: 8–16.
- Fé NF, Graças Vale Barbosa M das, Alecrim WD, Guerra MVDF 2003. Registration of the occurrence of *Aedes albopictus* in an urban zone in Manaus, Amazonas, Brazil. *Revista de saúde pública* 37: 674–675.
- Gadelha DP, Toda AT 1985. Biologia e comportamento de *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 37: 29–36.
- Gama RA, Maria I, Antônio H, Monteiro DO, Eiras ÁE 2012. Fauna of Culicidae in rural areas of Porto Velho and the first record of *Mansonia* (*Mansonia*) *flaveola* (Coquillett, 1906), for the State of Rondônia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45: 125–127.

- Gama RA, Silva IMD, Geier M, Eiras AE 2013. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 763–771.
- Gama RA, Silva EM, Silva IM, Resende MC, Eiras AE 2007. Evaluation of the sticky MosquiTRAP for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) during the dry season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical entomology* 36: 294–302.
- Geier M, Rose A, Eiras AE 2004. Attractive host odours for mosquitoes: the blend ratio makes de difference. In: *XXII International Congress of Entomology*, Brisbane, Queensland, Australia.
- Geier M, Rose A, Grunewald J, Jones O 2006. New mosquito trap improve the monitoring of disease vectors. *International Pest Control Association*: 125–126.
- Geise L 2012. *Akodon cursor* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Species* 44: 33–43.
- Gerais M 2009. *Diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais* (GM Drummond, CS Martins, MB Greco, and F Vieira, Eds.). Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Gillies MT 2009. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. *Bulletin of Entomological Research* 70: 525–532.
- Gratz NG 1999. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual review of entomology* 44: 51–75.
- Gratz N 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology* 18: 215–227.
- Grenha V, Macedo MV, Pires AS, Monteiro RF 2010. The role of *Cerradomys subflavus* (RODENTIA , CRICETIDAE) as seed predator and disperses of the palm *Allagoptera arenaria*. *Mastozoologia Neotropical* 17: 61–68.
- Gubler DJ 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 480–496.
- Guedes LMP 2012. CULICIDAE (DIPTERA) NO BRASIL : RELAÇÕES ENTRE DIVERSIDADE , DISTRIBUIÇÃO E ENFERMIDADES. *Oecologia Australis* 16: 283–296.
- Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, Cecilia D 2009. Development of real time PCR for detection and quantitation of *Dengue viruses*. *Virology journal*: 6.
- Guzman MG, Rosario D, Kouri G 1996. Advances in dengue diagnosis. *Clinical Diagnostic Immunology* 3: 621–627.

- Guzmán MG, Kourí G 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases* 8: 69–80.
- Halstead SB 2007. Seminar 209126 Dengue. *Lancet* 370: 1644–1652.
- Halstead SB 2008. *Dengue virus-Mosquito interaction. Annual review of entomology* 53: 273–291.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD 2001. Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4.
- Hapairai LK, Joseph H, Sang MAC, Ritchie SA, Burkot TR, Sinkins SP, Hervé C, Melrose W 2013. Field Evaluation of Selected Traps and Lures for Monitoring the Filarial and Arbovirus Vector , *Aedes polynesiensis* (Diptera : Culicidae), in French Polynesia. *Entomological Society of America* 50: 731–739.
- Harbach R 2012. Mosquito taxonomic inventory.
- Hawley W a 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement* 1: 1–39.
- Hoeck PAE, Hamberg FB, Merrill SA, C M, Hagedorn HH 2003. Population and parity levels of *Aedes aegypti* collected in Tucson. *Journal of Vector Ecology* 28: 65–73.
- Hoel DF, Kline DL, Allan SA 2009. Evaluation of six mosquito traps for collection of *Aedes albopictus* and associated mosquito species in suburban setting in North Central Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association* 25: 47–57.
- Hoffman RS, Andrew TS(2005) 2005. *Sylvilagus*. In: WILSON DE, REEDER D (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, p. 2142.
- Holmes EC, Twiddy SS 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of *Dengue virus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 3: 19–28.
- IBGE IB de G e E 2013. Sabará. : <http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmu>.
- Ibanez- • Bernal S, Briseno B, Mutebi JP, Argot E, Rodriguez G, Martinez-Campos C, Paz R, San Roman PLF, Tapia-Conyer, A F 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with *Dengue virus* during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 305–309.
- Jones JW, Sithiprasasna R, Schleich S, Coleman RE 2003. Evaluation of selected traps as tools for conducting surveillance for adult *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association* 19: 148–150.

- Kao C-L, King C-C, Chao D-Y, Wu H-L, Chang G-JJ 2005. Laboratory diagnosis of *Dengue virus* infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal of microbiology, immunology, and infection* 38: 5–16.
- Knudsen AB 1995. Geographical spread of *Aedes albopictus* in Europe and the concern among public health authorities. *European Journal of Epidemiology* 11: 345–348.
- Konishi E 1989. Susceptibility of *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) collected in Miki City, Japan, to *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Filariidae). *Journal of Medical Entomology* 26: 420–424.
- Kroeckel U, Rose A, Eiras AE, Geier M 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22: 229–238.
- Krueger A, Hagen RM 2007. First record of *Aedes albopictus* in Gabon, Central Africa. *Tropical medicine & international health* 12: 1105–1107.
- Lambert AJ, Blair CD, D'Anton M, Ewing W, Harborth M, Seiferth R, Xiang J, Lanciotti RS 2010. La Crosse virus in *Aedes albopictus* mosquitoes, Texas, USA, 2009. *Emerging infectious diseases* 16: 856–858.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G, Vorndam AV 1992. Rapid Detection and Typing of *Dengue viruses* from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 545–551.
- Lima MM, Amaral RS, Aragão MB 1989. Estudo comparativo da eficácia de armadilhas para *Aedes aegypti*. *Cadernos de Saúde Pública* 5: 143–150.
- Limongi JE, Moreira FG, Peres JB, Suzuki A, Ferreira IB, Souza RP, Pinto RMC, Pereira LE 2013. Serological survey of hantavirus in rodents in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 55: 155–158.
- Lopes J 1999. Ecologia de mosquitos (Diptera , Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do norte do Paraná , Brasil . VIII . Influência das larvas predadoras (Toxorhynchites sp ., Limatus durhamii e Culex bigoti sobre a população de larvas de Cu. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 821–826.
- Lorosa ES, Faria MS, Oliveira LCM De, Alencar J, Marcondes CB 2010. Blood Meal Identification of Selected Mosquitoes in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association* 26: 18–23.
- MS M da S 2013. SINAN-Sistema de Informação de Agravos de Notificação.
- MacLean RG 1991. Arboviruses of wild birds and mammals. *Bulletin Society of Vector Ecology* 16: 3–16.

- Machado LF, Paresque, Christoff AU 2011. Anatomia comparada e morfometria de *Olygoryzomys nigripis* e *O. flavescens* (Rodentia, Sigmodontinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 51: 29–47.
- Maciel C da S 1962. Lista de Culicíneos do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*: 464–494.
- Maciel-de-Freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R 2007. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Medical and Hygiene* 76: 659–665.
- Maciel-de-Freitas R, Eiras AE, Lourenço-de-Oliveira R 2006. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 321–325.
- Maciel-de-Freitas R, Peres RC, Alves F, Brandolini MB 2008. Mosquito traps designed to capture *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females: preliminary comparison of Adultrap, MosquiTRAP and backpack aspirator efficiency in a dengue-endemic area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 602–605.
- Madeira FAM 2009. Estudo da diversidade de pequenos mamíferos da Fazendinha Izabela Hendrix, Sabará, MG. : 30.
- Magurran A 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Marcondes CB, Alencar J 2010. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Revista Biomedica* 21: 221–238.
- Marcondes CB, Tauil PL 2011. Dengue silvestre: devemos nos preocupar? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44: 263–264.
- Matos R 1999. Migração e dispersão populacional em Minas Gerais. In: *II Encontro Nacional sobre Migração*, Associação brasileira de estudos populacionais, Belo Horizonte, pp. 1–22.
- Meeraus WH, Armistead J, Arias J 2008. Field comparison of novel and gold standard traps for collecting *Aedes albopictus* in Northern Virginia. *Journal of the American Mosquito Control Association* 24: 244–248.
- Melo AS, Hepp LU 2008. Ferramentas estatísticas para análises de dados provenientes de biomonitoramento. *Oecologia Brasiliensis* 12: 463–486.
- Mendes CP, Júnior JFC 2011. Comportamento de *Guerlinguetus ingrami thomasi* 1901 (Sciuridae, Rodentia) em um fragmento de mata em Cascavel - PR. In: *X Congresso de Ecologia do Brasil*, Sociedade de Ecologia do Brasil, São Lourenço, pp. 1–3.
- Mesquita ADEO 2009. Comunidades de pequenos mamíferos em fragmentos florestais conectados por corredores de vegetação no sul de Minas Gerais. : 123.

- Miller BR, Ballinger ME 1988. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and *Dengue viruses*. *Transactions of The Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* 82: 476–477.
- Mitchell CJ 1995. The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia* 37: 109–113.
- Monath TP 1990. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM (Eds.), *Virology*, Raven Press, Ltd., New York, p. 52.
- Moncayo AC, Fernandez Z, Ortiz D, Diallo M, Sall A, Hartman S, Davis CT, Coffey L, Mathiot CC, Tesh RB, Weaver SC 2004. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. *Emerging infectious diseases* 10: 1790–1796.
- Montes J 2005. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira , São Paulo , Brasil. *Revista de Saúde Pública* 39: 578–584.
- Moraes MJ 2009. Avaliação de métodos de amostragem na captura do mosquito *Aedes (S.) aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). : 50.
- Muller G, Brum JGW, Langone PQ, Michels GH, Sinkoc AL, Ruas JL, Berne MEA, Albiventris D, By P, Loricatus I 2005. *Didelphis albiventris* Lund, 1841 parasitado por *Ixodes loricatus* Neumann, 1899 e *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) no Rio Grande do Sul. *Arq Inst Biol* 72: 319–324.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nasci RS 1981. A lightweight battery-powered aspirator for collecting mosquitoes in the field. *Mosquito News* 41: 808–811.
- Neves DP, Spinola HN 1987. O *Aedes albopictus*: outro *Aedes* nos ameaça. *Ciência Hoje* 5: 82.
- Nunes MRT, Travassos APA, Weaver SC, Tesh RB, Vasconcelos PFC 2005. Molecular Epidemiology of Group C Viruses (Bunyaviridae ,Orthobunyavirus) Isolated in the Americas. *Journal of virology* 79: 10561–10570.
- OPAS/MS 2008. *Guia dos roedores do Brasil , com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Brasília.
- Paixão KS 2007. Avaliação do controle químico de adultos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus , 1762) (Diptera : Culicidae) de Fortaleza por meio de métodos convencionais e da armadilhas BG-Sentinel e MosquiTRAP. : 119.
- Paixão KS 2011. Avaliação da resposta de adultos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera : Culicidae) ao odor de diferentes hospedeiros vertebrados e insetos co-específicos e identificação química de compostos presentes na cutícula. 1762: 135.

- Paula SO De, Fonseca BALD 2004. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *The Brazilian journal of infectious diseases* 8: 390–398.
- Peiris JS, Dittus WP, Ratnayake CB 1993. Seroepidemiology of dengue and other arboviruses in a natural population of toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. *Journal of medical primatology* 22: 240–245.
- Pessanha EJM, Caiaffa WT, Kroon EG, Augusto F, Proietti FA 2010. Dengue em três distritos sanitários de Belo Horizonte , Brasil : inquérito sorológico de base populacional , 2006 a 2007. 27: 252–258.
- Poloni TRRS 2009. Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real. : 76.
- Ponlawat A, Harrington LC 2005. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of medical entomology* 42: 844–849.
- Rao USB 1984. A rapid method for identification of mosquito blood meal. *Indian Journal Medical Research*: 836–840.
- Reeves WC 1990. Quantitative field studies on a carbon dioxide chemotropism of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6: 708–712.
- Reis NL 2006. *Mamíferos do Brasil* (NR Reis, AL Peracchi, WA Pedro, and IP Lima, Eds.). Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Reiter P, Nathan MB 2001. *Guidelines for assessing the efficacy of insecticidal space sprays for control of dengue vector Aedes aegypti*. San Juan, Porto Rico.
- Rezende HR, Virgens TMD, Liberato MA, Valente FI, Fernandes A, Urbinatti PR 2011. Aspectos ecológicos de culicídeos imaturos em larvitampas de floresta e ambiente antrópico adjacente no Município de Linhares, Espírito Santo, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 20: 385–391.
- Rezza G 2012. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. *BMC public health* 12: 72.
- Ribeiro LF, Conde LOM, Tabarelliu M 2010. Predação e remoção de sementes de cinco espécies de palmeira por *Guerlinguetus ingrami* (Thomas , 1901) em um fragmento urbano de floresta Atlântica Montana. *Revista Árvore* 34: 637–649.
- Ritchie SA, Moore P, Carruthers M, Williams CR, Montgomery B, Foley P, Ahboo S, Hurk A Van den, Lindsay M, Cooper B, Beebe N, Russel RC 2006. Discovery of a widespread infestation of *Aedes albopictus* in the Torres Strait, Australia. *Journal of American Mosquito Control Association* 22: 358–365.
- Rueda LM 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 477–487.

- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S 1967. A Plaque Reduction Test for *Dengue virus* Neutralizing Antibodies. *The Journal of Immunology* 99: 285–290.
- SES SE de S de MiG 2012. *Dengue classica em Minas Gerais ate 2012*. Belo Horizonte.
- SES 2013. Informe epidemiológico dengue 20 de setembro de 2013. : 3.
- Sabará 2013a. Prefeitura de Sabará intensifica as aoes de combate à dengue.
- Sabará 2013b. Sabará. *Prefeitura de Sabará*.
- San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, Guzmán MG 2010. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82: 128–135.
- Serufo JC, Oca HM de, Tavares V a, Souza a M, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira M a, Nogueira RM, Schatzmayr HG 1993. Isolation of *Dengue virus* type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88: 503–504.
- Service MW 1993a. *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods*. Wiley, New York.
- Service MW 1993b. Importance of ecology in *Aedes aegypti* control: a review. *Southeast Asean Journal Medical Public Health* 23: 681–690.
- Shroyer DA 1986. *Aedes albopictus* and arboviruses: a concise review of the literature. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2: 424–428.
- Silva S, Acel AM, Guimarães A 2008. Encontro de larvas de *Anopheles (Nyssorhynchus) argyritarsis* em criadouros artificiais no Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 313–314.
- Silva a M, Dittus WP, Amerasinghe PH, Amerasinghe FP 1999. Serologic evidence for an epizootic *Dengue virus* infecting toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 60: 300–306.
- Silva IM, Eiras AE, Kline DL, Bernier U 2005. laboratory evaluation of mosquito traps baited with a synhytetic human odor blend to capture *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23: 229–233.
- Silva RF, Neves DP 1989. Os mosquitos (Diptera: Culicidae) do campus ecológico da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 501–503.
- Silva JDS, Pacheco JB, Alencar J, Guimarães AE 2010. Biodiversity and influence of climatic factors on mosquitoes (Diptera: Culicidae) around the Peixe Angical hydroelectric

- scheme in the state of Tocantins, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105: 155–162.
- Simmons JS, John JH, Reynolds FHK 1931. Experimental studies of dengue. *Science* 44: 1–251.
- Siqueira JB, Maria C, Martelli T, Coelho GE, Cristina A, Hatch DL 2005. Dengue and Dengue Hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerging infectious diseases* 11: 48–53.
- Sudia WD, Chamberlain RW 1962. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquito News* 22: 126–129.
- Tauil PL 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cadernos de Saúde Pública* 17: 99–102.
- Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 1999. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue Epidemiology and Preventive Measures of Dengue. *IESUS* 8: 5–33.
- Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Mota E 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil : what research is needed based on trends , surveillance , and control experiences? *Cadernos de Saúde Pública* 21: 1307–1315.
- Thoisy B de, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán J, Colón C, Mauffrey J-F, Delaval M, Catzeflis F, Kazanji M, Matheus S, Dussart P, Morvan J, Setién AA, Deparis X, Lavergne A 2009. Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector borne and zoonotic diseases* 9: 157–170.
- Thoisy BD, Dussart P, Kazanji M 2004. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever , dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Transactions of The Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* 98: 409–412.
- Tran TNT, Vries PJ de, Hoang LP, Phan GT, Le HQ, Tran BQ, Vo CMT, Nguyen NV, Kager P a, Nagelkerke N, Groen J 2006. Enzyme-linked immunoassay for *Dengue virus* IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood. *BMC infectious diseases* 6: 13.
- Umetsu F, Pardini R 2006. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats—evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. *Landscape Ecology* 22: 517–530.
- Urbinatti PR, Sendacz S, Natal D 2001. Imaturos de mosquitos (Diptera : Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. *Revista de Saúde Pública* 35: 461–466.
- Urdaneta L, Herrera F, Zoghbi N, Jimenez M, Salcedo M 2004. Detection of *Dengue viruses* in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in Maracay , Aragua state , Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infection, Genetics and Evolution* 6: 1–8.

- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman a L, Ennis F a, Nisalak a 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases* 181: 2–9.
- Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux A-B 2010. Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS neglected tropical diseases* 4: e706.
- Vilela APP, Figueiredo LB, Santos JR dos, Eiras AE, Bonjardim C a, Ferreira PCP, Kroon EG 2010. *Dengue virus* 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerging infectious diseases* 16: 989–992.
- WHO 1985. *Arthropod-borne and rodent-borne viral disease*. Geneva, Switzerland.
- WHO WHO 2007. *Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses*. Geneva, Switzerland.
- WHO WHO 2009. *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Paris, France.
- WRBU 2013. Vector maps.
- Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, Ballesteros G, Pierro AM, Gaibani P, Guo FP, Sambri V, Balmaseda A, Karunaratne K, Harris E, Pinsky BA 2013. Single-Reaction , Multiplex , Real-Time RT-PCR for the Detection , Quantitation , and Serotyping of *Dengue viruses*. *PLoS neglected tropical diseases* 7: 1–9.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR 2007. Prospects for a *Dengue virus* vaccine. *Nature* 5: 518–529.
- Williams CR, Long SA, Russel RC, Ritchie SA 2006. Field efficacy of the BG-Sentinel compared with CDC Backpack aspirators and C)2-baited EVS traps for collecting of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22: 296–300.
- Xue R, Doyle MA, Kline DL 2008. Field evaluation of CDC and Mosquito Magnet X Traps baited with dry ice, CO₂ sachet, and octenol against mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 24: 249–252.