

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

Shayenne Olsson Freitas Silva

**TAXOCENOSE DE *HAEMAGOGUS* (DIPTERA: CULICIDAE) E
INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DE *FLAVIVÍRUS* EM ÁREAS DE
MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Tese apresentada à coordenação do

Programa de Pós-Graduação em Medicina

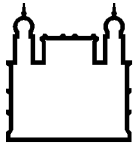
Tropical do Instituto Oswaldo Cruz

Orientador: Dr. Jeronimo A. F. Alencar

Co-orientadora: Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz

Rio de Janeiro

2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Shayenne Olsson Freitas Silva

Taxocenose de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) e investigação da circulação de *Flavivírus* em áreas de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Medicina Tropical

Orientadore: Dr. Jeronimo A. F. Alencar

Co-orientadora: Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2022

Olsson Freitas Silva, Shayenne .

Taxocenose de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) e investigação da circulação de *Flavivírus* em áreas de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Shayenne Olsson Freitas Silva. - Rio de Janeiro, 2022.
84 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

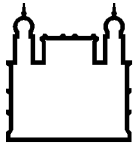
Orientador: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar.

Co-orientadora: Ana Cecília Ribeiro Cruz.

Bibliografia: f. 58-73

1. Culicídeos. 2. Febre Amarela. 3. *Haemagogus*. 4. Mata Atlântica. 5. vetor. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: SHAYENNE OLSSON FREITAS SILVA

**TAXOCENOSE DE *HAEMAGOGUS* (DIPTERA: CULICIDAE) E
INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DE *FLAVIVÍRUS* EM ÁREAS
DE MATA ATLÂNTICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO,
BRASIL**

ORIENTADOR: Dr. Jeronimo A. F. Alencar

CO-ORIENTADORA: Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz

Aprovada em: 12 / 12 / 2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr. José Bento Pereira Lima - Presidente (FIOCRUZ)

Prof. Dra. Rosemary Roque (INPA)

Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz (FIOCRUZ)

Prof. Dra. Renata Campos Azevedo (UFRJ)

Prof. Dra. Verônica Marchon da Silva (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, de 2022

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência cada dia é a preparação do nosso próprio amanhã.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

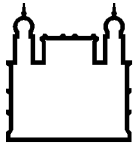
Ao meu orientador Prof. Dr. Jeronimo A. F. Alencar pela atenção, paciência, amparo, apoio e auxílio durante todo o processo de realização do estudo e por garantir os recursos e a infraestrutura necessários para a condução e conclusão do projeto.

À Esdras Matheus Gomes da Silva pelo incentivo, suporte emocional em momentos difíceis e por acreditar na minha capacidade de evolução dentro do meio acadêmico.

À minha família pelo apoio emocional e financeiro, por sempre acreditarem em mim, e no meu potencial até nos momentos em que eu mesma duvidei, por se preocuparem com a minha saúde física e emocional durante momentos em que precisei de amparo, proteção e carinho.

A todos do laboratório de Diptera do Instituto Oswaldo Cruz, em especial à Cecília Ferreira de Mello que me auxiliou em momentos de dúvida, à Juan Augusto Rodrigues dos Campos pelo esforço durante a coleta do material e manutenção de palhetas, larvas e espécimes adultos de culicídeos, apoio emocional, amizade e companheirismo. Ao Paulo José Leite pelo auxílio, esforço e suporte nas coletas de campo.

Ao Laboratório de Análise Viral da Universidade Federal do Rio de Janeiro em especial à professora Helena Keiko Toma por garantir os recursos e infraestrutura para a análise e detecção viral em culicídeos. Ao professor Sérgio Lisboa Machado por me instruir e me auxiliar com muita paciência, bom humor e boa vontade na extração de RNA de amostras de mosquitos e realização do PCR para detecção de arbovírus.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

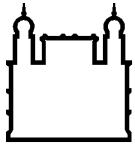
Taxocenose de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) e investigação da circulação de *Flavivírus* em áreas de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Shayenne Olsson Freitas Silva

Arboviroses como a Febre Amarela, Zika, Dengue, e Chikungunya são consideradas um importante problema de saúde pública. Dentro deste contexto estudos envolvendo mosquitos vetores destes arbovírus, como os do gênero *Haemagogus* sp. e *Aedes* sp. são de primordial importância. O estudo tem como objetivo conhecer aspectos da biologia e da ecologia de espécies de importância médica, com ênfase no gênero *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) e realizar uma investigação de *Flavivírus* circulantes em remanescentes de Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os fragmentos de Mata Atlântica estudados foram: Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João (APA - BRSJ); Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPNG); Figueira Branca (FB) e Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO). As coletas foram realizadas entre os anos de 2018 a 2021 com o uso de ovitrampas, para a coleta de imaturos, armadilhas luminosas CDC com CO₂, armadilha de Shannon, e busca ativa para a captura de adultos. Foram realizadas análises de índices ecológicos, influência dos fatores climáticos na abundância de culicídeos e pesquisa de arbovírus através da extração de RNA viral. Foram encontradas espécies de mosquitos transmissoras de arbovírus em todos os remanescentes de Mata Atlântica analisados, incluindo *Haemagogus leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. albopictus* e *Ae. terrens*. As espécies mais encontradas em FB foram: *Hg. leucocelaenus* e *Ae. terrens*. Na APA – BRSJ *Hg. leucocelaenus* foi a espécie mais abundante no verão e inverno, enquanto *Ae. terrens* foi mais abundante na primavera e *Ae. albopictus* no outono. No PNSO as trilhas com maior número de ovos de culicídeos coletados foram Mozart Catão e Santa Helena. Na RPPNG e em FB a espécie *Hg. leucocelaenus* foi observada compartilhando o mesmo criadouro com as demais espécies de importância médica: *Hg. janthinomys*, *Ae. terrens*, e *Ae. albopictus*. Todas as espécies que realizaram oviposição na mesma paleta foram positivamente correlacionadas, com a exceção de *Hg. janthinomys* e *Ae. albopictus*. A influência da sazonalidade no número de ovos foi significativa em todas as áreas de coleta. *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus* foram positivos para ZIKV e YFV na cidade de Casimiro de Abreu.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

***Haemagogus* Taxocenosis (Diptera: Culicidae) and investigation of *Flavivirus* circulation in Atlantic Forest Areas in the state of Rio de Janeiro, Brazil**

ABSTRACT

PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Yellow Fever, Zika, Dengue, and Chikungunya are a burden on the population and on the health systems. Thus, studies involving mosquito vectors of arboviruses, such as *Haemagogus* sp. and *Aedes* sp. are of considerable importance. The study aims to understand aspects of the biology and ecology of species of medical importance, with emphasis on the genus *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) and also carry out an investigation of Flaviviruses circulating in Atlantic Forest remnants in the state of Rio de Janeiro, Brazil. The Atlantic Forest fragments studied were: Environmental Protection Area of the São João River Basin (APA - BRSJ); Gaviões Natural Heritage Private Reserve (RPPNG); Figueira Branca (FB) e Serra dos Órgãos National Park (PNSO). The collection period was between the years of 2018 to 2021. Samples were attained with the use of ovitraps, for the collection of immatures, CDC traps with CO₂, Shannon, and active search for adult captures. In this study we have carried out analyzes of ecological indices, evaluated the influence of climatic factors on the abundance of Culicidae and searched for arbovirus in culicidae vector species through RNA extraction. Arbovirus-transmitting mosquito species were found in all Atlantic Forest fragments analyzed, included *Haemagogus leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. albopictus* and *Ae. terrens*. The most common species in FB were: *Hg. leucocelaenus* and *Ae. terrens*. At APA – BRSJ *Hg. leucocelaenus* was the most abundant species in summer and winter while *Ae. terrens* was more abundant in spring and *Ae. albopictus* in the fall. At the PNSO the trails with the highest number of Culicidae eggs collected were Mozart Catão e Santa Helena. At RPPNG and at FB the species *Hg. leucocelaenus* was observed sharing the same breeding site with other species of medical importance: *Hg. janthinomys*, *Ae. terrens*, and *Ae. albopictus*. All species that oviposited on the same palette were positively correlated, with the exception of *Hg. janthinomys* and *Ae. albopictus*. There was a significant influence of seasonality on the number of mosquito eggs in all collection areas. *Ae. albopictus* and *Hg. leucocelaenus*, were positive for ZIKV and YFV in the city Casimiro de Abreu.

ÍNDICE

RESUMO

Agradecimentos	v
Índice de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Lista de siglas e abreviaturas	xiii
Lista de anexos	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Culicídeos	1
1.1.1 Culicídeos de importância epidemiológica	3
1.1.2 Mosquitos vetores do gênero <i>Haemagogus</i>	5
1.2 Arboviroses	8
1.2.1 Arbovírus	8
1.2.2 Flavivírus	9
1.2.3 Febre Amarela	9
1.3 Fragmentação florestal na Mata Atlântica	12
1.4 Justificativa	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Declaração de ética	16
3.2 Áreas de Estudo	16
3.3 Coleta de ovos e criação em laboratório	17
3.4 Coleta dos espécimes adultos e criação em laboratório	19
3.5 Estudo morfológico das formas imaturas	20
3.6 Estudo morfológico dos adultos	20
3.6.1 Processamento dos mosquitos	20
3.7 Extração de RNA	21
3.7.1 PCR para Flavivírus	21
3.7.2 Sequenciamento de Nucleotídeos.....	22

3.8	Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João.....	23
3.8.1	Distribuição das armadilhas para a coleta de imaturos	24
3.8.2	Análise de dados	25
3.9	Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO)	26
3.9.1	Coleta de culicídeos imaturos.....	27
3.9.2	Análise de dados.....	27
3.10	Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões).....	27
3.10.1	Coleta de culicídeos imaturos.....	29
3.10.2	Análise de dados.....	29
3.11	A Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca	30
3.11.1	Período e metodologia de coleta de culicídeos imaturos.....	31
3.11.2	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João.....	32
4.2	Parque Nacional Serra dos Órgãos (PNSO).....	35
4.3	Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões).....	38
4.4	A Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca	43
4.5	Detecção Viral em culicídeos de importância médica coletados em fragmentos de Mata Atlântica	49
5	DISCUSSÃO	50
5.1	Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João.....	50
5.2	Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO)	52
5.3	Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões).....	53
5.4	A Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca	54
6	CONCLUSÕES	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do mosquito.	2
Figura 2. Mapa da distribuição das espécies <i>Hg. janthinomys</i> e <i>Hg. leucocelaenus</i>	6
Figura 3. Ciclos de Transmissão do vírus da FA.....	11
Figura 4. Mapa dos Municípios das áreas de coleta do estudo.....	16
Figura 5. Armadilha do tipo ovitrampa.	17
Figura 6. Representação esquemática da metodologia de coleta de imaturos.....	18
Figura 7. Representação esquemática do fluxo da metodologia de coleta de adultos....	19
Figura 8. Representação esquemática do fluxo da metodologia de extração de RNA viral.....	22
Figura 9. Pontos de amostragem da Área de proteção ambiental da Bacia do Rio São João, município de Silva Jardim, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	23
Figura 10. Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Entre os municípios de Magé, Teresópolis, Guapimirim e Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil.	26
Figura 11. Pontos de amostragem da Área de Proteção Ambiental SANA, município de Macaé no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	28
Figura 12. Pontos de amostragem da Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca, localizado no município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	30
Figura 13. Análise de cluster (índice de Bray-Curtis).....	33
Figura 14. análise de correspondência canônica (CCA) de espécies de mosquitos e variáveis climáticas.....	34
Figura 15. Abundância de mosquitos na área do PNSO por trilha e por estação chuvosa e seca, município de Teresópolis, estado do Rio de Janeiro.....	35
Figura 16. Correlação da temperatura e pluviosidade com o número de ovos no PNSO.	36
Figura 17. Ovos por copa e solo e por altura no PNSO.....	37
Figura 18. Abundância de ovos no período chuvoso e seco na RPPN Gaviões.....	38
Figura 19. Média e desvio padrão do número de ovos eclodidos e não eclodidos coletados nos períodos de chuva e seco na localidade da RPPN Gaviões.	39
Figura 20. Espécies de importância médica e abundância de mosquitos ao longo período de coleta na RPPN Gaviões.	40

Figura 21. Frequência de espécies de importância médica coletados de setembro de 2019 a janeiro de 2021 na área da RPPN Gaviões.	41
Figura 22. Correlação de espécies de importância médica na RPPN Gaviões.....	42
Figura 23. Abundância de ovos durante o período de coleta em Figueira Branca.....	45
Figura 24. Análise de Regressão do número de ovos e variáveis ambientais. Variáveis ambientais chuva (A), temperatura (B) e umidade relativa do ar (C).	46
Figura 25. Média e desvio padrão dos ovos por ovitrampa (A), razão macho/fêmea (B).	47
Figura 26. Índice de correlação de Spearman entre espécies de mosquitos de importância epidemiológica.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização dos pontos amostrais na Área de Proteção Ambiental Bacia do Rio São João, Silva Jardim, RJ, Brasil.	24
Tabela 2. Pontos de amostragem na Área de Proteção Ambiental Sana da Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões), Rio de Janeiro, Brasil.	28
Tabela 3. Índices ecológicos de mosquitos por estação na APA Bacia do Rio São João, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. Coletadas entre julho de 2018 a junho de 2019.	33
Tabela 4. Índices descritivos de coleta de ovos na Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca, localizado no município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil.	44
Tabela 5. Amostras de culicídeos positivas para <i>Flavivírus</i> em diferentes fragmentos de Mata Atlântica no Rio de Janeiro, Brasil.	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APA – Área de Proteção Ambiental

FA – Febre Amarela

FAS – Febre Amarela Silvestre

cDNA – Ácido desoxiribonucleico complementar

CHIKV – Chikungunya vírus

CO₂ – Gás carbônico

DENV – Dengue vírus

DNA – Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

JEV – Japanese encephalitis virus/ Vírus da Encefalite Japonesa

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Open reading frame

PCR – Polymerase Chain Reaction

pH – Potencial hidrogeniônico

PNSO – Parque Nacional da Serra dos Órgãos

RJ – Estado do Rio de Janeiro

RNA – Ácido Ribonucleico

RNase – Ribonuclease

RPPN – Reserva Particular do Patrimônio Natural

RT-PCR – Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction / Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase

TAE – Tampão tris-acetato-EDTA

TBE – Tris-borato-EDTA

UTR – Untranslated region

WHO – World Health Organization / Organização Mundial da Saúde

WNV – West Nile virus / Vírus do Nilo Ocidental

YFV – Yellow fever virus/ Vírus da Febre Amarela

ZIKV – Zika virus / Zika vírus

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	74
Autorização para atividades com finalidade científica 68206-1	
Anexo B	76
Licença permanente para coleta de material biológico 34911-2	
Anexo C	78
Autorização para atividades com Finalidade científica 44333-3	
Anexo D	80
Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil	
Anexo E	81
Interaction of <i>Haemagogus leucocelaenus</i> (Diptera: Culicidae) and other Mosquito Vectors in a Forested Area, Rio de Janeiro, Brazil	
Anexo F	82
Report of mosquito vectors of arboviruses from a federal conservation unit in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, Brazil	
Anexo G	83
Occurrence of the sylvatic yellow fever vector mosquito <i>Haemagogus leucocelaenus</i> (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment of the touristic State of Rio de Janeiro, Brazil	
Anexo H	84
Sexual proportion and egg hatching of vector mosquitos in an Atlantic Forest fragment with incidence of yellow fever in Rio de Janeiro, Brazil.	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Culicídeos

Os culicídeos são dípteros (do grego: di = dois; ptera = asa), uma vasta ordem de insetos holometábolos, com número de indivíduos e de espécies presentes em abundância por praticamente todos os lugares do mundo [1,2]. Distinguem-se dos demais insetos alados por possuírem apenas um par de asas transparentes e funcionais, equivalente ao par anterior das outras ordens. No local anatômico do par posterior de asas há estruturas conhecidas como halteres, as quais possuem tamanho reduzido e auxiliam no equilíbrio do inseto durante o voo [3,4]. Pertencem a subordem Nematocera (caracterizados por antenas longas, usualmente com mais de seis segmentos), da família Culicidae (do latim culex = mosquito), existem 3.549 espécies de mosquitos reconhecidas distribuídas em aproximadamente 112 gêneros [5], ou 42 gêneros de acordo com a classificação mais tradicional de Wilkerson et al. (2015) [6]. A região Neotropical detém o maior nível de endemidade, com 27% das espécies restritas a esta região biogeográfica [7].

Os mosquitos podem ser conhecidos popularmente como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. São insetos com desenvolvimento holometábolo, o que significa que passam pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto [8] (Figura 1).

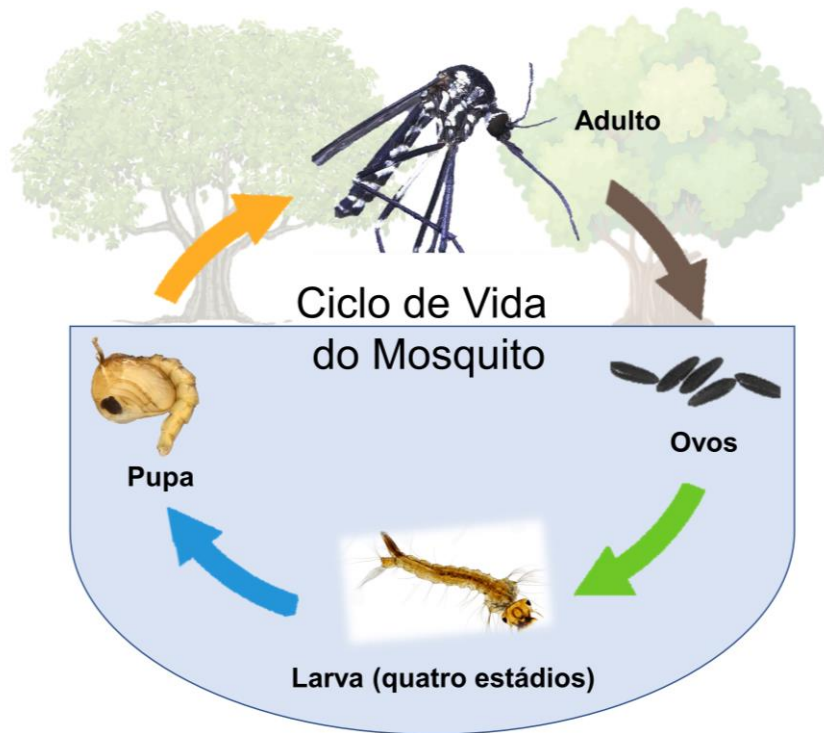


Figura 1. Ciclo biológico do mosquito.

Demonstrando as fases do desenvolvimento holometábolo de ovo, larva, pupa e adulto. As formas imaturas se desenvolvem em ambiente aquático e o adulto é terrestre. Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022.

As fases imaturas dos culicídeos são aquáticas e seus ovos são alongados, elípticos ou ovais, muitas vezes com um dos lados achatado, plano ou até mesmo côncavo. Ovos recém-postos de mosquitos são brancos, flexíveis e extremamente permeáveis [9]. O enrijecimento e o escurecimento dos ovos estão relacionados com a esclerotização e a melanização das camadas que o revestem, especificamente o endocóxon, isso ocorre ao longo das primeiras 3 a 4 horas de desenvolvimento embrionário [10]. Dependendo do gênero de mosquito, seus ovos podem ser colocados: isoladamente ou em conjuntos, tanto diretamente sobre a superfície da água quanto na face inferior de substratos flutuantes (ex: plantas aquáticas) ou em um local úmido próximo a água. Nos ovos de anofelíneos existem projeções denominadas flutuadores, gomos ocos que impedem a submersão dos ovos [8]. As larvas de culicídeos distinguem-se de outros insetos aquáticos pela ausência de pernas, presença de uma cabeça distinta com escovas e antenas no aparelho bucal, tórax bulboso mais largo que a cabeça e que o abdômen, papilas anais posteriores e um par de aberturas respiratórias (subfamília *Anophelinae*) ou um sifão alongado (subfamília *Culicinae*) localizado próximo ao final do abdômen [11]. Apesar de aquáticas, as larvas de mosquitos

respiram o oxigênio do ar por meio do sifão respiratório, para isso vão à superfície da água ou ligam-se ao aerênquima de plantas aquáticas através de um sifão respiratório adaptado, como no caso de *Mansonia*. As larvas que não possuem sifão respiratório (*Anophelinae*) se posicionam horizontalmente na superfície da água e respiram por meio de cerdas adaptadas. As larvas de culicídeos se alimentam de matéria orgânica dissolvida e de microorganismos presentes no criadouro, como por exemplo: bactérias e esporos de fungos [1,12–14]. A pupa praticamente não se alimenta e permanece na superfície da água afim de facilitar a saída do inseto adulto [15]. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas, e são facilmente reconhecidos por sua probóscide prolongada e pela presença de escamas na maior parte do corpo [8].

A escolha dos locais de oviposição é um fator crítico para a sobrevivência e dinâmica populacional de culicídeos, os criadouros na natureza incluem uma ampla variedade de ambientes aquáticos disponíveis. Criadouros naturais considerados transitórios incluem inundações, várzeas, tocas de animais, cocos, conchas e folhas caídas. Existem também os criadouros permanentes ou semipermanentes, como por exemplo: entrenós de bambu e bromélias. Criadouros artificiais são formados através da ação antrópica ou de animais domésticos e compreendem recipientes urbanos artificiais que podem reter e acumular água, como: latas, vidros, pneus, barris, tanques, caixa d'água, esgotos dentre outros [3]. O maior nível de endemicidade desses artrópodes é encontrado na região neotropical (América Central, Antilhas e América do Sul) onde o clima é favorável para a sua proliferação [16].

1.1.1 Culicídeos de importância epidemiológica

O mosquito é considerado um dos seres mais mortais do mundo, sendo responsável por causar milhões de mortes todos os anos [17]. A associação da transmissão de parasitoses aos culicídeos teve início no século XIX, com os primeiros registros feitos por Patrick Manson em 1877, com a comprovação da transmissão de filarias. No mesmo ano, Lewis confirmou essa ideia, ao demonstrar que a *Filaria sanguinis hominis* (Mastim 1888) (nematódeo causador da elefantíase) se desenvolvia na espécie *Culex fatigans* (Wiedemann, 1828), mosquito de coloração marrom que coloca seus ovos aderidos uns aos outros [18,19].

A subfamília *Anophelinae* contém o gênero *Anopheles* Meigen, 1818 o qual apresenta as espécies transmissoras do protozoário causador da malária [20]. A

transmissão ocorre através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, normalmente ao crepúsculo e à noite [21–23]. Mesmo que evitável e tratável, a malária continua a ter um impacto devastador na saúde e subsistência das pessoas no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2020 foram estimados 241 milhões de casos de malária em 85 países, no Brasil, no ano de 2020, foram notificados 145.205 e em 2021, foram registrados 139.211 casos dessa enfermidade [24]. Entre os meses de janeiro a agosto de 2022 os casos positivos para malária na Região Amazônica apresentaram uma queda de 74% nos povos indígenas, segundo o Sivep-Malária, sistema de informação que faz a vigilância epidemiológica no país [25]. Algumas espécies merecem destaque do ponto de vista epidemiológico. São elas: *Anopheles darlingi* Root, 1926, *Anopheles albitarsis* Lynch Arribálzaga, 1878, *Anopheles aquasalis* Curry, 1932, *Anopheles cruzii*, Dyar & Knab, 1908, *Anopheles bellator* Dyar & Knab, 1906, e *Anopheles gambiae* Giles, 1902, sendo *An. darlingi*, uma das maiores responsáveis pela transmissão do agente etiológico dessa enfermidade no território brasileiro [26,27]. A maioria dos casos de malária se concentra na região Amazônica, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins [28].

A subfamília Culicinae engloba os principais gêneros transmissores de arboviroses, dentre estes encontram-se os gêneros *Aedes* Meigen, 1818, *Haemagogus* Williston, 1896, *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827 e *Culex* Linnaeus, 1758. Mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, em especial *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, são os principais transmissores dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya. *Aedes albopictus* Skuse, 1894, aparece como vetor potencial ou secundário do agente etiológico dessas doenças. O papel do *Ae. albopictus* na transmissão do vírus da Dengue (DENV) foi reconhecido pela primeira vez na Ásia tropical, onde uma doença clinicamente compatível com o DENV foi relatada antes da introdução do *Ae. aegypti* em meados do século XIX [29]. *Aedes aegypti*, o principal vetor da dengue nas Américas (observe a exceção no Havaí, 2001-2002), foi introduzido no Hemisfério Ocidental através de navios negreiros provenientes da África Ocidental nos séculos XV ao XVII [30].

Segundo o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde de semanas epidemiológicas 1 a 7 (02/01/2022 a 19/02/2022) de 2022, a Região Centro-Oeste do Brasil apresentou a maior incidência de dengue, com as maiores taxas nos estados: Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Em relação a Chikungunya e Zika a maior incidência foi observada na Região Nordeste [31].

1.1.2 Mosquitos vetores do gênero *Haemagogus*

Algumas espécies de mosquitos do gênero *Haemagogus* são considerados de importância epidemiológica por serem vetores do vírus da Febre Amarela (FA), tornando-se os principais responsáveis pela manutenção do ciclo natural dessa zoonose [32]. Culicídeos desse gênero apresentam cores brilhantes similar aos da tribo Sabethini, porém se distinguem destes pela ausência de cerdas pré-espíriculares. Espécies do gênero *Haemagogus* se diferenciam dos demais mosquitos neotropicais da tribo Aedini devido a cobertura intensa do seu tórax por escamas de reflexos metálicos de tonalidade azulada, violácea, esverdeada e/ou prateada [3,33].

O gênero *Haemagogus* spp. se restringe ao Novo Mundo (hemisfério ocidental) e praticamente todas as espécies são neotropicais [33]. A distribuição deste gênero é centralizada na região da América central, norte da América do Sul e ilhas adjacentes, onde 19 das 28 espécies ocorrem. Nove destas espécies são consideradas vetores potenciais da Febre Amarela Silvestre (FAS) e podem ser encontradas no Brasil, cinco destas destacam-se pela eficiência na transmissão: *Haemagogus albomaculatus* (Theobald, 1903), *Hg. leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924), *Hg. spegazzini* (Bréthes, 1912), *Hg. capricornii* (Lutz, 1904) e *Hg. janthinomys* (Dyar, 1921). De acordo com o Sistema Global de Informação sobre Biodiversidade (GBIF), existem 2.954 registros de ocorrência da espécie *Hg. janthinomys* e 1.223 registros de ocorrência da espécie *Hg. leucocelaenus* no mundo (Figura 2) [34].

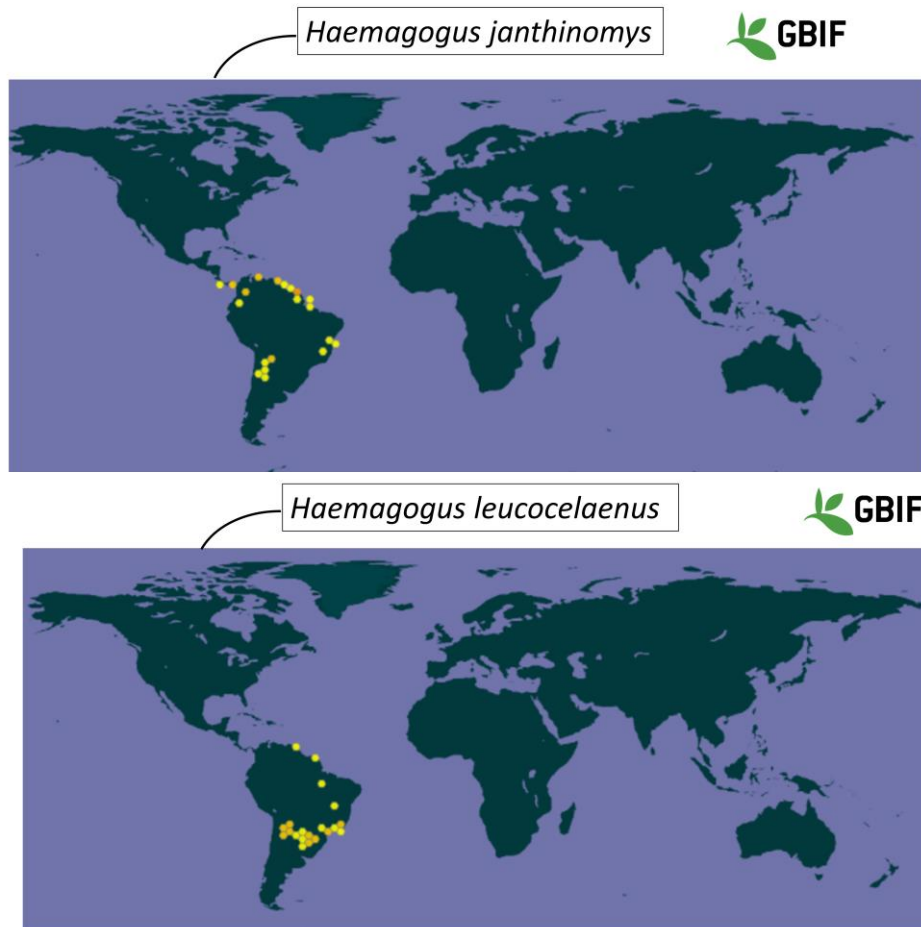


Figura 2. Mapa da distribuição das espécies *Hg. janthinomys* e *Hg. leucocelaenus*.

Fonte: Sistema Global de Informação sobre Biodiversidade (GBIF).

Segundo Kumm e Cerqueira (1951), mosquitos do gênero *Haemagogus* já foram notificados em 147 localidades do Brasil [35]. De acordo com esse estudo a espécie mais abundante e com maior distribuição no Brasil é *Hg. spegazzinii*, a qual já foi colocada em sinonímia com *Hg. capricornii* [3]. Uma revisão desse gênero feita em 2010 por Marcondes e Alencar, relata que a espécie *Hg. leucocelaenus* também é amplamente distribuída no território brasileiro, sendo reportada em 21 dos 26 estados do país, são eles: Goiás, Rio de Janeiro, Mato Grosso, São Paulo, Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Minas Gerais, Pará, Paraná, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins [32]. Outros estudos científicos relatam a presença dessa espécie no Rio Grande do Sul [36] Ainda não tendo sido reportada em Roraima, Maranhão, Piauí e Rondônia.

Mosquitos pertencentes a esse gênero possuem hábitos diurnos, são silvestres e acrodendrófilos, ou seja, habitam mais frequentemente a copa das árvores [32,36]. Seus

criadouros se constituem em uma variedade de ambientes aquáticos disponíveis. Nas florestas e áreas de mata, criadouros naturais transitórios incluem inundações, planícies aluviais, tocas de animais, árvores derrubadas ou ocas, bambus, cocos, conchas e folhas caídas. Existem também criadouros permanentes ou semipermanentes, como entrenós de bambu e bromélias [3,37]. A espécie *Hg. leucocelaenus* demonstra uma preferência por colocar seus ovos nos estratos mais altos da floresta, apresentando uma maior frequência em criadouros acima do nível do solo [38,39].

Muito provavelmente o comportamento de colocar seus ovos em alturas elevadas está associado ao hábito primatófílico (realizar repasto sanguíneo em primatas não humanos) desse gênero, contudo algumas espécies, como *Hg. leucocelaenus* são ecléticas podendo se alimentar tanto de primatas não humanos, nas copas das árvores, quanto de humanos ao nível do solo [40,41]. Alguns macacos dos quais esses mosquitos se alimentam e que já foram reportados infectados com o vírus da Febre Amarela incluem: Bugios (*Alouatta guarita*), macacos prego (*Supajus nigritus*), sauás (*Callicebus personatus*) e *Callitrix* sp. [42]. Sempre importante ressaltar que os macacos sofrem com a doença, por mais que sejam hospedeiros isso não justifica a violência que esses animais sofrem, por vezes vítimas de envenenamento. Matar esses animais é um crime ambiental e dificulta o controle da doença, uma vez que o desaparecimento desses mamíferos gera um desequilíbrio ambiental e faz com que os mosquitos transmissores do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, comecem a voar mais baixo e procurar uma fonte alternativa de alimentação. Desta maneira, pessoas que entram nas matas para atividades de trabalho e lazer ficam mais sujeitas a picadas [43]. *Haemagogus* spp. não parecem precisar de mais de um repasto sanguíneo para amadurecer cada lote de ovos (concordância gonotrópica), como observado na espécie *Hg. janthinomys* [44].

Ovos de *Haemagogus* spp. são colocados, isoladamente, em substratos úmidos próximos a superfície da água e costumam ser resistentes à dessecação. Os ovos podem passar por uma suspensão temporária da eclosão após o término do desenvolvimento embrionário, conhecida como diapausa. Isso costuma ocorrer de maneira natural em mosquitos que possuem o hábito de realizar a oviposição fora da água [8]. O número de imersões necessárias para a eclosão de ovos de *Haemagogus* spp. varia de apenas uma até 37 imersões [45].

1.2 Arboviroses

O caráter imprevisível das arboviroses característico de doenças infecciosas, é uma peculiaridade que às distingue das demais doenças humanas. Possuem rápida disseminação global e estão diretamente relacionadas com o meio ambiente e o comportamento humano. Por outro lado, são amplamente estudadas o que as torna passíveis de prevenção e erradicação. A maioria dos patógenos responsáveis por doenças infecciosas humanas tem origem zoonótica (em ambientes de floresta) e são mantidos em ciclos de transmissão dentro das matas, envolvendo vetores e animais silvestres [46,47]. As arboviroses são enfermidades que tem como agente etiológico vírus que se multiplicam nos tecidos de artrópodes hematófagos vetores.

1.2.1 Arbovírus

Estes vírus encontrados em artrópodes vetores são conhecidos como arbovírus (arthropod-borne virus) os quais para serem classificados desta forma devem ser capazes de: infectar vertebrados e invertebrados, iniciar uma infecção produtiva e ser persistente na glândula salivar do invertebrado, iniciar uma viremia em um hospedeiro vertebrado por tempo e títulos suficientes para permitir a infecção do vetor invertebrado. Esses vírus possuem uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo vertebrados (mamíferos, aves, anfíbios, répteis) e invertebrados (mosquitos, carrapatos) [48]. Existem cerca de 545 espécies de arbovírus registradas, das quais, estimam-se que mais de 150 estão relacionadas a doenças que acometem os seres humanos [49].

A transmissão deste patógeno ocorre através da picada de insetos infectados em hospedeiros vertebrados susceptíveis [8]. Os artrópodes vetores de arbovírus estão distribuídos entre os seguintes grupos: Arachnida (Acarina: Ixodidae: Acari) ácaros, a classe Insecta e ordem Diptera nas quais encontram-se quatro principais famílias: Culicidae conhecidos com mosquitos, Ceratopogonidae popularmente chamados de mosquito-pólvora ou maruim, Psychodidae também denominados de mosquitos-palha/flebótomos e Simuliidae chamados de borrachudos ou pium (região norte) [50–53].

Os arbovírus têm sido motivo de grande preocupação em saúde pública ao redor do mundo, sendo os vírus mais importantes para a saúde humana transmitidos por culicídeos [54]. Esses vírus podem ser classificados nas seguintes famílias virais:

Flaviviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Reoviridae, Togaviridae e ordem Bunyavirales [55]. De acordo com inquéritos sorológicos, isolamentos virais e análises moleculares, os arbovírus de maior importância médica e veterinária estão distribuídos entre as famílias Togaviridae, Flaviviridae e a ordem Bunyavirales [56].

Dentre as principais arboviroses que acometem o Brasil estão a Dengue, Chikungunya, Zika e a Febre Amarela (FA), as quais estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública [31]. Segundo a Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016 a FA tem periodicidade de notificação classificada como imediata (de até 24 horas) para o Ministério da Saúde (MS), Secretaria Estadual de Saúde (SES) e para a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) [57].

1.2.2 *Flavivírus*

O gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, compreende grande parte dos arbovírus patogênicos aos seres humanos, impactando diretamente a saúde pública ao redor do mundo [58]. Dentre eles encontram-se os vírus da Febre Amarela (YFV), Encefalite Japonesa (JEV), Nilo Ocidental (WNV), Dengue (DENV-1 a DENV-4) e Zika (ZIKV). O ciclo de vida destes *Flavivírus* é mantido pela picada de artrópodes vetores em hospedeiros vertebrados amplificadores/reservatórios [59]. O genoma dos *Flavivírus* é formado por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, contendo aproximadamente 11Kb. Este possui uma única sequência aberta de leitura (open reading frame – ORF), flanqueado por duas regiões não codificantes (untranslated region – UTR), as quais são importantes para a regulação e expressão do vírus [60].

1.2.3 *Febre Amarela*

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa, não-contagiosa, febril, ocasionada por um vírus do gênero *Flavivirus* (do latim flavus =amarelo), família Flaviviridae, o qual é transmitido aos seres humanos, e outros vertebrados suscetíveis, por meio da picada de fêmeas de mosquitos vetores [61]. O continente Africano responsabiliza-se por mais de 90% dos casos de FA anualmente notificados à OMS. Estima-se que o vírus da FA cause 200.000 casos da doença e 30.000 mortes por ano [62]. Este vírus é endêmico nas áreas tropicais da África e América Central e do Sul [63]. A primeira epidemia de FA descrita no Brasil ocorreu em 1685, em Recife, atual capital do estado

de Pernambuco [64]. Desde então inúmeros esforços foram feitos para a implementação de diversas formas de enfrentamento a essa doença que marcou a história do Brasil como um dos mais dramáticos problemas de saúde pública registrados no país. Entre as medidas de vigilância, implementou-se a notificação imediata de caso suspeito, tornando a FA a primeira doença de notificação obrigatória no Brasil [65].

A última grande epidemia urbana de FA no território brasileiro foi no ano de 1929 na cidade do Rio de Janeiro. Os últimos casos urbanos de FA foram reportados no município de Sena Madureia, no estado do Acre em 1942 [64]. No Brasil, a FA silvestre é endêmica nas regiões norte e oeste do país. O vírus da FA avançou progressivamente pelo território brasileiro desde seu ressurgimento na região Centro-Oeste em 2014, atingindo áreas com baixa cobertura vacinal e onde a vacinação não era recomendada [66]. O Brasil enfrentou, em dezembro de 2016, um dos maiores surtos de FA de transmissão silvestre da sua história, com ocorrência em estados da região Sudeste, principalmente Minas Gerais e Espírito Santo, mas também no Rio de Janeiro e em São Paulo [67]. A maior preocupação está na eventual transformação do surto em epidemia e evolução da forma silvestre para a urbana.

Existem três tipos de ciclos de transmissão: a) Febre amarela silvestre (FAS) (ou selvagem): Ocorre em regiões de mata/floresta tropicais nas quais os macacos atuam como reservatórios primários do vírus, a transmissão acontece através da picada do mosquito fêmea dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Os vetores silvestres têm hábitos diurnos e são mais ativos entre às 9h e 16h da tarde. b) Febre amarela “intermediária”: Mosquitos semi-domésticos infectam tanto macacos quanto humanos. Esse é o tipo de epidemia mais comum na África. c) Febre amarela urbana: Ocorre em cidades, nesse ciclo o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão ocorre a partir do mosquito vetor urbano (*Aedes aegypti*) infectado. O mosquito transmite o vírus de pessoa para pessoa. Grandes epidemias acontecem quando pessoas infectadas introduzem o vírus em áreas superpovoadas com alta densidade de mosquitos e onde a maioria dos indivíduos possuem pouca ou nenhuma imunidade devido à falta de vacinação [68,69] (Figura 3).

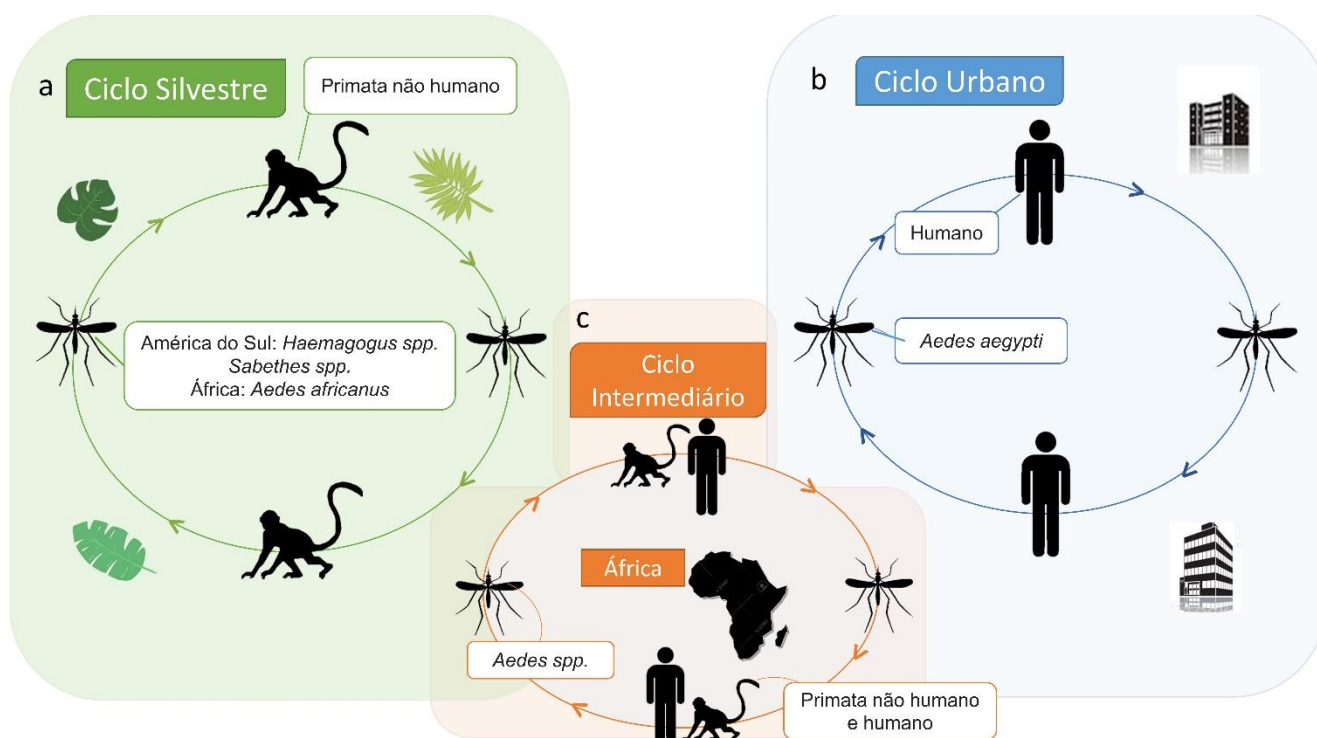


Figura 3. Ciclos de Transmissão do vírus da FA.

Ciclo Silvestre (a): Ocorre entre primatas não humanos (macacos) e mosquitos dos gêneros *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. Ciclo urbano (b): Ocorre entre seres humanos e mosquitos *Aedes aegypti*. Ciclo Intermediário (c): Ocorre tanto entre seres humanos quanto primatas e mosquitos do gênero *Aedes* spp. Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022. Adaptado de CDC, 2019.

A dinâmica populacional de mosquitos vetores sofre influências de fatores climáticos e ambientais, períodos de seca afetam de formas distintas ovos de diferentes espécies de culicídeos. Um longo período de seca por exemplo, afeta drasticamente a mortalidade de *Ae. albopictus* Skuse, 1894 quando comparado com *Ae. aegypti* cujos ovos possuem uma maior resistência a dessecação [70].

O ambiente em que esses ovos se encontram afeta diretamente o sucesso de uma população de mosquitos em uma determinada região, o estudo da interação dos seres vivos com seu habitat, é conhecido como ecologia, termo criado pelo cientista alemão Ernst Haeckel, em 1869, a ecologia também leva em consideração a distribuição dos organismos em um determinado local [71]. A diversidade de espécies de mosquitos vetores pode ser associada a habitats específicos nos quais ocorrem [72]. A nidalidade natural de uma doença transmitida por vetor refere-se à coexistência de hospedeiros suscetíveis, vetores e o patógeno em uma paisagem, cada um dos quais é necessário

para a transmissão de uma determinada doença [73]. Globalmente, acredita-se que muitas doenças transmitidas por mosquitos estejam aumentando em distribuição geográfica e incidência, com doenças sendo relatadas pela primeira vez em algumas localidades e ressurgindo em regiões das quais haviam sido erradicadas anteriormente [74,75]. No entanto, um estudo realizado na Carolina do Norte, EUA demonstrou que muitas espécies de mosquitos geralmente se restringem a menos de 100 m de distância de seus criadouros. Os autores também observaram que algumas espécies são fortemente influenciadas pela vegetação local, e as fêmeas correm considerável risco ao realizar o repasto sanguíneo, devido ao comportamento defensivo dos vertebrados dos quais se alimentam [76,77]. Contudo, a dispersão das arboviroses não se limita somente as interações ecológicas dos vetores e hospedeiros vertebrados dos quais se alimentam. A ação antrópica tem um impacto expressivo nessas inter-relações, através do desmatamento ocasionado pelo crescimento desenfreado de cidades que, muitas vezes, vem acompanhado de ausência de saneamento básico [78]. A diminuição de áreas florestais, afeta a população de macacos, os quais ficam restritos a grupos pequenos, diminuindo a variabilidade genética e consequentemente a resistência às doenças, dentre elas a FA [79].

1.3 Fragmentação florestal na Mata Atlântica

O Brasil, abriga duas grandes florestas, Amazônica e Atlântica, e se destaca como um dos países com maior biodiversidade do planeta, tendo cerca de 357 milhões de hectares de florestas tropicais (equivalente a 30% de todas as florestas tropicais existentes) [80]. A Costa Atlântica do Brasil é considerada um hotspot de biodiversidade no mundo, baseado nos princípios de insubstituibilidade e vulnerabilidade acrescido ao extraordinário endemismo de plantas e a níveis elevados de perda de habitat [81]. A fragmentação, destruição e descaracterização de habitats são os principais motivos da perda de biodiversidade [82]. Desde a chegada dos europeus por volta do ano 1500 a Mata Atlântica brasileira, vem sendo destruída por conta da ocupação humana [83]. Na região de Teresópolis, estado do Rio de Janeiro, a principal causa da fragmentação da Mata Atlântica é a ocupação das áreas originalmente florestadas para uso agrícola [84]. A fragmentação dos ecossistemas tem uma série de efeitos conhecidos e comprovados sobre suas comunidades vegetais e animais originais

[85]. Nas regiões sudeste e sul do Brasil é possível notar uma grande alteração na paisagem devido ao processos de exploração inadequada do ambiente natural e urbanização, com devastação de grandes áreas de florestas [86]. Modificações dos ciclos hidrológicos, por exemplo, podem se transformar em criadouros de mosquitos [87]. Como consequência, insetos hematófagos que possuem plasticidade adaptativa para a periferia das cidades e a domiciliação podem acabar se tornando sérias pragas, além de veiculadores de agentes etiológicos de doenças para as populações humanas e animais [14]. *Hg. leucocelaenus* possui grande plasticidade em relação a habitat e comportamento de repasto sanguíneo [88], essa espécie já foi encontrada com sangue humano na localidade de Santo Antônio das Missões, Rio Grande do Sul, Brasil [36]. Espécies de *Haemagogus* exibem hábitos primatófilicos, o que facilita seu contato com primatas não humanos (PNH) infectados pelo vírus da Febre Amarela (YFV) e a transmissão do vírus tanto para humanos quanto para PNHs [89–91].

1.4 Justificativa

O conhecimento das comunidades de mosquitos é de fundamental importância, seja na degradação ou preservação de determinada área e as implicações no cenário epidemiológico. A conservação e incremento do conhecimento das populações de culicídeos só poderão ser alcançados se a sistemática e ecologia do grupo forem estudadas de forma abrangente.

A sistemática de vários insetos, mesmo com a disponibilidade de recursos adicionais à biologia, morfologia, como a biologia molecular, segundo [92] não tem merecido a devida atenção, e a preocupação com a tríade impactocompetição-internacionalidade, que recebeu críticas contribui para desestimular pesquisas em sistemática [14]. Vastas regiões da região Neotropical, especialmente no Brasil, precisam ser mais bem pesquisadas no que diz respeito aos mosquitos do gênero *Haemagogus* e outros mosquitos silvestres. Erros de identificação de espécies podem comprometer a validade de estudos biológicos. Tais erros podem ser causados, por exemplo, pelo reconhecimento subsequente da presença de múltiplas espécies de um complexo ou alterações nos limites dos táxons. A taxonomia é um ramo de importância inegável dentro da zoologia, sendo que para um mapeamento eficiente da biodiversidade, atualmente, deve-se realizar pesquisas focadas em grupos restritos, para

que estudos mais completos possam ser realizados com eficiência. Segundo Forattini (1996), é evidente a necessidade de a taxonomia de qualquer grupo de seres vivos passar por vários estágios, por exemplo, a taxonomia em nível alfa, beta e gama, em consonância com a evolução dos conhecimentos que sobre ele vão sendo progressivamente adquiridos [14].

Estudos sobre a bioecologia de *Haemagogus* e outros mosquitos silvestres são de primordial importância médica. O possível envolvimento de mosquitos deste gênero com arboviroses como Febre Amarela, dengue e Mayaro precisa ser mais bem estudado. Estudos de infecção experimental, como os realizados com *Ae. aegypti* vs. vírus da febre amarela realizado por Lourenço-de-Oliveira (2002) devem ser desenvolvidos com *Haemagogus* spp. vs. vírus de dengue e outros. Com isso um dos questionamentos a ser respondido neste estudo é se existe o risco de transmissão de arbovírus patogênicos ao ser humano por *Haemagogus* capturados em diferentes remanescentes de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro [93].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar aspectos da biologia e da ecologia de espécies de importância médica, com ênfase no gênero *Haemagogus* e realizar uma investigação de *Flavivírus* circulantes em remanescentes de Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Fazer um levantamento das espécies de relevância epidemiológica encontradas em diferentes áreas de fragmentos de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro.
- Avaliar e comparar a abundância de cada espécies de mosquitos de importância médica em diferentes remanescentes de Mata Atlântica: Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João; Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões; Figueira Branca, Parque Nacional da Serra dos Órgãos.
- Analisar a diversidade, similaridade, riqueza de espécies que ocorrem nesses remanescentes de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro.
- Avaliar a influência dos fatores abióticos temperatura e pluviosidade na abundância e riqueza de espécies de relevância epidemiológica presentes nas diferentes áreas de coleta.
- Analisar as espécies de culicídeos de importância médica predominantes em cada remanescente de Mata Atlântica estudado.
- Avaliar a distribuição por altura das espécies de mosquitos com ênfase no gênero *Haemagogus* para realização da oviposição.
- Investigar a infecção natural de mosquitos por vírus do gênero *Flavivírus* nos remanescentes de Mata Atlântica estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

Considerando que o presente estudo não utilizou pesquisa *in vivo*, seja com animais, nem com humanos, não houve a necessidade da sua aprovação perante um comitê de ética. O projeto teve autorização de coleta da Secretaria de Meio Ambiente e Agricultura. As licenças permanentes para coleta, captura e transporte de material zoológico foram concedidas pelo SISBIO N° 44333-1 e 68206-1. Todos os membros da equipe de coleta estão devidamente vacinados contra a FA.

3.2 Áreas de Estudo

Os locais de amostragem foram selecionados em áreas florestadas perto de regiões de transmissão humana de Febre Amarela (FA) no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Fragmentos de Mata Atlântica nos municípios de Casimiro de Abreu, Silva Jardim e Teresópolis foram selecionados quanto à suscetibilidade para transmissão de arbovírus. A região foi afetada por um recente surto grave de Febre Amarela em 2016–2019 [94] (Figura 4).

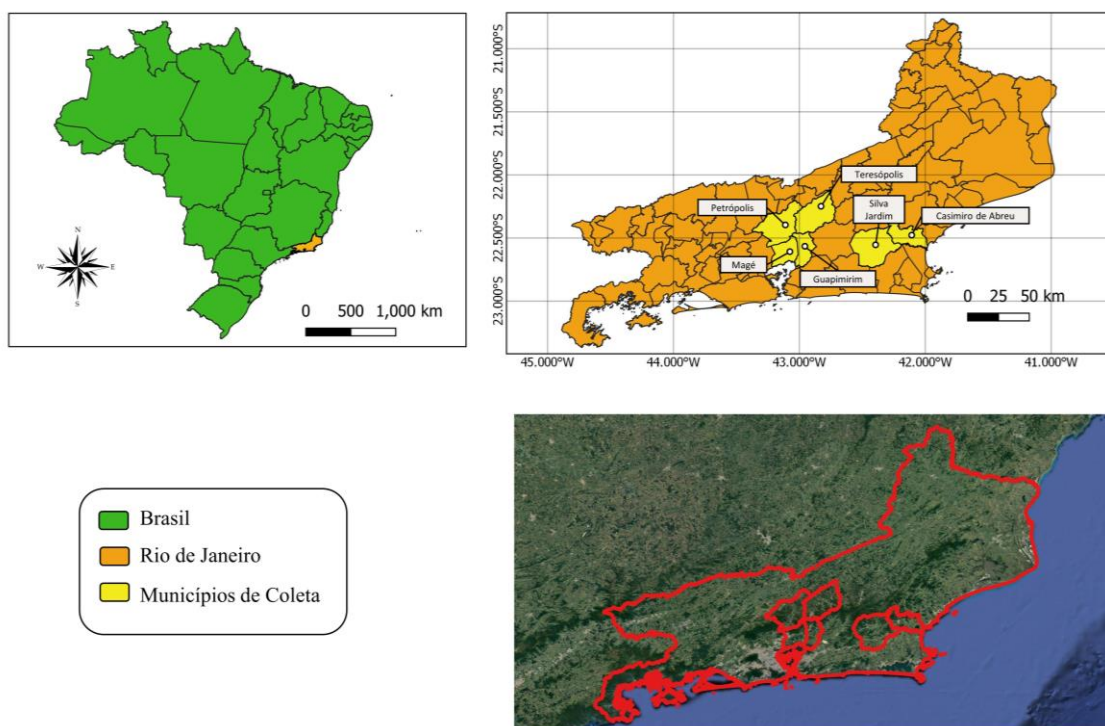


Figura 4. Mapa dos Municípios das áreas de coleta do estudo. Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022.

Os municípios de Casimiro de Abreu, Silva Jardim e Teresópolis são, respectivamente 135 km, 110 km e 97,4 km de distância da cidade do Rio de Janeiro. A principal cobertura do solo na região é Vegetação de Mata Atlântica, com densas florestas ombrófilas submontanas em moderados estágios avançados de regeneração. A região, localizada na bacia hidrográfica do Rio São João, está situada na zona intertropical (em baixas latitudes) e seu clima é predominantemente tropical [95]. A região é altamente influenciada pelo Oceano Atlântico, e apresenta uma temperatura média de 26,8°C, umidade relativa de 56% e 1200 mm de precipitação anualmente. Os maiores níveis de precipitação ocorreram de outubro a março.

3.3 Coleta de ovos e criação em laboratório

Foram utilizadas ovitrampas para a coleta de ovos de Culicidae. Essas armadilhas consistem em um recipiente sem tampa de cor preta de 500 mL, semelhante a um vaso de planta. Cada ovitrampa continha quatro paletas de oviposição (2,5 cm x 14 cm), mantidas verticalmente, dentro da armadilha com o auxílio de um clipe. Foi adicionado 300 mL de água natural e aproximadamente 100 g de serapilheira a cada ovitrampa. A fim de recriar um microecossistema semelhante ao ambiente natural. As ovitrampas foram vistoriadas e seu conteúdo (água e serapilheira) foi trocado a cada 10 dias durante todo o período de coleta (Figura 5).



Figura 5. Armadilha do tipo ovitrampa. Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022.

Uma vez coletadas das ovitrampas, as paletas foram acondicionadas em bandejas de polietileno e encaminhadas ao Laboratório de Diptera do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As paletas contendo ovos foram consideradas positivas e submetidas à contagem de ovos. Em seguida, foram imersas em bandejas transparentes contendo água desclorada. Posteriormente, as bandejas contendo as paletas com os ovos foram colocadas em estufa de laboratório sob ambiente experimental controlado e termoperíodo regulado ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 75-90% de umidade relativa do ar e ciclo de 12h claro/12h escuro). Essas condições nos permitiram manter os espécimes vivos até alcançarem a forma adulta, na qual é feita a identificação a nível de gênero e espécie utilizando a metodologia descrita por Alencar et al. (2013) [96] (Figura 6).

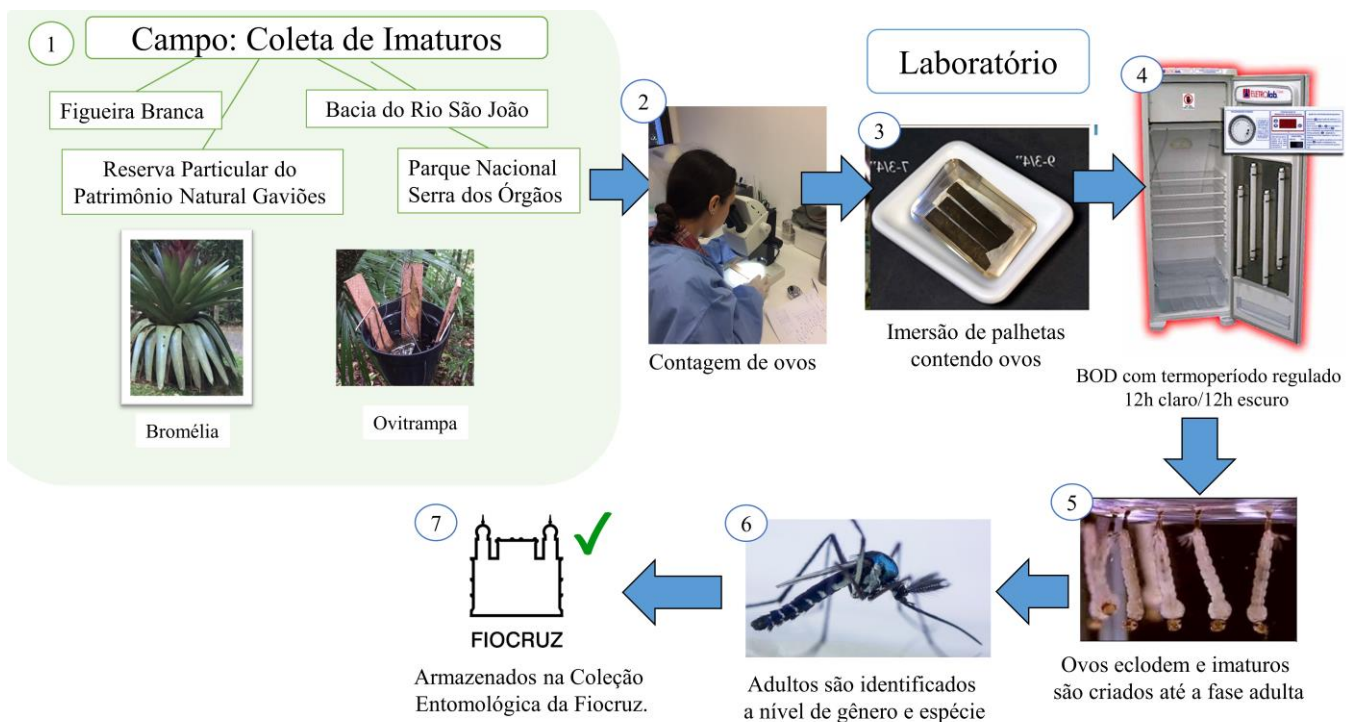


Figura 6. Representação esquemática da metodologia de coleta de imaturos. Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022.

3.4 Coleta dos espécimes adultos e criação em laboratório

As capturas dos espécimes adultos foram realizadas com auxílio de armadilhas do tipo CDC contendo CO₂ como atrativo e armadilha de Shannon. Mosquitos adultos foram sacrificados com clorofórmio e identificados com a utilização de chaves dicotômicas elaboradas por Lane (1953), Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), Arnell (1973), Forattini (2002) e Marcondes e Alencar (2010) [3,27,32,33,97]. Adultos de importância médica foram armazenados em nitrogênio líquido para posterior identificação de RNA de *Flavivírus*, as demais espécies identificadas foram armazenadas na Coleção Entomológica da Fiocruz (Figura 7).

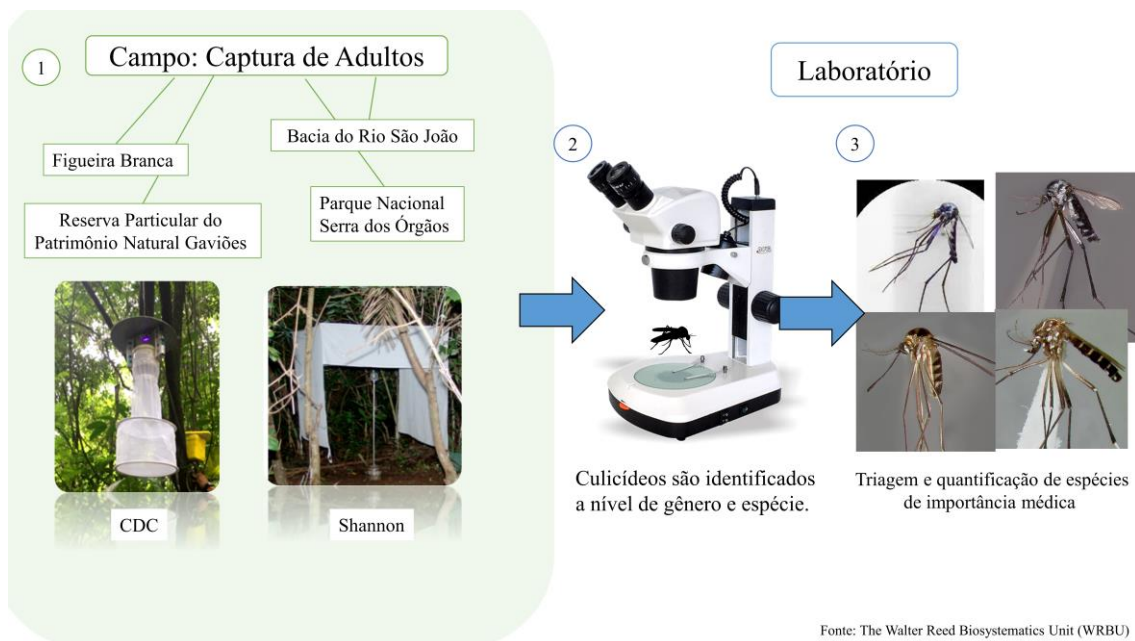


Figura 7. Representação esquemática do fluxo da metodologia de coleta de adultos.

Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022. Imagem dos mosquitos: The Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU).

3.5 Estudo morfológico das formas imaturas

As larvas foram clarificadas em solução de potassa (KOH) a 10% por 12 horas, desidratadas (70% até 100%) em série alcoólica (etanol) e diafanizadas em eugenol por 24 horas. Após essas passagens, as larvas foram montadas em Bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula. As exúvias pupais receberam o mesmo tratamento, exceto a clarificação, e foram também montadas em Bálsamo do Canadá. Com auxílio de um microscópio de luz, foram observados e desenhados, os caracteres taxonômicos do abdômen e sifão respiratório. A terminologia utilizada segue Belkin et al. (1970), modificada por Harbach; Knight (1980); Forattini (1996) e Forattini (2002) [3,14,98,99].

3.6 Estudo morfológico dos adultos

Os adultos mantidos a seco foram observados em microscópio estereoscópico. O uso de caracteres morfológicos para estudo taxonômico seguiu Lunt; Nielsen (1971a,b), Harbach & Kitching (1998) e Reinert et al. (2008) [100,101]. Os estados de caráter observados foram analisados utilizando-se método empírico e os métodos estatísticos descritos por Rohlf (1977) [11].

3.6.1 Processamento dos mosquitos

A identificação das espécies foi realizada a partir da observação direta dos caracteres morfológicos evidenciáveis ao microscópio óptico (Leica DMD108®) e consulta às descrições/diagnoses respectivas das spp., utilizando chaves dicotômicas elaboradas por Lane (1953), Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), Arnell (1973), Forattini (2002) e Marcondes e Alencar (2010) [3,8,32,33,97]. As abreviaturas dos nomes genéricos e subgenéricos seguem a proposta de Reinert (2009) [100]. Após a determinação específica, todos os espécimes foram incorporados à Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, sob o título de “Coleção de mosquitos da Mata Atlântica, Rio de Janeiro”.

3.7 Extração de RNA

Culicídeos adultos foram previamente identificados e separados por espécie, sexo, data e local de captura e preparados em pools de 3 a 33 indivíduos para maceração. O RNA viral foi extraído de cada pool sob condições de laboratório BSL2 seguindo as instruções do fabricante, usando o kit MN Nucleo Spin RNA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, ref. 40955.250, Quezon City, Filipinas) e o cDNA foi imediatamente sintetizado usando o kit RNA-to-DNA de alta capacidade (Applied Biosystem, ref. 4388950, Foster city, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado usando um Quantificador Denovix DS-11+b (DeNovix Inc., Wilmington, DE, EUA) e mantido a 20°C até ser testado para flavivírus.

3.7.1 PCR para Flavivírus

Para a detecção de flavivírus, foi usado um protocolo convencional de RT-PCR usando primers projetados para amplificar uma sequência tendo entre 240 e 320 pares de base da região NS5, conforme descrito anteriormente por Otto et al. 2008 [102]. Para controlar nossa amplificação, preparou-se um tubo para cada controle positivo e negativo. Como controles positivos, utilizou-se cDNA obtido de FA 17D, Zika vírus e RNA do vírus do Nilo Ocidental, e como controle negativos, utilizou-se cDNA do vírus Chikungunya (CHKV), cDNA de mosquitos não infectados com qualquer arbovírus e como branco, o mix da reação contendo água no lugar de cDNA.

A mistura de reação compreendia 10 pMol de iniciador Pan-Flavi Forward (5'-TAC AAC ATG ATG GGG AAR AGA GAR AA-3'), 10 pMol de iniciador Pan-Flavi Reverso (5'-GCW GAT GAC ACM GCN GGC TGG GAC AC-3'), Tampão de PCR 10x (100 mM Tris-HCl pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8%, Nonidet P40), 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 U de DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, 168 Third Avenue, Waltham, MA 02451, EUA), 0,2 mM dNTPs em um volume final de reação de 25µL. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em géis de agarose a 1,5% em tampão 1 X TBE (Trizma, ácido bórico, EDTA) sob luz UV (260 nm) após coloração por impregnação com brometo de etídio. Os fragmentos amplificados esperados variaram de 200 a 300 pb em tamanho e foram purificados usando um kit de

purificação Cellco PCR (Cellco Biotec do Brasil Ltda, cat. # DPK-106L, São Carlos, SP, Brasil).

3.7.2 Sequenciamento de Nucleotídeos

O sequenciamento foi realizado pelo centro de sequenciamento de nucleotídeos da FIOCRUZ, utilizando um analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), conforme descrito por Ferreira-de-Brito et al. 2016. Aproximadamente 10–40 ng de produto de PCR purificado foram sequenciados em um sequenciador de DNA ABI 3730 seguindo o protocolo de sequenciamento de ciclo BigDye Terminator v.3.1. As sequências foram então analisadas usando Geneious R10 (Biomatters, v.10.2.6), e os contigs resultantes foram comparados com sequências de referência usando NCBI Blast (Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico, em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> acessado em 27 de agosto de 2020) (Figura 8).



Figura 8. Representação esquemática do fluxo da metodologia de extração de RNA viral.
Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022.

Extração de RNA (1), PCR para *Flavivírus* (2), Sequenciamento de Nucleotídeos (3), análise das sequências resultantes (4 e 5) de culicídeos coletados em fragmentos de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

3.8 Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João

A Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João, está situada no município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro, Brasil. A APA da Bacia do Rio São João é uma unidade de conservação com 150.374,61 hectares de Mata Atlântica, próxima ao Km 214 da Rodovia BR 101 na cidade de Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil [103]. O Rio São João é o principal curso d'água da região, contribuindo significativamente para o abastecimento de água das regiões circunvizinhas por meio do Reservatório Juturnaíba de Araruama, estado do Rio de Janeiro. A vegetação é característica de florestas ombrófilas densas, também conhecidas como florestas tropicais. Esse ecossistema compreende folhagens perenes, copas de até 50 m de altura, árvores emergentes de até 40 m de altura e vegetação arbustiva densa composta por samambaias, arbustos e bromélias [104] (Figura 9).

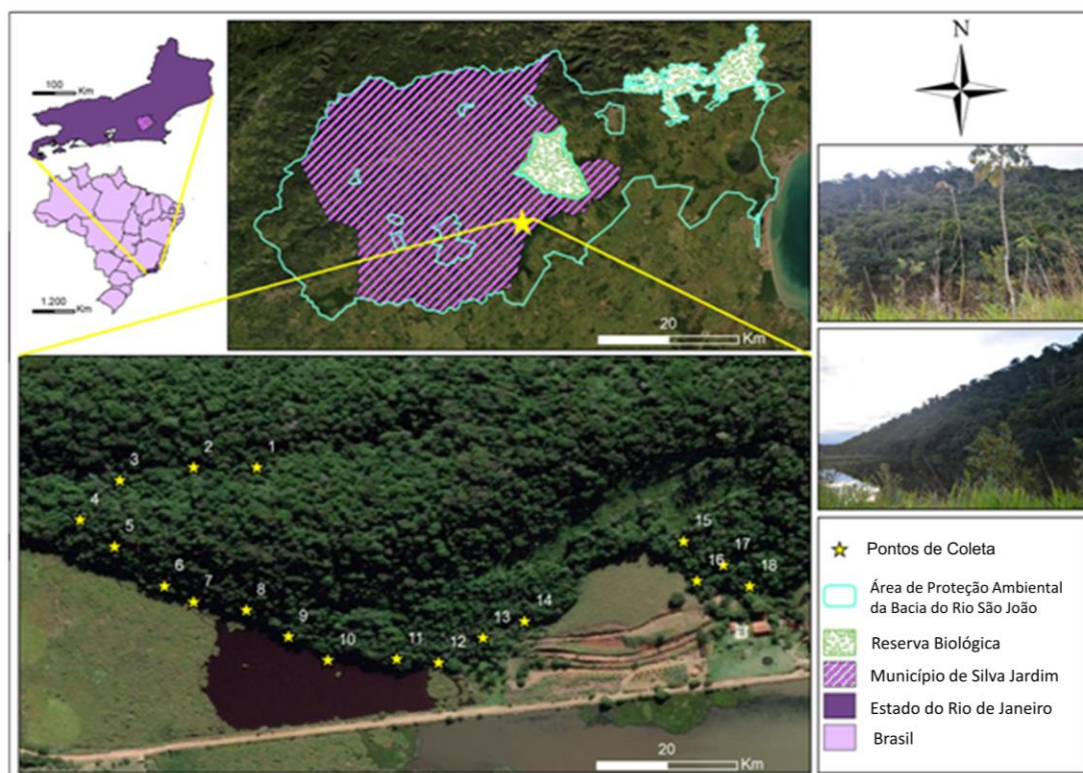


Figura 9. Pontos de amostragem da Área de proteção ambiental da Bacia do Rio São João, município de Silva Jardim, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Cecilia Ferreira de Mello.

Tabela 1. Localização dos pontos amostrais na Área de Proteção Ambiental Bacia do Rio São João, Silva Jardim, RJ, Brasil.

Pontos de Coleta	Coordenada Sul	Coordenada Oeste
Ponto 1	22°37'10.7" S	42°18'59.5"O
Ponto 2	22°37'10.7"S	42°19'01.9"O
Ponto 3	22°37'11.2"S	42°19'04.7"O
Ponto 4	22°37'12.7"S	42°19'06.2"O
Ponto 5	22°37'13.7"S	42°19'04.9"O
Ponto 6	22°37'15.2"S	42°19'03.0"O
Ponto 7	22°37'15.8"S	42°19'01.9"O
Ponto 8	22 °37'16.1"S	42°18'59.9"O
Ponto 9	22°37'17.1"S	42°18'58.3"O
Ponto 10	22°37'18.0"S	42°18'56.8"O
Ponto 11	22°37'18.0"S	42°18'54.0"O
Ponto 12	22°37'18.1"S	42°18'53.8"O
Ponto 13	22°37'18.1"S	42°18' 52.6"O
Ponto 14	22°37'13.8"S	42°18'43.2"O
Ponto 15	15.22°37'13.5"S	42°18'43.3"O
Ponto 16	22°37'15.0"S	42°18'42.8"O
Ponto 17	22°37'14.4"S	42°18'41.8"O
Ponto 18	22°37'15.2"S	42°18'40.8"O

Os mapas foram preparados no ArcGIS Desktop: Versão 10.5. Fonte: Cecilia Ferreira de Mello, 07 de junho de 2022.

3.8.1 Distribuição das armadilhas para a coleta de imaturos

Entre julho de 2018 e junho de 2019, foram realizadas coletas mensais de ovos de mosquitos por meio de ovitrampas. Dezoito ovitrampas foram distribuídas por amostragem de conveniência, técnica de amostragem não probabilística [105]. As armadilhas foram posicionadas a uma distância mínima de 40 m uma da outra, cada ovitrampa foi colocada a uma altura de 2,50 m fixada em árvores localizadas ao longo de uma trilha de caminhada próxima à borda do fragmento florestal.

3.8.2 *Análise de dados*

Utilizou-se o teste Qui-quadrado para analisar o efeito da variação sazonal na abundância de espécies de mosquitos, utilizando o software estatístico GraphPad Prism 8.01 for Windows. Para analisar o efeito da variação sazonal na comunidade de mosquitos, foi realizado o cálculo do índice de similaridade de Bray-Curtis e através do qual obtivemos valores para Dominância (D), Diversidade de Shannon (H) e Equidade de Pielou (J) usando o software estatístico PAST 4.03 [106]. Este software também foi utilizado para gerar uma análise de correspondência canônica (CCA), que foi aplicada para verificar o efeito das variáveis climáticas avaliadas (temperaturas médias e precipitação acumulada) sobre as espécies de mosquito amostradas. O nível de significância utilizado nos testes estatísticos foi de $p \leq 0,05$. As temperaturas médias e precipitações acumuladas durante o período de estudo foram obtidas do Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

3.9 Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO)

O Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO) possui uma extensão de 20.024 hectares, localizado entre os municípios de Teresópolis, Petrópolis, Magé e Guapimirim. A cobertura vegetal da área de estudo é composta por uma floresta costeira hidrófila perene, também classificada como floresta ombrófila densa. Com um clima que pode ser definido como temperado superúmido [107] (Figura 10).

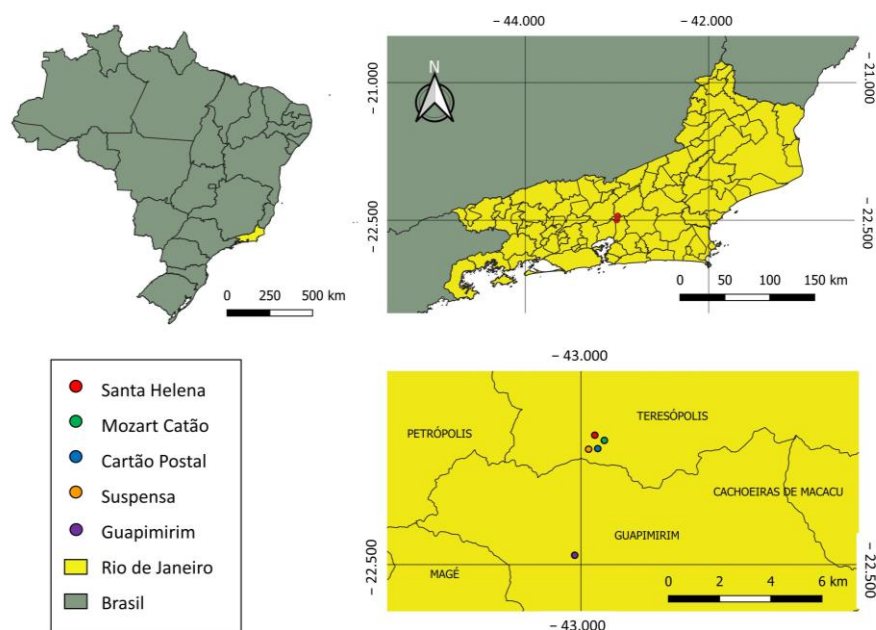


Figura 10. Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Entre os municípios de Magé, Teresópolis, Guapimirim e Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Shayenne O. F. Silva, 22 de agosto de 2022.

Pontos de amostragem na Área do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO): Ponto 1: 22° 26'54" S 42° 59'09" W; Ponto 2: 22°27'10.8"S 42°59'28.8"W; Ponto 3: 22°27'21.2"S 42°59'37.2"W; Ponto 4: 22°27'22.3"S 42°59'49.9"W, Ponto 5: 22° 29' 41.963" S 43° 0' 7.923" W.

3.9.1 Coleta de culicídeos imaturos

As amostragens foram feitas no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020. Armadilhas de oviposição (ovitrampas) foram utilizadas como ferramenta padrão para a coleta de ovos de culicídeos. As ovitrampas foram distribuídas em cinco trilhas (Trilhas Santa Helena, Cartão Postal, Mozart Catão, Suspensa e Guapimirim) do PNSO. Em cada trilha foram colocadas 10 ovitrampas com três paletas por ovitrampa. A trilha de Guapimirim e da Santa Helena continham mais 5 ovitrampas distribuídas verticalmente nas alturas de solo, 3m, 9m e 12m.

3.9.2 Análise de dados

Foi realizado um registro da abundância de ovos coletados por trilha, por mês e por período seco e chuvoso. Essas abundâncias foram comparadas a fim de constatar as trilhas, meses e período com as maiores e menores abundâncias de ovos de culicídeos. Foi feita uma análise de correlação entre o número de ovos coletados com as variáveis ambientais: temperatura e pluviosidade. As abundâncias de ovos coletados na copa das árvores foram comparadas com a abundância de ovos coletados ao nível do solo. Foi averiguada a diferença no número de culicídeos da espécie *Hg. leucocelaenus* coletados em diferentes alturas em relação ao nível do solo (solo, 3m, 6m, 9m e 12m).

3.10 Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões)

As amostragens foram realizadas em um fragmento de Mata Atlântica da Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões) em Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. Esta reserva privada tem aproximadamente 1.600 hectares e é uma Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado (Figura 11). A vegetação é classificada como floresta ombrófila densa de várzea, uma das fitofisionomias mais ameaçadas do bioma Mata Atlântica em decorrência da fragmentação. Os estágios sucessionais médios a avançados são predominantes nesta região, com vegetação secundária característica [104].

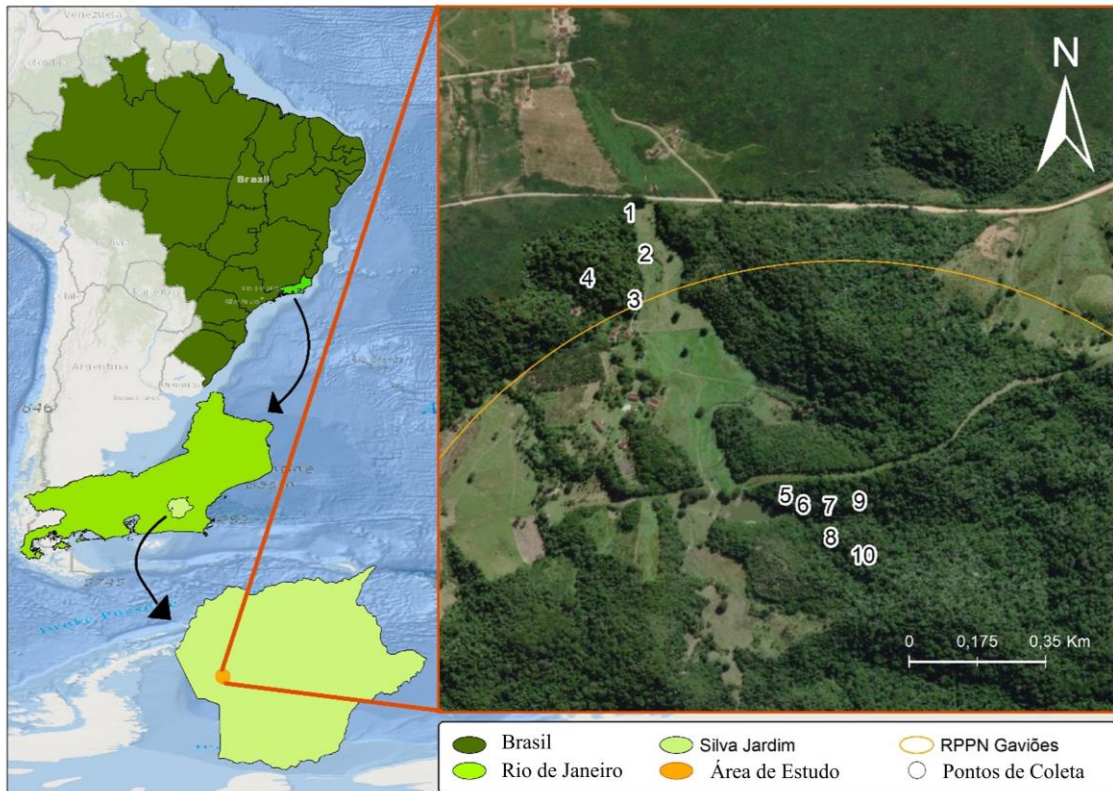


Figura 11. Pontos de amostragem da 3.4 Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: Cecília Ferreira de Mello.

Tabela 2. Pontos de amostragem na Área de Proteção Ambiental Sana da Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões), Rio de Janeiro, Brasil.

Pontos de Coleta	Coordenada Sul	Coordenada Oeste
Ponto 1	22°34'08.5" S	42°31'39.0" O
Ponto 2	22°34'11.9" S	42°31'37.7" O
Ponto 3	22°34'15.7" S	42°31'38.6" O
Ponto 4	22°34'13.9" S	42°31'42.5" O
Ponto 5	22°34'31.9" S	42°31'25.0" O
Ponto 6	22°34'32.7" S	42°31'24.6" O
Ponto 7	22°34'32.8" S	42°31'22.4" O
Ponto 8	22°34'36.9" S	42°31'20.1" O

3.10.1 Coleta de culicídeos imaturos

O período de coleta dos imaturos foi de setembro de 2019 a janeiro de 2021. Foram instaladas 10 ovitrampas, uma armadilha por local de coleta, com três paletas de oviposição de madeira (2,5cm x 14 cm) com superfícies texturizadas, as paletas foram mantidas verticalmente dentro da ovitrampa por um clipe.

3.10.2 Análise de dados

Os dados das amostragens foram analisados para elucidar as características ecológicas dos culicídeos, avaliando a relação entre suas populações e a distribuição sazonal. A abundância relativa de ovos foi relatada para as estações chuvosa (dezembro, janeiro, fevereiro) e seca (maio, junho, julho e agosto) [108]. A distribuição normal dos dados coletados foi avaliada pela aplicação do teste de normalidade. Posteriormente, os testes de Kruskal Wallis seguido do Dunn's post hoc foram usados para avaliar a significância estatística da diferença no número de indivíduos de diferentes espécies de culicídeos de importância médica coletados na área de estudo. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença na abundância de ovos entre as estações chuvosa e seca. A correlação de oviposição entre espécies do mesmo gênero, compartilhando os mesmos criadouros, foi avaliada pelo teste de Correlação de Spearman.

3.11 A Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca

A Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca está localizada próximo ao distrito de Casimiro de Abreu, em Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Esta região está incluída na Área de Proteção Ambiental Estadual de Macaé, com 350,37 km², e é caracterizada por clima mesotérmico úmido predominante e vegetação densa de floresta tropical montana e submontana (Figura 12) [109].

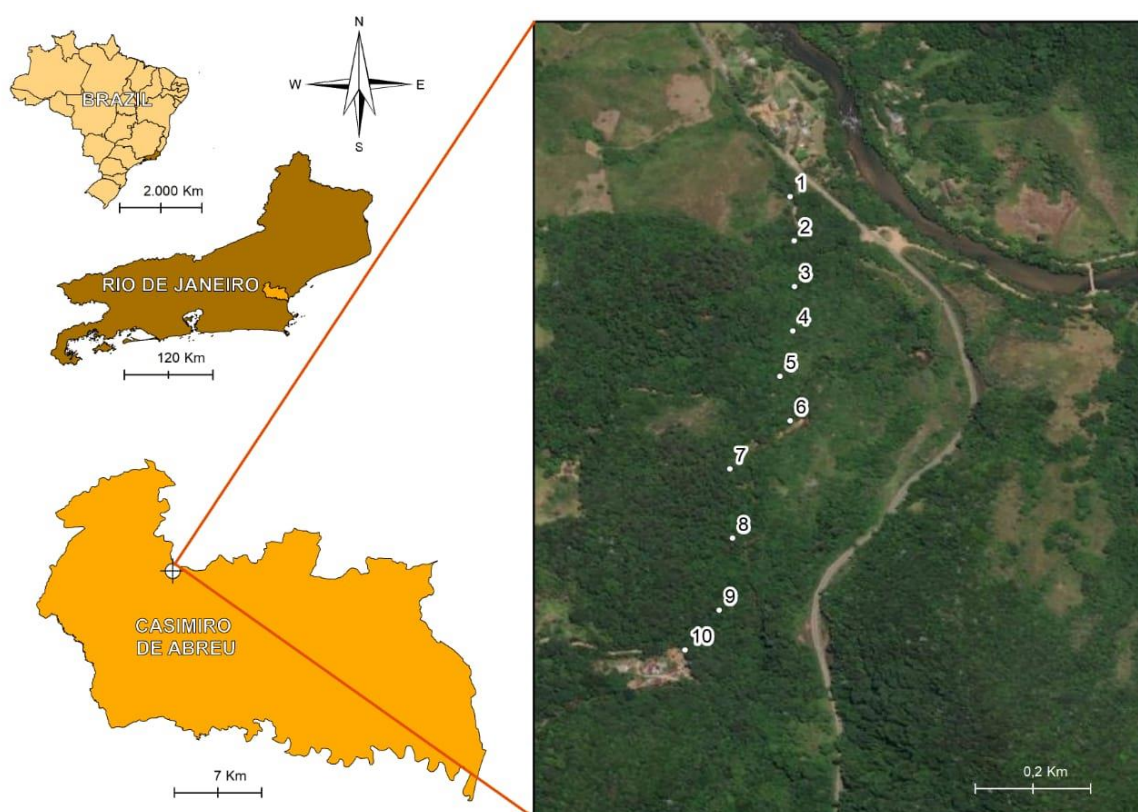


Figura 12. Pontos de amostragem da Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca, localizado no município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil.
Fonte: Cecilia Ferreira de Mello.

Coordenadas do ponto de coleta: 22°25'47.0"S 42°12'13.6"W. Os mapas foram preparados no ArcGIS Desktop: Versão 10.5. Fonte: Cecilia Ferreira de Mello, 09 de julho de 2022.

3.11.1 Período e metodologia de coleta de culicídeos imaturos

Ovos de culicídeos foram amostrados de setembro de 2019 a abril de 2021 usando 20 armadilhas de oviposição. Essas ovitrampas foram colocadas em cada local de coleta de um ambiente florestal a distâncias aleatórias entre si, instaladas em árvores a 2,50 metros de altura e numeradas sequencialmente.

3.11.2 Análise estatística

Os seguintes índices foram calculados para realizar análises da eficiência das ovitrampas: i) Índice de Positividade da Ovitampa (IPO) = (Número de armadilhas positivas / Número de ovitrampas inspecionadas x 100); ii) Índice de Densidade de Ovos (IDO) = (Total de ovos nas paletas / Total de armadilhas positivas); iii) Índice Médio de Ovos (IMO) = (Número de ovos coletados / Número de ovitrampas inspecionadas); iv) Índice de Positividade Larva (IPL) = (Número de armadilhas positivas / Número de ovitrampas inspecionadas x 100); v) Índice de Densidade de Larvas (IDL) = (Total de larvas nas armadilhas / Total de armadilhas positivas); e vi) Índice da Média de Larvas (IML) = (Número de larvas coletadas / Número de armadilhas inspecionadas). A quantidade de ovos de Culicidae foi avaliada para as estações seca e chuvosa, e o teste de Mann-Whitney foi aplicado para analisar a significância estatística das diferenças na abundância de ovos entre essas estações.

4 RESULTADOS

4.1 Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João

Durante o período de amostragem, foram coletados 1.086 ovos na área da Bacia do Rio São João. Destes, 39 (3,6%) não eclodiram e 1.047 (96,4%) evoluíram para a fase adulta, correspondendo às seguintes espécies: *Ae. albopictus* (Skuse, 1895) (469-44,8%), *Ae. terreus* (Walker, 1856) (67-6,4%) e *Hg. leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924) (511-48,8%). As três espécies de mosquitos estiveram presentes nas coletas em todas as estações do ano. *Hg. leucocelaenus* foi a espécie mais abundante no verão (57,5%) e inverno (56,8%). Em contraste, *Ae. terreus* foi o mais abundante na primavera (42,3%) e *Ae. albopictus* foi a mais abundante no outono (55,6%) (Tabela 3).

A influência da sazonalidade nas coletas foi significativa pelo Qui-quadrado ($\chi^2=222,9$; d.f.= 6; $p<0,0001$). O maior número de ovos foi obtido nas coletas realizadas no outono (466-44,5%) e verão (433-41,4%), seguidos da primavera (104-9,9%) e inverno (44-4,2%), respectivamente. Nas estações climáticas verão, outono e inverno apresentaram valores de D, H e J mais próximos entre si do que quando comparados à primavera (Tabela 3). O índice de Bray-Curtis indicou alta similaridade entre a composição e abundância das espécies de mosquitos coletadas no outono e verão (85%), enquanto o aglomerado formado pelas espécies coletadas na primavera e inverno apresentou similaridade próxima a 60% (Figura 13).

Tabela 3. Índices ecológicos de mosquitos por estação na APA Bacia do Rio São João, município de Silva Jardim, estado do Rio de Janeiro. Coletadas entre julho de 2018 a junho de 2019.

Espécies	Verão N (%)	Outono N (%)	Inverno N (%)	Primavera N (%)
<i>Ae. albopictus</i>	175 (40.4)	259 (55.6)	18 (40.9)	17 (16.3)
<i>Ae. terrens</i>	9 (2.1)	13 (2.8)	1 (2.3%)	44 (42.3)
<i>Hg. leucocelaenus</i>	249 (57.5)	194 (41.6)	25 (56.8)	43 (41.4)
Total	433 (100.0)	466 (100.0)	44 (100.0)	104 (100.0)
Dominância (D)	0.49	0.48	0.49	0.38
Diversidade Shannon (H')	0.76	0.79	0.77	1.03
Equabilidade de Pielou (J)	0.70	0.72	0.70	0.93

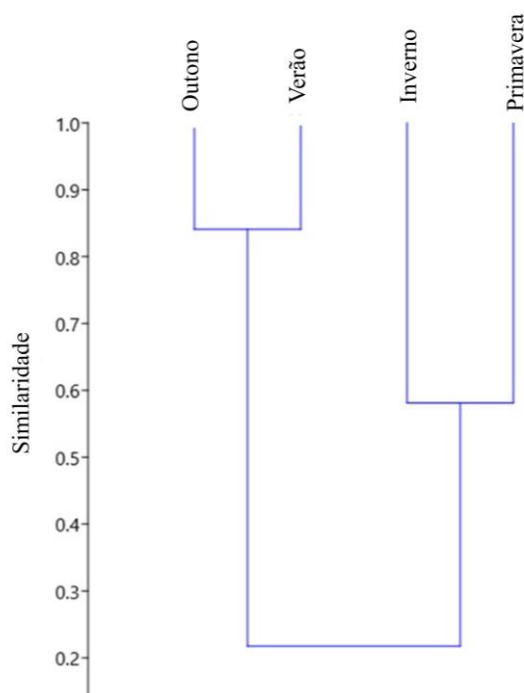


Figura 13. Análise de cluster (índice de Bray-Curtis).

Amostras de mosquito coletadas em diferentes épocas do ano entre julho de 2018 e junho de 2019 na APA da Bacia do Rio São João, Rio de Janeiro, Brasil.

A Análise de Correspondência Canônica (CCA) indicou correlações positivas significativas entre *Ae. albopictus* com temperatura (°C) ($r= 0,59$; $p<0,05$), mas não com precipitação (mm) ($p>0,05$). As demais espécies não apresentaram correlação positiva com temperatura ou precipitação ($p>0,05$) (Figura 14).

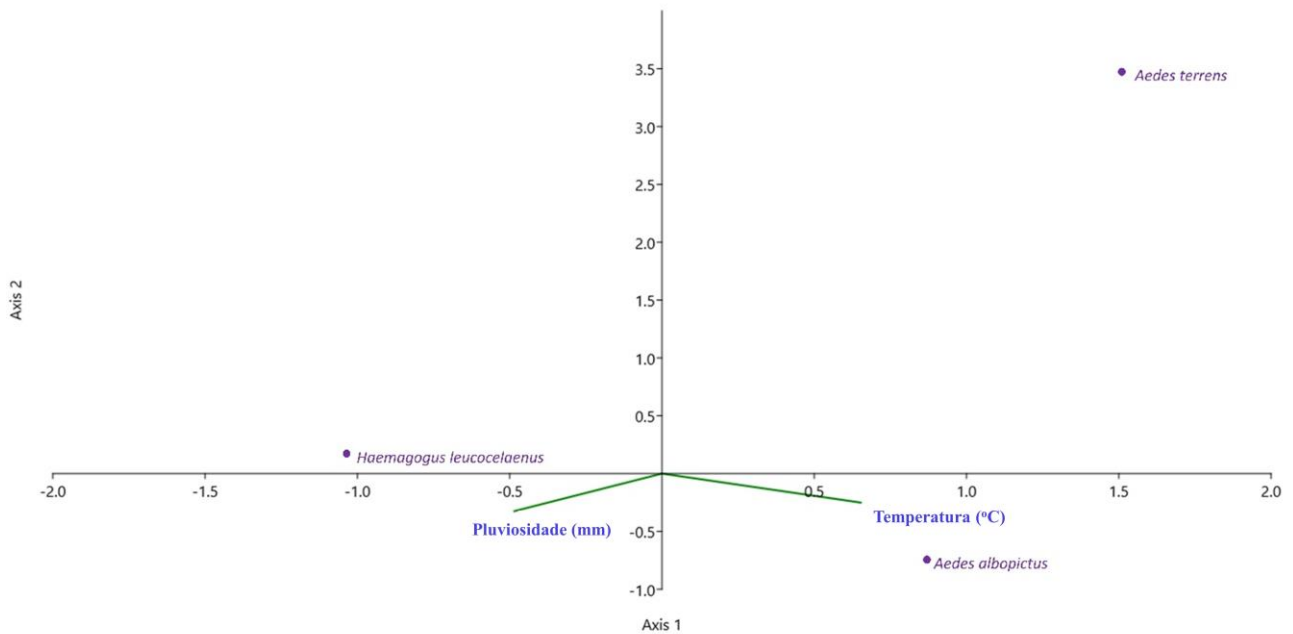


Figura 14. análise de correspondência canônica (CCA) de espécies de mosquitos e variáveis climáticas. Período de julho de 2018 a junho de 2019 na APA da Bacia do Rio São João.

4.2 Parque Nacional Serra dos Órgãos (PNSO)

Dentro do número total de ovos coletados durante 6 meses no Parque Nacional da Serra dos Órgãos a maior quantidade foi observada na trilha Cartão postal (2.284 ovos) seguida pela trilha Mozart Catão (2.138 ovos) e Santa Helena (1.550 ovos). As menores quantidades de ovos foram registradas nas trilhas Guapimirim (318 ovos) e Suspensa (437 ovos) (Figura 15 A). Houve uma correlação moderada de 0,625 entre o número de ovos coletados e o fluxo de chuvas no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020. A estação chuvosa (dezembro de 2019 a fevereiro de 2020) apresentou o maior número de ovos coletados (4.163 ovos, 62%), enquanto a estação seca (setembro a novembro de 2019), apresentou o menor número (2.564 ovos, 38%) (Figura 15 B).

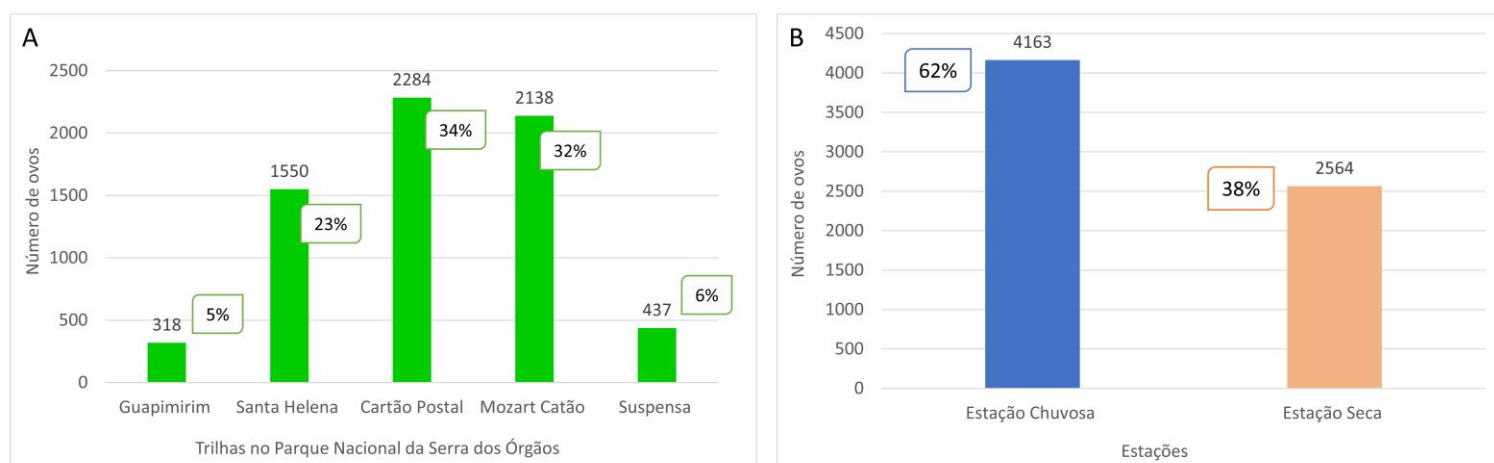


Figura 15. Abundância de mosquitos na área do PNSO por trilha e por estação chuvosa e seca, município de Teresópolis, estado do Rio de Janeiro.

Total de ovos coletados por trilha (Guapimirim, Santa Helena, Cartão Postal, Mozart Catão e Suspensa) (A) e total de ovos coletados por período chuvoso e Seco (B). Estação chuvosa (coluna azul) e estação seca (coluna laranja) no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, no período de Set/19 a Fev/20.

Pode-se observar que no mês de janeiro de 2020 houve um pico tanto no número total de ovos (2.056 ovos) coletados quanto na temperatura (17,3 °C) (INMET, 2020) (Figura 16 A). Através de uma análise de correlação constatou-se que o número de ovos apresentou uma correlação positiva forte de 0,755 com a temperatura. O número de ovos e a pluviosidade ambos apresentaram um pico no mês de novembro de 2019, tiveram um declínio em dezembro e voltaram a subir no mês de janeiro de 2020 de forma muito similar (INMET, 2020) (Figura 16 B).

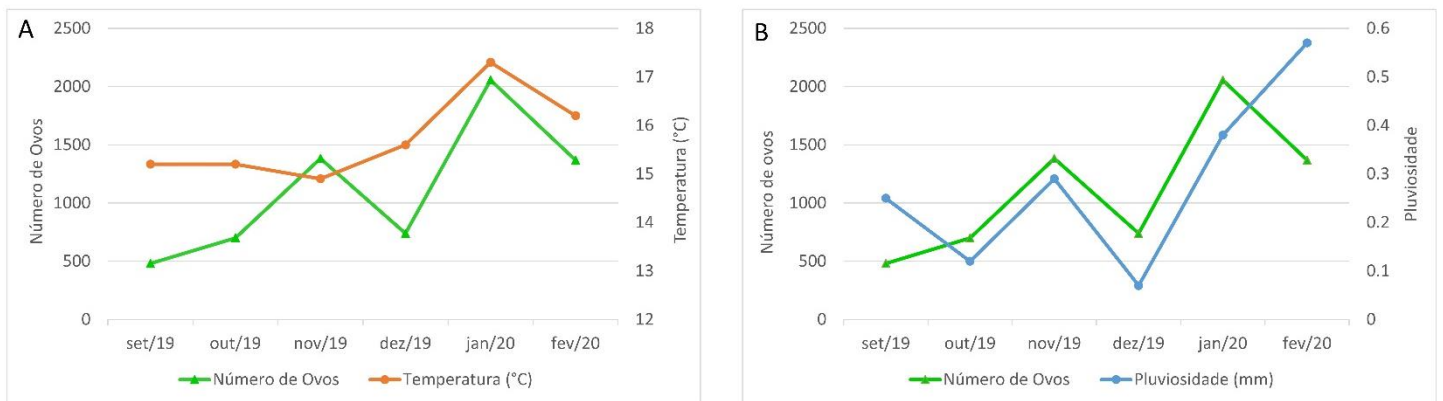


Figura 16. Correlação da temperatura e pluviosidade com o número de ovos no PNSO.

Número total de ovos coletados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos por mês relacionados com a temperatura (A) e pluviosidade (B). Número de ovos (linha verde com triângulo), temperatura (linha laranja com círculo) e pluviosidade (linha azul com círculo) [95].

O número de ovos coletados ao nível do solo (5.853 ovos) foi consideravelmente maior em todas as trilhas enquanto o número de ovos coletados ao nível da copa (810 ovos) permaneceu baixo e inferior ao do solo (Figura 17 A). Durante os meses de setembro de 2019 e fevereiro de 2020, foram coletados 77 ovos de *Hg. leucocelaenus*. Foram encontrados ovos dessa espécie vetora em todas as alturas nas quais as armadilhas foram instaladas com a exceção da armadilha do solo. Altura de 6m foi a que apresentou o maior número de ovos de indivíduos desta espécie (35 ovos) seguida pelas alturas de 12m (32 ovos) e 9m (22 ovos), respectivamente. É possível perceber que a maioria dos ovos foram encontrados nas alturas mais próximas a copa das árvores (Figura 17 B).

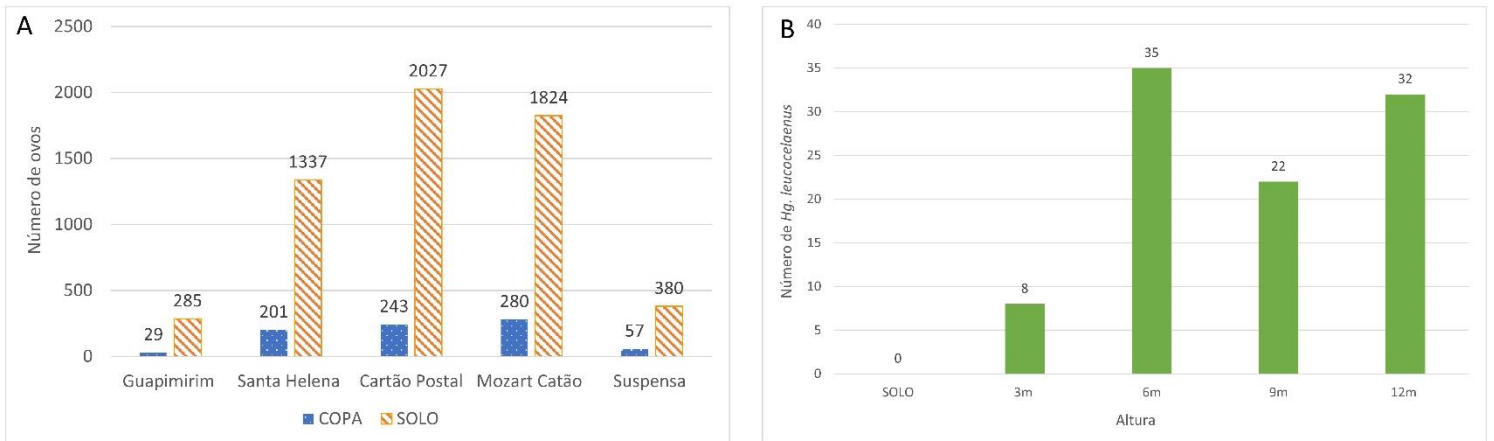


Figura 17. Ovos por copa e solo e por altura no PNSO.

Total de Ovos Coletados ao Nível da Copa e ao nível do Solo nas Trilhas. Copa (colunas azuis com círculos brancos) e solo (colunas laranjas com linhas diagonais) (A). Número de ovos de *Hg. leucocelaenus* coletados em diferentes alturas nas árvores (solo, 3m, 6m, 9m e 12m) (B) na sede de Guapimirim do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

4.3 Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões)

O esforço amostral resultou em 2.943 ovos, 1.538 larvas e 1.231 adultos, devidamente contabilizados e caracterizados. Foi dada ênfase às espécies vetoras envolvidas no ciclo de transmissão de importantes arboviroses, como dengue e febre amarela. Assim, as espécies encontradas na reserva natural em questão e que são consideradas de preocupação epidemiológica foram *Hg. leucocelaenus* (n=1041), *Hg. janthinomys* (n=62), *Ae. albopictus* (n=40), e *Ae. terrens* (n=88).

Do total de ovos coletados (n = 2.943), o maior percentual foi registrado na estação chuvosa, com 96%, enquanto a abundância de ovos na estação seca foi mais escassa, com apenas 4%. Por meio do teste de Mann-Whitney, foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$) entre a abundância de ovos na estação chuvosa em relação à estação seca ($p = 0,004$) (Figura 18).

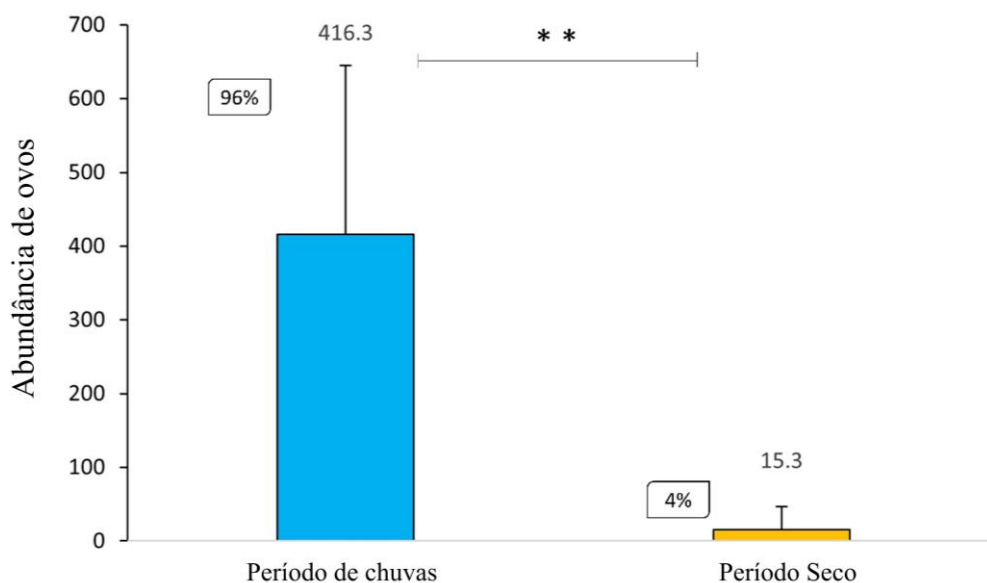


Figura 18. Abundância de ovos no período chuvoso e seco na RPPN Gaviões.

Diferença estatisticamente significativa entre a média e o desvio padrão do número de ovos coletados nas estações chuvosa (dezembro a março) e seca (junho a agosto) na RPPN Gaviões. ** $p \leq 0,01$.

De acordo com o Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC), o verão, que apresenta breves chuvas fortes e altas temperaturas, vai de dezembro a fevereiro, e o inverno, período seco com chuvas escassas, vai de junho a agosto (INPE, 2021). O número de ovos não eclodidos foi maior tanto na estação chuvosa (n=2206) quanto na estação seca (n=92). Enquanto o número de ovos eclodidos foi menor em ambos os períodos (úmido n=292, seco n=0). Assim, 88,3% do total de ovos coletados durante a estação chuvosa não eclodiu, enquanto apenas 11,7% já haviam eclodido (Figura 19 A), e todos os ovos coletados durante o período seco foram ovos não eclodidos (Figura 19 B).

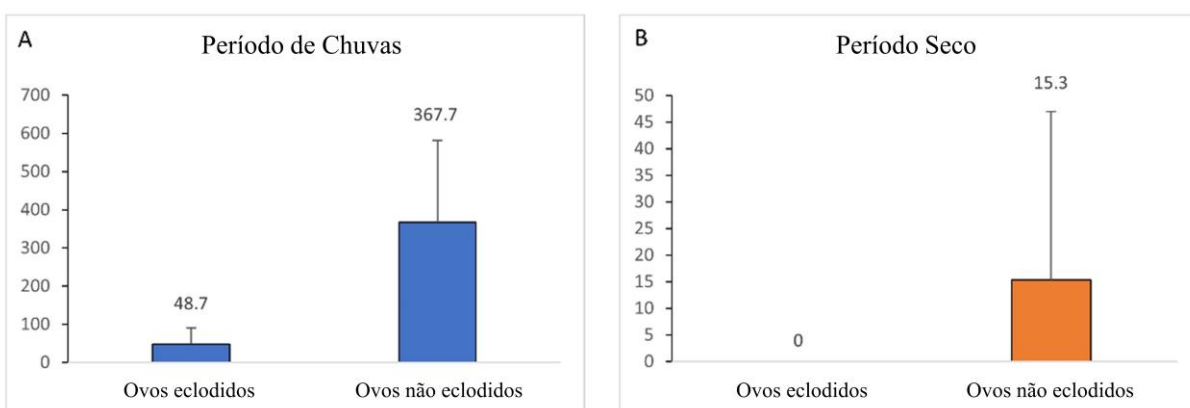


Figura 19. Média e desvio padrão do número de ovos eclodidos e não eclodidos coletados nos períodos de chuva e seco na localidade da RPPN Gaviões.

Período de coleta de junho a setembro de 2020 na RPPN Gaviões nas estações chuvosa (A) e seca (B).

Dentre as espécies de interesse epidemiológico, a mais abundante foi o *Hg. leucocelaenus* (n=1041), representando 85% de todos os culicídeos coletados. As demais espécies vetoras de agentes etiológicos apresentaram níveis de abundância similares entre si: *Ae. terrens* (n=88) 7%, *Hg. janthinomyx* (n=62) 5%, e *Ae. albopictus* (n=40) 3% (Figura 20 A). Uma diferença significativa com valor de p de 0011 ($p \leq 0,05$) foi observada entre os registros de quantidade de ovos das espécies avaliadas. Essas diferenças foram evidentes entre *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomyx* ($p = 0,009$), *Hg. leucocelaenus* e *Ae. albopictus* ($p = 0,012$) e *Hg. leucocelaenus* e *Ae. terrens* ($p = 0,003$).

O maior pico de ocorrência de culicídeos na RPPN Gaviões foi observado no mês de verão de dezembro de 2019, durante a estação chuvosa. Esse pico foi alcançado depois que as populações de culicídeos começaram a aumentar na primavera, de setembro a novembro de 2019. Após o pico de dezembro, o declínio populacional começou em janeiro, que ainda está dentro da estação chuvosa de verão, apresentando um número elevado de culicídeos (n=256), e continuou caindo até março de 2020 (n = 38). A abundância de culicídeos aumentou mais uma vez em abril (n = 60), diminuiu em maio (n = 0), sofreu um leve incremento em junho (n = 14) e ocorreu decréscimo novamente para n = 0 nos quatro meses seguintes. Poucos exemplares de culicídeos foram detectados novamente em novembro de 2020 (n = 4), e picos mais expressivos foram observados durante a estação chuvosa de verão em dezembro de 2020 (n = 68) e janeiro de 2021 (n = 89) (Figura 20 B). Por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn, foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na abundância de culicídeos entre janeiro e o mês de inverno de junho de 2020, durante a estação seca ($p = 0,05$).

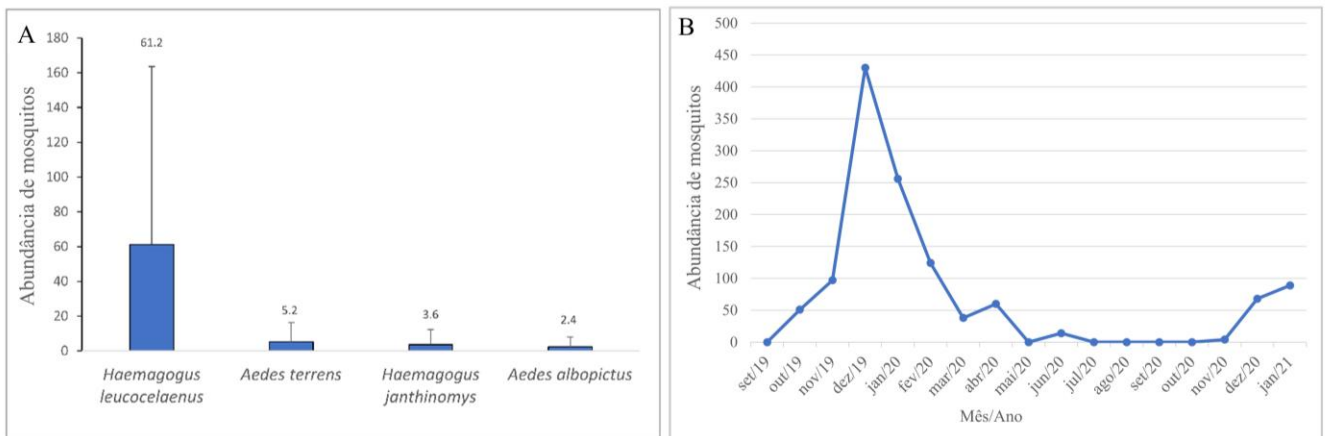


Figura 20. Espécies de importância médica e abundância de mosquitos ao longo período de coleta na RPPN Gaviões.

Culicidae de interesse epidemiológico coletados de setembro de 2019 a janeiro de 2021 na Reserva de Gaviões. (A) Média e desvio padrão para *Haemagogus leucocelaenus*, *Aedes terrens*, *Haemagogus janthinomys* e *Aedes albopictus*. (B) Abundância mensal de mosquitos de setembro de 2019 a janeiro de 2021.

Ovitampas positivas para o encontro de ovos foram avaliadas para determinar a abundância das diferentes espécies de Culicidae. As ovitampas com maior número de ovos foram: 9 (n=178) e 5 (n=152), contendo ovos de todas as espécies epidemiologicamente relevantes identificadas neste estudo, 8 (n=93), com ovos de *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*, e 4 (n=77), com ovos de *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys* e *Ae. albopictus*.

A espécie mais abundante foi *Hg. leucocelaenus*, com elevado número de espécimes nas ovitampas 9 (n=146) e 5 (n=137). De todas as ovitampas, os maiores números de *Hg. janthinomys*, foram detectados nas armadilhas 4 (n=26) e 9 (n=11). *Aedes albopictus* foi mais abundante nas armadilhas 3 (n= 27) e 9 (n= 7) do que nas demais armadilhas, enquanto os maiores números de *Ae. terrens* foram registrados para as armadilhas 9 (n=14) e 3 (n=12). A espécie mais abundante, encontrada em todos os locais amostrados, foi *Hg. leucocelaenus*, sendo a única espécie encontrada nos sítios 1, 2, 7 e 10. *Hg. janthinomys* foi encontrado em 70% dos sítios, *Aedes albopictus* em 40% e *Ae. terrens* em 30%. *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* foram frequentemente encontrados juntos no mesmo habitat larval, em 6 dos 10 locais de coleta (Figura 21).

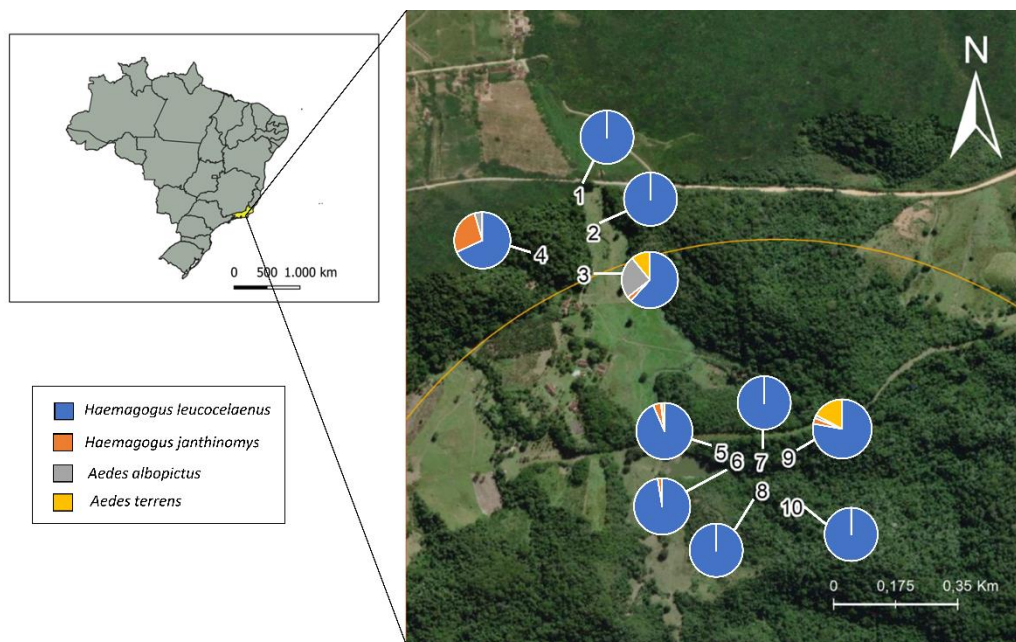


Figura 21. Frequência de espécies de importância médica coletados de setembro de 2019 a janeiro de 2021 na área da RPPN Gaviões. Fone: Shayenne O. F. Silva.

Das 30 palhetas coletadas das ovitrampas, 10 continham ovos de diferentes espécies de culicídeos simultaneamente. As espécies mais encontradas com ovos na mesma paleta foram *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*, que realizou oviposição sobreposta em oito das dez paletas. Todas as espécies que realizaram oviposição na mesma paleta foram positivamente correlacionadas. Assim, o teste de correlação de Spearman detectou uma correlação positiva forte e estatisticamente significativa ($\rho = 0,74$) entre *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*. Uma correlação positiva, mas não significativa, também foi observada para a sobreposição de oviposição entre *Ae. terrens* e *Hg. janthinomys* ($\rho = 0,20$), e entre *Hg. leucocelaenus* e *Ae. albopictus* ($\rho = 0,10$) (Figura 22).

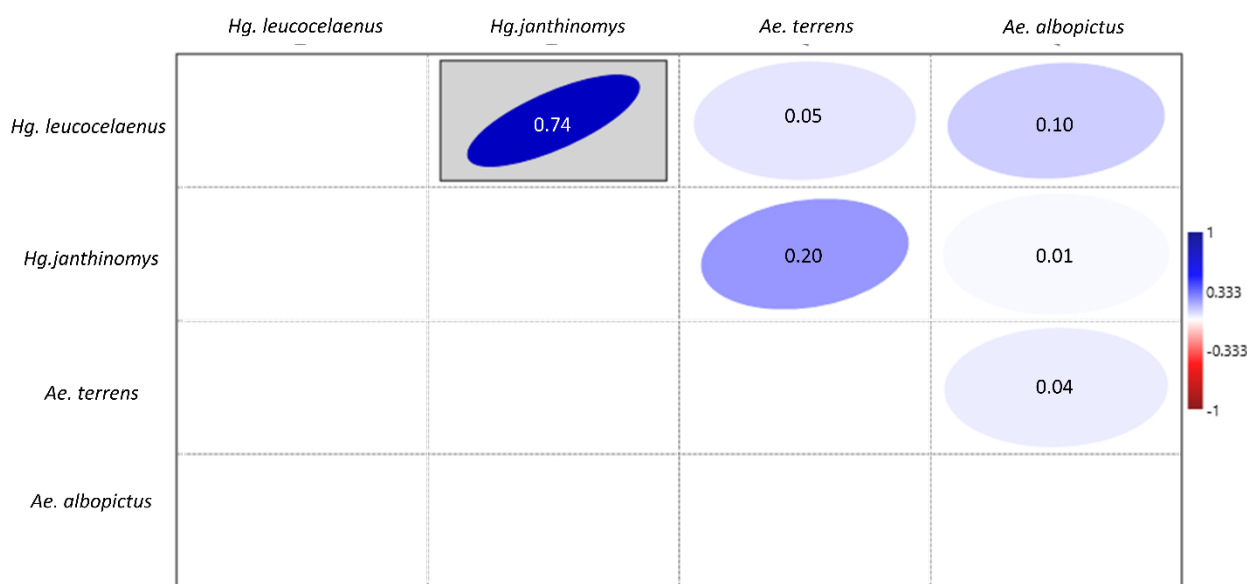


Figura 22. Correlação de espécies de importância médica na RPPN Gaviões.

Gráfico de correlação para a abundância de ovos das espécies: *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. albopictus* e *Ae. terrens* que realizaram a oviposição nas mesmas paletas de coletas realizadas de setembro de 2019 a janeiro de 2021 na RPPN Gaviões.

4.4 A Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca

Dos 3.601 ovos coletados durante todo o período de amostragem, 141 (3,9%) já estavam eclodidos nas paletas. Dos 3.460 ovos viáveis e eclodidos em laboratório, 1.310 ovos (37,9%) pertenciam as seguintes espécies de relevância epidemiológica *Hg. leucocelaenus* (n=1.131; 86%), *Aedes terrens* Walker 1856 (n=111; 8%), *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (n=47; 4%) e *Hg. janthinomys* (n=21; 2%).

O número de ovos de Culicidae coletados apresentou diferença altamente significativa ($p \leq 0,01$) entre os períodos chuvoso e seco ($p = 0,005$) (Figura 23 A). O mês com maior abundância de ovos foi dezembro de 2019, representando 24% de todos os ovos coletados durante o período de estudo e assim registrando os maiores IDOs e IDLs. A partir de janeiro de 2020, houve queda do IPO, que só voltou a aumentar em dezembro de 2020 e janeiro de 2021 (70%) (Tabela 4). Com o passar do tempo, é possível notar uma diminuição no número de ovos do início ao fim do período de coleta (Figura 21 B). A diminuição da população de Culicidae na área de estudo durante os meses mais frios (julho, agosto e setembro de 2020) pode ter influenciado no menor número de ovitrampas positivas, já que o IPO foi zero (Tabela 4).

Tabela 4. Índices descritivos de coleta de ovos na Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca, localizado no município de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Brasil

Mês/Ano	IPO (%)	IDO (n)	IMO (n)	IPL (%)	IDL (n)	IML (n)	Total	
							Ovos	Larvas
set/19	0	0	0	0	0	0	0	0
out/19	0,20	20,50	0,92	0,20	18	1,50	41	36
nov/19	0,90	45,11	10,35	0,90	36,89	12,30	406	332
dez/19	0,70	121,29	8,05	0,50	58,20	14,55	849	291
jan/20	0,90	51,11	9,70	0,90	42,11	12,63	460	379
fev/20	0,60	37	5,82	0,60	31,33	7,52	222	188
mar/20	0,20	65,50	4,60	0,20	57,50	4,93	131	115
abr/20	0,30	51	3,20	0,30	50,33	5,59	153	151
mai/20	0,10	14	0,33	0,20	7	0,63	14	14
jun/20	0,10	10	0,17	0,10	10	0,33	10	10
jul/20	0	0	0	0	0	0	0	0
ago/20	0	0	0	0	0	0	0	0
set/20	0	0	0	0	0	0	0	0
out/20	0,10	3	0,06	0,10	3	0,11	3	3
nov/20	0,20	49	1,35	0,20	12	0,80	98	24
dez/20	0,70	54,57	4,95	0,70	38,29	8,93	382	268
jan/21	0,70	76,71	11,70	0,40	29,25	4,88	537	117
fev/21	0,20	19	0,66	0,20	8,50	0,59	38	17
mar/21	0,30	57,67	5,89	0,30	51	6,65	173	153
abr/21	0,30	28	1,35	0,40	15	2	84	60

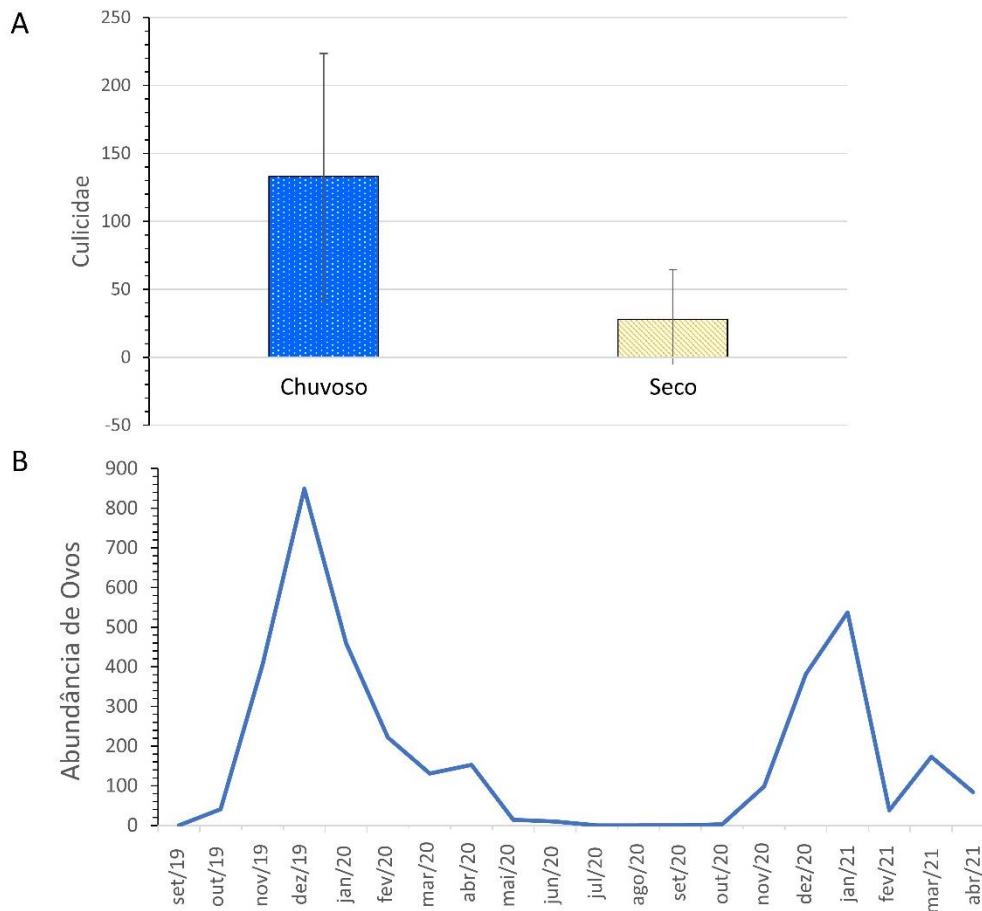


Figura 23. Abundância de ovos durante o período de coleta em Figueira Branca.

Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$) entre o número de ovos de Culicidae coletados nos períodos chuvoso e seco ($p = 0,005$) (A). Abundância de ovos durante o período de coleta (19/09 a 21/04/21) na Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca (B).

Foi aplicada uma análise de regressão entre o número de ovos coletados e as variáveis ambientais temperatura, precipitação e umidade relativa do ar para avaliar se havia ou não correlação entre a abundância de ovos e as variáveis climáticas. Desta forma, o maior coeficiente de determinação foi obtido para a variável precipitação ($r^2 = 0,709$; $p = 0,002$), indicando que esta variável explicou cerca de 71% de uma variação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) no número de ovos. O coeficiente de determinação em relação à temperatura foi $r^2 = 0,429$, com $p = 0,040$, correlação positiva e estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Por outro lado, para a variável umidade, os valores foram $r^2 = 0,176$ e $p = 0,227$, mostrando uma correlação positiva, mas não estatisticamente significativa (Figura 24).

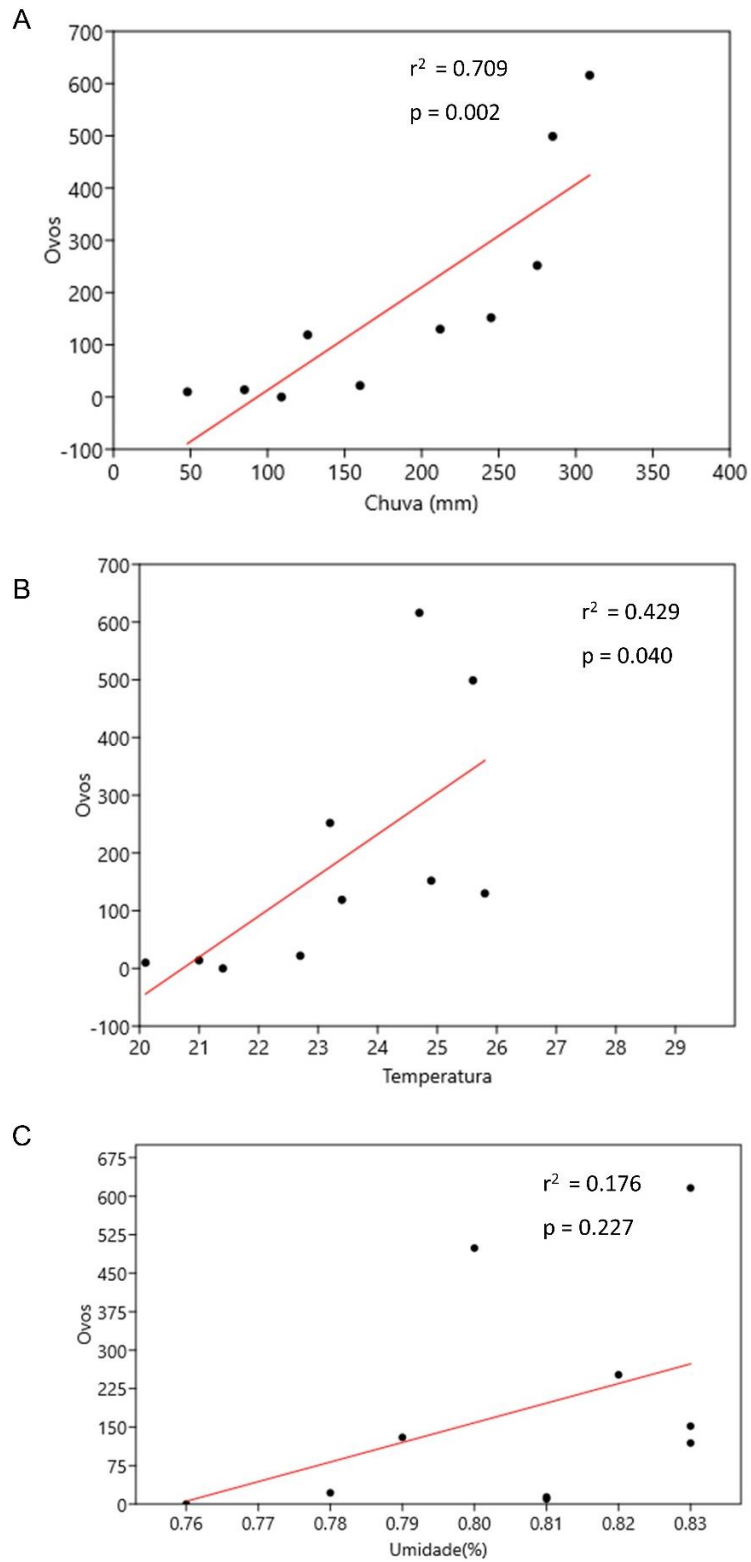


Figura 24. Análise de Regressão do número de ovos e variáveis ambientais. Variáveis ambientais chuva (A), temperatura (B) e umidade relativa do ar (C).

As ovitrapas 3, 9 e 10 apresentaram as maiores médias e totais (n= 727, 250 e 389 respectivamente) de ovos coletados (Figura 25 A). Em relação à razão de machos e fêmeas, o sexo feminino apresentou maior percentual (54%) quando comparado ao masculino (46%) (Figura 25 B). Em relação às frequências de espécies epidemiologicamente relevantes, as maiores frequências de *Hg. leucocelaenus* foram detectados nas ovitrapas 3, 10 e 8, enquanto *Ae. albopictus* foi mais frequente na ovitrapa 1, *Ae. terrens* nas ovitrapas 3 e 4, e *Hg. janthinomys* na ovitrapa 7. As espécies mais encontradas na Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca foram: *Hg. leucocelaenus* (86%) e *Ae. terrens* (8%), enquanto *Ae. albopictus* e *Hg. janthinomys* foram as espécies menos frequentes (4 e 2%, respectivamente).

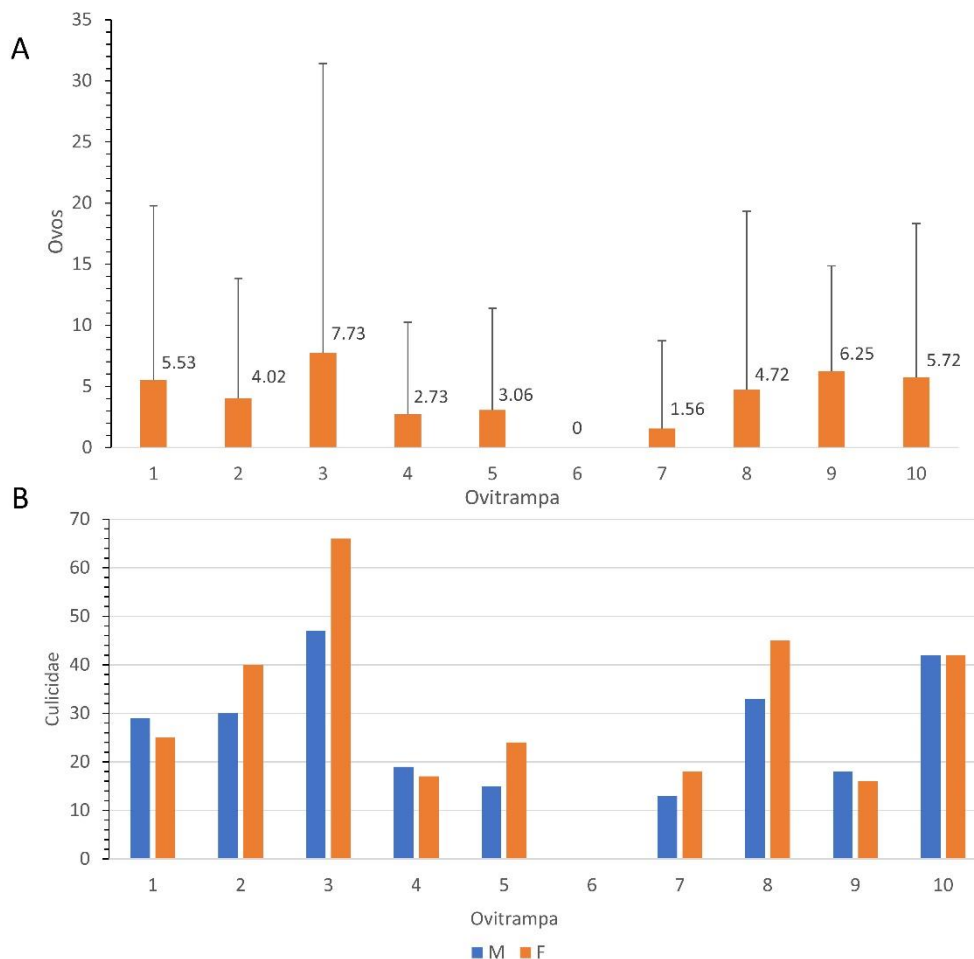


Figura 25. Média e desvio padrão do número de ovos por ovitrapa (A), razão macho/fêmea (B).

Algumas espécies vetoras foram observadas realizando oviposição na mesma ovitrampa. Assim, os dados de frequência das espécies foram analisados para avaliar as correlações entre as diferentes espécies encontradas no mesmo criadouro. Dessa forma, avaliamos se essas espécies estavam correlacionadas positiva ou negativamente. Embora não estatisticamente significantes ($p \geq 0,05$), as correlações entre as espécies foram em sua maioria positivas. O maior índice de correlação de Spearman foi observado entre *Ae. albopictus* e *Ae. terrens* ($\rho = 0,52$), com *Ae. terrens* sendo 8% mais abundante que *Ae. albopictus*. Uma correlação positiva também foi detectada entre *Ae. terrens* e *Hg. leucocelaenus* ($\rho = 0,49$), e entre *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* ($\rho = 0,37$) e entre *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus* ($\rho = 0,37$) (Figura 26).

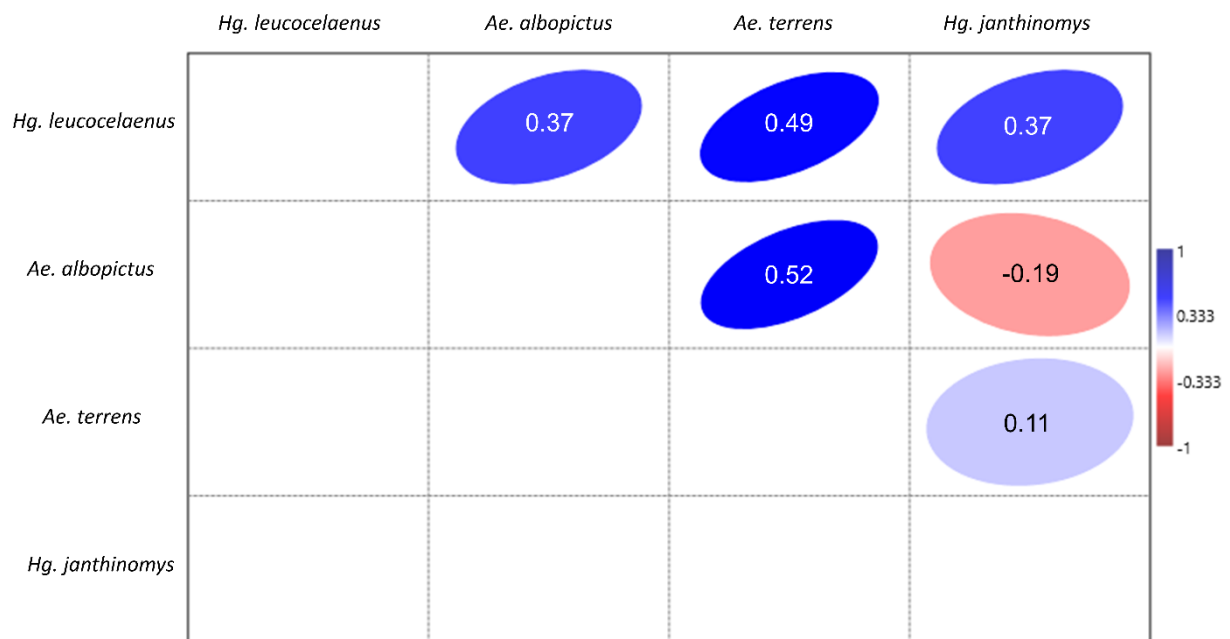


Figura 26. Índice de correlação de Spearman entre espécies de mosquitos de importância epidemiológica.

4.5 Detecção Viral em culicídeos de importância médica coletados em fragmentos de Mata Atlântica

Usando um RT-PCR de pan-flavivírus sensível, projetado para detectar a região NS5, pools de *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus*, foram positivos para ZIKV e febre amarela (YFV). O RNA do vírus foi detectado em grupos de machos e fêmeas adultos criados a partir de ovos coletados em campo (Tabela 5).

Tabela 6. Amostras de culicídeos positivas para *Flavivírus* em diferentes fragmentos de Mata Atlântica no Rio de Janeiro, Brasil.

ID do pool *	Mosquito Species	Sexo	Total	Mês ano Coletado	Geográfico Coordenadas	Armadilha Identificação	Pan-Flavivírus Resultado PCR	Corresp. da sequência
43	<i>Ae. albopictus</i>	♀	32	Jan/19	22°33'001.3" S 42°00'052.7" W	TMPRNH - 32 *	Positivo	ZIKV
45	<i>Ae. albopictus</i>	♂	2	Out/2018	22°31'040.1" S 42°02'058.6" W	TMF -2 *	Positivo	ZIKV
62	<i>Ae. albopictus</i>	♀	9	Out/2018	22°31'043.9" S 42°02'056.8" W	TMF -3 *	Positivo	YFV
64	<i>Hg. leucocelaenus</i>	♂	3	Set/2018	22°31'049.5" S 42°02'056.3" W	TMF -7 *	Positivo	YFV
65	<i>Hg. leucocelaenus</i>	♂	5	Out/2018	22°31'049.5" S 42°02'056.3" W	TMF -7 *	Positivo	YFV

*ID do pool, número de identificação do pool de mosquitos processado. TMF, Fazenda Três Montes, sites 2, 3 e 7; TMPRNH, Reserva Particular do Patrimônio Natural de Três Morros, sítio 32.

5 DISCUSSÃO

5.1 Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João

Foi constatado que as três espécies de mosquitos registradas neste estudo já haviam sido coletadas com auxílio de ovitrampas em ambiente silvestre, inclusive em remanescentes de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro [88]. A serapilheira adicionada ao conteúdo aquático das armadilhas de ovitrampas tem o objetivo de simular condições dos criadouros formados por ocos de árvores [110]. Formas imaturas das espécies *Ae. terreus* e *Hg. leucocelaenus* são comumente encontrados em buracos de árvores [111]. *Aedes albopictus* possui registros de ocorrência menos frequente nesse tipo de habitat larval do que os outros dois, por se tratar de uma espécie cuja ocorrência, em ambiente silvestre, limita-se às áreas mais impactadas pela atividade humana [112].

Os resultados deste estudo mostraram uma prevalência de *Hg. leucocelaenus*, nas estações verão e inverno. Outros estudos realizados com ovitrampas em fragmentos de Mata Atlântica no Rio de Janeiro também indicaram dominância dessa espécie, muitas vezes em todas as estações do ano [113]. *Aedes albopictus* foi a segunda espécie mais abundante, a qual foi dominante no outono. Silva et al. (2018) [114] observaram que *Ae. albopictus* também foi a segunda espécie mais abundante em ovitrampas instaladas em áreas florestais. Em um estudo utilizando ovitrampas para monitorar *Ae. albopictus* em uma área urbana do estado de São Paulo, esta espécie esteve presente durante o verão e outono, com pico de atividade em abril [115]. *Aedes terreus* foi a espécie menos abundante, cuja presença foi mais prevalente na primavera e quase ausente no inverno. Em um estudo desenvolvido por Silva et al. (2021), *Ae. terreus* também foi menos frequente em ovitrampas instaladas em área florestal do Rio de Janeiro do que *Hg. leucocelaenus* e *Ae. albopictus* [116]. Campos (2016) observou em criadouros naturais formados por tocos de bambu que *Ae. terreus* ocorreu apenas na primavera, estando ausente nas demais estações do ano [117].

A maior abundância absoluta de ovos, bem como a maior similaridade na composição de espécies registradas na estação climática do outono e no verão (Tabela 1 e Figura 2), indicam que essas estações possivelmente oferecem condições climáticas que favorecem a proliferação de mosquitos, principalmente de *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus*. Embora vários estudos sugiram que a estrutura e a complexidade do

ambiente tenham um efeito importante na diversidade e composição das espécies de mosquitos [118], as variações nas condições climáticas também são um elemento importante [119]. Conforme relatado em outros estudos, o aumento das chuvas e da temperatura no verão permite o aumento das populações de mosquitos devido à formação de novos criadouros e à intensificação da atividade desses insetos [120–122]. Em nossas observações, conforme relatado anteriormente, o outono mostrou-se muito semelhante ao verão, o que pode ser explicado pelo atraso nas mudanças climáticas influenciadas pela sazonalidade que afeta as comunidades de mosquitos. Provavelmente, as condições climáticas geradas no verão ainda estavam influenciando os registros de mosquitos realizados ao longo do outono. Em estudo de Couto-Lima et al. (2020), por exemplo, a temperatura influenciou significativamente as abundâncias de *Hg. leucocelaenus* coletados quatro semanas depois [123].

A abundância de *Hg. leucocelaenus*, *Ae. albopictus* e *Ae. terrens* apresentaram valores semelhantes na primavera quando comparados às demais estações. Isso implicou maiores valores de Diversidade Shannon (H) e Equabilidade de Pielou (J) e menores valores de Dominância (D). A alta abundância de *Hg. leucocelaenus* no verão, de *Ae. albopictus* no outono e a reduzida abundância no inverno influenciaram os resultados com menores valores de H e J, e maiores valores de D nessas estações (Tabela 1). Ao contrário do que foi encontrado neste estudo, Guedes & Navarro-Silva (2014) coletaram mosquitos adultos em uma área de Mata Atlântica no estado do Paraná e observaram menores valores de uniformidade e diversidade e maior dominância durante a primavera [124]. Esse padrão também foi observado por Cardo et al. (2012), que estudaram formas imaturas de mosquitos em diferentes criadouros em uma área selvagem da Argentina [125].

Não houve correlação significativa entre a abundância de ovos das três espécies e fatores climáticos, exceto para *Ae. albopictus*, que apresentou correlação positiva com a temperatura (Figura 2). Esse resultado corrobora o estudo de Silva et al. (2021) realizado em uma região próxima à APA do Rio São João utilizando ovitrampas e mostrando uma correlação positiva entre a abundância de ovos de *Ae. albopictus* e temperatura [116]. Neste estudo, foi adotado a metodologia de adição de água às ovitrampas, que eram revisadas a cada 15 dias quando as palhetas eram trocadas e adicionada água. Por esses meios, eventualmente, em períodos mais secos e quentes, as armadilhas continuaram a ter água disponível para a oviposição das fêmeas dos

mosquitos. Essa metodologia pode ter influenciado na falta de correlação significativa entre precipitação e abundância de ovos.

Em conclusão, a sazonalidade pareceu influenciar a atividade de oviposição das três espécies registradas. O verão e o outono podem ser considerados as estações mais críticas para *Ae. albopictus* e *Hg. leucocelaenus*, o que deve ser considerado em quaisquer estratégias de profilaxia e controle entomológico implementadas na Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João.

5.2 Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO)

A maior quantidade de ovos foi observada na trilha Cartão Postal (2.284 ovos), a qual possui o maior desnível (140 m) comparada com as demais trilhas do parque [126]. Esta trilha é composta por pequenos cursos d'água e floresta de encosta, que proporcionam um ambiente úmido, tais características tornam esse ponto favorável ao encontro de criadouros naturais de culicídeos, como várzeas, tocas de animais, bromélias e folhas caídas no solo [3,127]. Uma maior oferta de criadouros pode estar associada ao maior número de adultos e conseqüentemente de ovos de culicídeos encontrados nessa trilha. Esses achados estão de acordo com Lopes et al. (1997), no qual os autores demonstraram que ambientes com uma mata mais densa e solo mais úmido foram os locais com o maior número registrado de capturas de culicídeos. Considerando que o solo úmido favoreceu o encontro de um maior número de culicídeos, estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, no qual foi possível observar um número muito maior de ovos, de culicídeos de uma forma geral, coletados nas ovitrampas ao nível do solo do que na copa das árvores [128]. Contudo ovos da espécie *Hg. leucocelaenus* apresentam um comportamento de oviposição diferente, tendo a maioria de seus ovos presentes nas alturas mais elevadas (6m, 12m e 9m, respectivamente) das árvores, próximo a copa, o que está em concordância com a ideia de que culicídeos desta espécie apresentam hábitos acrodendrófilos ou seja, são mais encontrados nas copas das árvores [129].

O mês de janeiro apresentou a temperatura mais alta quando comparado aos outros meses de coleta, este pico coincidiu com um elevado número de ovos de culicídeos (2.056 ovos) representando 31% do total de ovos coletados. Conforme observado, houve uma correlação positiva forte de 0,755 entre o número de ovos

coletados ao longo do período de estudo e a temperatura local. A temperatura é um fator abiótico conhecido por exercer uma influência notável sobre as populações de culicídeos [130,131].

A estação chuvosa demonstrou um número mais elevado de ovos encontrados quando comparada com a estação seca, assim como também foi possível observar uma correlação positiva moderada (0,625) do número de ovos de culicídeos com a pluviosidade, achados que corroboram com outros estudos que também demonstram uma forte influência e correlação dos regimes de chuvas de uma determinada região e o aumento no número de culicídeos ali presentes [132].

Essas observações tornam possível que haja uma previsibilidade do aumento no número de culicídeos encontrados em uma determinada região de acordo com as mudanças climáticas e os fatores abióticos daquele ambiente. Auxiliando assim, os sistemas de vigilância e controle de arboviroses consideradas patogênicas para a população humana que reside em regiões próximas a locais de mata e com a presença destes culicídeos vetores.

5.3 Reserva Particular do Patrimônio Natural Gaviões (RPPN Gaviões)

Populações de mosquitos que habitam fragmentos de Mata Atlântica parecem ser afetadas pela sazonalidade, o que pode, portanto, impactar também na dinâmica de transmissão de arboviroses [133,134]. O maior percentual de ovos de culicídeos foi registrado durante a estação chuvosa (dezembro de 2019, janeiro, fevereiro, março, dezembro de 2020 e janeiro de 2021), enquanto números menores foram observados para a estação seca (junho, julho e agosto de 2020). Da mesma forma, um estudo realizado na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Reserva Ecológica do Guapiaçu (REGUA) também no Estado do Rio de Janeiro registrou os maiores números de mosquitos em abril e dezembro (outono e verão, respectivamente), e os menores em junho e outubro (inverno e primavera, respectivamente) [135].

No entanto, essa coincidência não é o caso de outros biomas, conforme relatado por Freire et al. (2021) em um estudo em um fragmento de floresta tropical seca sazonal (bioma Caatinga) da Unidade de Conservação Floresta Nacional de Açú [136]. Freire et al. relataram que o número total de culicídeos coletados variou amplamente, com

setembro de 2011 e julho e maio de 2013 tendo uma abundância de culicídeos significativamente maior do que em outros meses. Isso mostra como o bioma pode desempenhar um papel essencial na dinâmica das populações de mosquitos em diferentes regiões do Brasil. A espécie de importância epidemiológica mais abundante foi *Hg. leucocelaenus*, representando mais de 80% de todas as espécies de culicídeos vetores identificados. Coincidentemente, essa espécie também foi a mais abundante em todas as estações do ano no Parque Municipal Córrego da Luz de Casimiro de Abreu, estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil [116]. Além disso, a temperatura foi um fator determinante no aumento do tamanho da população de *Hg. leucocelaenus* em um estudo realizado em Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, que mostrou que a probabilidade de encontrar ovitrampas contendo ovos aumentava quando a temperatura média estava acima de 24°C [123]. Este estudo está em concordância com esses achados, uma vez que uma alta frequência de *Hg. leucocelaenus* foi registrada durante os meses de dezembro de 2019 e janeiro e fevereiro de 2020, meses de verão no Brasil, caracterizados por altas temperaturas.

5.4 A Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca

Mosquitos do gênero *Haemagogus* habitam regiões de florestas tropicais, são mais ativos durante as horas mais quentes do dia e possuem hábitos acrodendrófilos. Esses mosquitos raramente saem da mata, ficando expostos aos fatores meteorológicos dos fragmentos florestais que habitam [32]. Da mesma forma, algumas espécies do gênero *Aedes* também são encontradas em áreas preservadas, associadas a ambientes florestais e/ou rurais, como as encontradas neste estudo *Ae. albopictus* e *Ae. terrens* [116,137]. Além disso, sabe-se que variáveis climáticas, incluindo precipitação, temperatura e umidade, influenciam as populações de Culicidae. Assim, esses fatores ambientais podem afetar a abundância e a atividade de mosquitos vetores, que por sua vez afetam a transmissão de arbovírus [114,135,138].

No presente estudo, a abundância de ovos de Culicidae demonstrou uma correlação significativamente alta com a pluviosidade, variável climática que explicou 71% da variação no número de ovos. Um estudo realizado em 2016 por Silva et al., em remanescentes de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, mostrou que a variável precipitação foi significativamente correlacionada com a abundância de ovos de

mosquito ($p=0,003561$) [114]. Três anos depois, esse fator climático continua exercendo forte influência sobre a população de mosquitos vetores que habitam fragmentos florestais dentro desse mesmo bioma brasileiro [139]. Também foi observada uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre abundância de ovos e temperatura. A mesma correlação foi observada em estudo realizado em Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, para ovos de *Hg. leucocelaenus*, com incremento na probabilidade de encontrar mais de 50% de ovitrampas positivas quando a temperatura média foi superior a 24°C [123]. O pico da abundância de ovos de Culicidae em dezembro de 2019 coincide com o período sazonal da FA (de dezembro a maio) e a detecção do vírus entre primatas não humanos (PNH) [140]. As fêmeas representaram 54% dos Culicidae que emergiram dos ovos coletados nas ovitrampas, 8% a mais que os machos. Mais fêmeas do que machos em populações de Culicidae aumentam o risco de transmissão de patógenos, uma vez que apenas mosquitos fêmeas têm comportamento hematófago [8].

Um crescente interesse em estudar a biologia e ecologia do mosquito *Hg. leucocelaenus* se desenvolveu devido ao papel desta espécie de mosquito no ciclo silvestre do YFV e potencialmente outros arbovírus [141]. Esta foi a espécie de importância médica com maior frequência (81%) encontrada em nosso estudo. Da mesma forma, a predominância dessa espécie vetora foi observada em 2015 no Parque Nacional do Itatiaia da Reserva Biológica Poço das Antas e na Reserva Particular do Patrimônio Natural Bom Retiro, ambos no estado do Rio de Janeiro [39]. A segunda maior frequência observada foi para *Ae. terrens*, esta espécie já apresentou altas taxas de infecção e disseminação do CHIKV em condições experimentais [90]. Esta é uma espécie arbórea, capaz de se reproduzir em buracos de árvores e se alimentar de primatas não humanos (NHP) perto das copas das árvores e humanos ao nível do solo [33,142,143].

Aedes terrens e *Ae. albopictus* realizaram a oviposição no mesmo criadouro (ovitrampa) e apresentaram forte correlação positiva ($\rho = 0,52$) entre eles. Esse comportamento mostra que além de realizar a oviposição em criadouro positivo, esses Culicidae aparentemente preferem criadouros já colonizados por ovos do mesmo gênero e/ou espécie. Este comportamento foi relatado por Barbosa e Silva (2002) para a espécie *Ae. albopictus*, mostrando que este Culicidae prefere ovipor em locais com imaturos da mesma espécie, em condições de laboratório [144].

Haemagogus leucocelaenus também apresentou correlação positiva com uma espécie cogenérica, *Hg. janthinomys*, ($\rho = 0,37$) e com *Aedes terreus* ($\rho = 0,49$). Coincidentemente, Inácio et al. 2020 observaram criadouros compartilhados entre *Hg. spegazzinii* e outras espécies, como *Ae. albopictus*, *Ae. terreus*, *Culex* spp., e *Toxorhynchites theobaldi*. Assim, espécies do gênero *Haemagogus* aparentemente preferem realizar oviposição em criadouros já colonizados pelo mesmo gênero ou por espécies de Culicidae diferentes. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de que esses culicídeos compartilham o mesmo nicho ecológico, sendo mosquitos silvestres os quais se reproduzem e se alimentam próximo às copas das árvores e colocam seus ovos em criadouros úmidos próximos à superfície da água [8].

De forma alarmante, a coleta de ovos mostrou a ocorrência, na área de estudo, dos principais vetores da FAS *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys*, uma espécie com potencial vetorial para o CHIKV, *Ae. terreus* e *Ae. albopictus*, uma espécie conhecida mente vetora dos vírus da dengue no sul e leste da Ásia e um vetor secundário de DENV nas Américas. A presença desses vetores serve de alerta para a população que reside no entorno da área de coleta [41,145]. Além disso, o elevado número de culicídeos vetores primários de arbovírus no Brasil, torna imperativo o monitoramento de casos de doenças febris na população local e comunidades do entorno.

6 CONCLUSÕES

- Foram encontradas espécies de culicídeos capazes de transmitir agentes causadores de doenças ao homem e/ou outros animais em todos os remanescentes de Mata Atlântica analisados, tais como *Haemagogus* spp., *Aedes* spp., *Culex* spp.
- As variáveis abióticas pluviosidade e temperatura foram correlacionadas de forma positiva e significativa com a abundância de ovos de culicídeos na Área de Proteção Ambiental (APA) Figueira Branca e no Parque Nacional Serra dos Órgãos (PNSO).
- O número de ovos foi maior na estação chuvosa quando comparado com a seca em todas as áreas de coleta do estudo. Sendo possível constatar uma diferença estatisticamente significativa entre eles.
- Espécies de importância médica foram observadas realizando oviposição no mesmo criadouro, indicando que a presença de formas imaturas de uma não parece ser um fator impedor para a oviposição de outra espécie. Esse fato foi observado entre as espécies: *Aedes terreus* e *Ae. albopictus*; *Hg. leucocelaenus* e *Hg. janthinomys* e entre *Ae. terreus* e *Hg. leucocelaenus*.
- Foi verificada a correlação entre as espécies de importância médica encontradas compartilhando o mesmo criadouro e observou-se correlação positiva entre todas as avaliadas, com a exceção de *Ae. albopictus* e *Hg. janthinomys*.
- *Haemagogus leucocelaenus* foi a espécie de importância médica mais abundante em todos os fragmentos de Mata Atlântica estudados.
- Foi detectado ZIKV e YFV em *Hg. leucocelaenus* e *Ae. albopictus*. Os achados aqui apresentados sugerem transmissão e infecção desses arbovírus nessas espécies de culicídeos em fragmentos de Mata Atlântica no Rio de Janeiro, Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Borror J. Introdução ao estudo dos insetos. São Paulo: Edgar Blucher; 1988. 816 p.
2. Harbach R. Family Culicidae Meigen, 1818 [Internet]. 2008. Available from: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/family-culicidae-meigen-1818>
3. Forattini OP. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo; 2002. 549 p.
4. Rey L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 910 p.
5. Harbach R. Mosquito Taxonomic Inventory [Internet]. 2008. Available from: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6045>
6. Wilkerson R. Mosquitoes of the World. 1^a. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2015. 1308 p.
7. Alencar J, De Mello CF, Serra-Freire NM, Guimarães AÉ, Gil-Santana HR, Gleiser RM. Biodiversity and temporal distribution of immature culicidae in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro State. PLoS One. 2016;11(7):1–15.
8. Consoli RAGB, Oliveira RL de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1994. 228 p.
9. Monnerat AT, Soares MJ, Lima JBP, Rosa-Freitas MG, Valle D. Anopheles albitalarsis eggs: Ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. J Insect Physiol. 1999;45(10):915–22.
10. Rezende G. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. [Rio de Janeiro]: Fiocruz; 2008.
11. Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*. Zootaxa [Internet]. 2007 Dec 21;1668(1):591–638. Available from: <https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.1668.1.28>
12. Fuller HS. *Aedes Aegypti*: The Yellow Fever Mosquito. Am J Trop Med Hyg. 1961;10(1):112–3.
13. Clements AN. The physiology of mosquitoes. International Series of Monographs on pure and applied biology. New York: The Macmillan Company;

1963. 393 p.
14. Forattini OP. *Culicidologia Médica*. 2nd ed. Editora da Universidade de São Paulo, editor. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo; 1996. 862 p.
 15. Fiocruz. *Invivo. Biologia do Aedes aegypti*. [Internet]. 2019 [cited 2022 Jan 24]. Available from:
<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1407&sid=8>
 16. Ward RA. Second Supplement to “A Catalog of the Mosquitoes of the World” (Diptera: Culicidae). [Internet]. Washington: Walter Reed Army Institute of Research; 1984. 43 p. Available from: https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Ward_1984.pdf
 17. OMS. Mosquito Borne Diseases [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 12]. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en
 18. Christophers SR. *Aedes aegypti (L.). The yellow fever mosquito - its life history, bionomics and structure*. London: Cambridge University Press; 1960. 739 p.
 19. Beauty BJ e Marquardt WC. Fleas and the agents they transmit. *The Biology of Disease Vectors*. II. Barry J. Beaty WCM, editor. Michigan: University Press of Colorado; 1996. 632 p.
 20. Rey S, Zuza I, Martínez-Mondéjar B, Rubio JM, Merino FJ. Imported malaria in an area in southern Madrid, 2005-2008. *Malar J* [Internet]. 2010 Dec 20;9(1):290. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/9/1/290>
 21. Benenson AS. *El control de las enfermedades transmisibles en el hombre*. 10th ed. John E. Gordon, Ph.D., M.D., editor. Washington,: Asociación Americana de Salud Pública; 1965. 318 p.
 22. Schreiber W. *Infectio*. São Paulo: Roche; 1991. 115 p.
 23. Veronesi R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. 1082 p.
 24. SVS. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. Vol. 53, *Boletim Epidemiológico*. 2022.
 25. MS. Ministério da Saúde constata redução de casos de malária na Região Amazônica [Internet]. 2022. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/novembro/ministerio-da-saude-constata-reducao-de->

- casos-de-malaria-na-regiao-amazonica#:~:text=Entre os períodos de janeiro,a
vigilância epidemiológica no país.
26. SVS. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, Chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 35, 2021 [Internet]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2021. Available from: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-07-2022.pdf>
 27. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Mosquitos de importância sanitária do Brasil [Internet]. 1a ed. Coimbra C, Cori M, Pessanha C, Hoomen H, Benchimol J, Carneiro J, et al., editors. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994. 228 p. Available from: <http://books.scielo.org>
 28. MS. Malária [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 18]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>
 29. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. CABI International, editor. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1998 Jul;11(3):480–96. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.11.3.480>
 30. Lounibos LP. Invasions by Insect Vectors of Human Disease. Annu Rev Entomol [Internet]. 2002 Jan;47(1):233–66. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.47.091201.145206>
 31. SVS. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 7, 2022 [Internet]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2022. Available from: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-07-2022.pdf>
 32. Marcondes CB, Alencar J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera : Culicidae) do Brasil. Rev Biomed [Internet]. 2010;21(3):221–38. Available from: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb102139.pdf>
 33. Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. Contrib Am Entomol Inst. 1973;10(2):1–174.
 34. GBIF. *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 [Internet]. GBIF Backbone Taxonomy. 2021 [cited 2022 Sep 9]. Available from: <https://www.gbif.org/pt/species/1649905>
 35. Kumm HW, Cerqueira NL. The *Haemagogus* Mosquitos of Brazil. Bull Entomol Res [Internet]. 1951 Sep 10;42(1):169–81. Available from:

- https://www.cambridge.org/core/product/identifiser/S0007485300025256/type/journal_article
36. Gomes A de C, Torres MAN, Paula MB de, Fernandes A, Marassá AM, Consales CA, et al. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizoóticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2010 Jun;19(2):101–13. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/http://scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742010000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 37. Tátilla-Ferreira A, Maia D de A, Abreu FVS de, Rodrigues WC, Alencar J. Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: culicidae), a vector of wild yellow fever in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2017 Aug 7;59. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000232&lng=en&tlng=en
 38. Alencar J, Morone F, De Mello CF, Dégallier N, Lucio PS, Da Serra-Freire NM, et al. Flight Height Preference for Oviposition of Mosquito (Diptera: Culicidae) Vectors of Sylvatic Yellow Fever Virus Near the Hydroelectric Reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. *J Med Entomol* [Internet]. 2013 Jul 1;50(4):791–5. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/ME12120>
 39. Alencar J, de Mello CF, Gil-Santana HR, Guimarães AÉ, de Almeida SAS, Gleiser RM. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* [Internet]. 2016 Jun;41(1):18–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jvec.12189>
 40. Moraes MAP, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP. An Epidemic of Yellow Fever in Central Brazil, 1972–1973. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1981 Jan 1;30(1):204–11. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1981.30.204>
 41. de Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, Santos AAC dos, de Miranda RM, Bonelly I de S, et al. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2019;8(1):218–31. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>

42. ICMBio. Febre amarela. [Internet]. Itaitiaia: ICMBio; 2017. Available from: https://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia/images/stories/o-que-fazemos/FEBRE_AMARELA.pdf
43. Marina Saraiva. Macacos são sentinelas no enfrentamento da febre amarela [Internet]. FIOCRUZ. 2018 [cited 2022 Sep 12]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/noticia/macacos-sao-sentinelas-no-enfrentamento-da-febre-amarela>
44. Dégallier N, SÁ Filho GC, Monteiro HAO, Castro FC, Vaz Da Silva O, Brandão RCF, et al. Release–Recapture Experiments with Canopy Mosquitoes in the Genera *Haemagogus* and *Sabihius* (Diptera: Culicidae) in Brazilian Amazonia. *J Med Entomol* [Internet]. 1998 Nov 1;35(6):931–6. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/35.6.931>
45. Silva SOF, de Mello CF, Gleiser RM, Oliveira AA, Maia D de A, Alencar J. Evaluation of Multiple Immersion Effects on Eggs From *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Under Experimental Conditions. *J Med Entomol*. 2018;55(5):1093–7.
46. Fauci AS, Morens DM. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Feb 2;366(5):454–61. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1108296>
47. Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2016;50:1–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102016000100602&lng=en&tlng=en
48. Murray P. *Togavírus e Flavivírus*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. 623–34 p.
49. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;951:13–24.
50. Blair CD, Adelman ZN, Olson KE. Molecular Strategies for Interrupting Arthropod-Borne Virus Transmission by Mosquitoes. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2000 Oct 1;13(4):651–61. Available from: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.13.4.651-661.2000>
51. Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2004 Dec;10(12):1040–55. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14638453>
52. Mercer DR, Castillo-Pizango MJ. Changes in Relative Species Compositions of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) and an Outbreak of Oropouche Virus in Iquitos, Peru. *J Med Entomol* [Internet]. 2005 Jul 1;42(4):554–8. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/42.4.554>
 53. Amaro F, Ciufolini MG, Venturi G, Fiorentini C, Alves MJ. Phleboviruses laboratory diagnosis (Toscana virus). *Acta Med Port* [Internet]. 2007;20(4):341–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198078>
 54. Donalisio M, Freitas A, Zuben A. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. 2017;51:51–30. Available from: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/Nym8DKdvfL8B3XzmWZB7hJH/?format=pdf&lang=pt>
 55. Mahy B, Regenmortel M. Encyclopedia of Virology. In 2008 [cited 2020 Dec 14]. p. 24–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744104006816>
 56. Liu D. Molecular Detection of Human Viral Pathogens [Internet]. New York: CRC Press; 2016. 1152 p. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=BBPOBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Molecular+Detection+of+Human+Viral+Pathogens+city&ots=GcwI-vb78v&sig=MCq_InXOHivSnfyQqlvqa9mdeHU#v=onepage&q=Molecular+Detection+of+Human+Viral+Pathogens+city&f=false
 57. MS. Portaria NO 204, de 17 de fevereiro de 2016 [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 18]. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html
 58. Lindenbach B et al. *Flaviviridae*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 712–46 p.
 59. Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* [Internet]. 2014 Mar;32(12):1326–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.040>
 60. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos

- arbovírus emergentes no Brasil. Rev Pan-Amazônica Saúde [Internet]. 2014 Feb;5(3):55–64. Available from:
http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007
61. MS. Manual de manejo clínico da febre amarela [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020. Available from:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_amarela_guia_profissionais_saude.pdf
 62. CDC. Yellow Fever [Internet]. 2018 [cited 2022 Jun 28]. Available from:
<https://www.cdc.gov/globalhealth/newsroom/topics/yellowfever/index.html#:~:text=Yellow fever virus is estimated,infected Aedes or Haemagogus mosquitoes.>
 63. WHO. Yellow fever [Internet]. 2019. Available from: <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/yellow-fever>
 64. Franco O. História da Febre Amarela no Brasil. Ministério da Saúde, Dep Nac Endem Rurais. 1969;1(1):1–8.
 65. Costa ZGA, Romano APM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. Rev Pan-Amazônica Saúde. 2011;2(1):11–26.
 66. MS. Boletim epidemiológico da Febre Amarela no Brasil 2019/2020 [Internet]. Ministério da Saúde do Brasil. 2020. Available from:
<https://www.rets.epsjv.fiocruz.br/biblioteca/boletim-epidemiologico-da-febre-amarela-no-brasil-20192020>
 67. Cavalcante KRLJ, Tauil PL. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras. 2017;26(3):617–20.
 68. SES. Febre amarela [Internet]. 2014. Available from:
<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Febre-amarela>
 69. OPAS. Febre Amarela [Internet]. 2018. Available from:
<https://www.paho.org/pt/node/40>
 70. Juliano S a, O’Meara GF, Morrill JR, Cutwa MM. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. Oecologia [Internet]. 2002 Feb 1;130(3):458–69. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s004420100811>
 71. Revista Ambiental. Definição de Ecologia [Internet]. 2009 [cited 2020 Aug 15].

- Available from: <https://revistambiental.wordpress.com/2009/10/01/17/>
72. Reiskind MH, Griffin RH, Janairo MS, Hopperstad KA. Mosquitoes of field and forest: the scale of habitat segregation in a diverse mosquito assemblage. *Med Vet Entomol.* 2017;31(1):44–54.
 73. Pavlovsky N. *The Natural Nidality of Transmissible Disease with Special Reference to the Landscape Ecology of Zooanthroposes.* Urbana: University of Illinois Press; 1966. 261 p.
 74. Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. Zika, chikungunya and dengue: The causes and threats of new and reemerging arboviral diseases. *BMJ Glob Heal.* 2018;3.
 75. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Jun;16(6):712–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5012511/pdf/emss-69753.pdf>
 76. Edman JD, Scott TW. Host defensive behaviour and the feeding success of mosquitoes. *Int J Trop Insect Sci* [Internet]. 1987 Dec 19;8(4-5-6):617–22. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1742758400022694
 77. Walker ED, Edman JD. The influence of host defensive behavior on mosquito (diptera: culicidae) biting persistence. *J Med Entomol.* 1985;22(4):370–2.
 78. Donalizio MR, Freitas ARR, Zuben APB Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2017;51(36):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27355468>
 79. Abreu FVS de, Ferreira-de-Brito A, Azevedo A de S, Linhares JHR, de Oliveira Santos V, Hime Miranda E, et al. Survey on Non-Human Primates and Mosquitoes Does not Provide Evidences of Spillover/Spillback between the Urban and Sylvatic Cycles of Yellow Fever and Zika Viruses Following Severe Outbreaks in Southeast Brazil. *Viruses* [Internet]. 2020 Mar 26;12(4):364. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/4/364>
 80. Almeida DS de. *Recuperação ambiental da Mata Atlântica* [Internet]. 3ª. Ilhéus: EDITUS; 2016. 200 p. Available from: <http://books.scielo.org/id/8xvf4>
 81. Mittermeier RA, Turner WR, Larsen FW, Brooks TM, Gascon C. *Global*

- Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In: Biodiversity Hotspots [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 3–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-20992-5_1
82. Marris E. Conservation: Biodiversity as a bonus prize. *Nature* [Internet]. 2010 Dec 15;468(7326):895–895. Available from: <http://www.nature.com/articles/468895a>
 83. Da Silva LG, Dos Santos S, Moraes F. Fragmentação Da Mata Atlântica De Interior: Análise De Paisagem Do Corredor Verde Sul-Americano E Florestas Do Alto Paraná. *Bol Geogr.* 2015;32(3):61.
 84. Fraga FB, Teixeira MT, Silva ML. Efeitos da fragmentação florestal e da expansão agrícola sobre a comunidade de insetos fitófagos e himenópteros parasitóides no Parque Nacional da Serra dos Órgãos e arredores Effect of forest fragmentation and agricultural expansion on the community of ph. *Ciência e Conservação na Serra dos Órgãos*. Brasília: Ibama. 2007. p. 120–36.
 85. Didham RK, Ghazoul J, Stork NE, Davis AJ. Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends Ecol Evol* [Internet]. 1996 Jun;11(6):255–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169534796200473>
 86. Dos Santos-Neto LG, Lozovei AL. Aspectos ecológicos de *Anopheles cruzii* e *Culex ribeirensis* (Diptera, Culicidae) da Mata Atlântica de Morretes, Paraná, Brasil. *Rev Bras Entomol.* 2008;52(1):105–11.
 87. Miranda SB de A de, Noronha Filho FÁ, Dias GF de M, Costa JA da, Rodrigues NF dos S. Análise do desflorestamento na aerovia entre as cidades Boa Vista – Brasília. *Res Soc Dev* [Internet]. 2020 Nov 29;9(11):e70091110456. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10456>
 88. Alencar J, de Mello CF, Barbosa LS, Gil-Santana HR, Maia D de A, Marcondes CB, et al. Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(3):351–6.
 89. Couto-Lima Di, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MDA, Dos Santos FB, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–12.
 90. Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6):1–11.
 91. Almeida JF, Belchior HCM, Ríos-Velásquez CM, Pessoa FAC. Diversity of

- mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in different types of larvitrap in an Amazon rural settlement. *PLoS One*. 2020;15(10 October):1–15.
92. Zavortink T. The dismal state of mosquito systematics: perspectives of a classical taxonomist. *Bull Soc Vector Ecol*. 1994;(19):69–72.
 93. Lourenço-de-Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2002 Sep;97(6):799–800. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000600009&lng=en&tlng=en
 94. Giovanetti M, de Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, Xavier J, et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. Pfeiffer JK, editor. *J Virol* [Internet]. 2019 Dec 12;94(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01623-19>
 95. INPE. Dados Meteorológicos [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 19]. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inmet?r=estacoes/estacoesAutomaticas>
 96. Alencar J, Morone F, Mello CF de, Gil-Santana HR, Guimarães AÉ. Immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a eutrophic landfill tank from State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(6):769–71.
 97. Lane J. Neotropical Culicidae. Volume 1. São Paulo: University of São Paulo; 1953. 1112 p.
 98. John N. Belkin. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae XXI: The Culicidae of Jamaica. 6th ed. American Entomological Institute, editor. Kingston: Ann Arbor; 1970. 458 p.
 99. Jones JC. Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy [Internet]. Vol. 27, Bulletin of the Entomological Society of America. New Jersey: Plexus Pub; 1981. 147–147 p. Available from: [https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Harbach%26 Knight 2021_0.pdf](https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Harbach%26%20Knight%202021_0.pdf)
 100. Reinert JF. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *J Eur Mosq Control Assoc*. 2009;27(December):68–76.
 101. HARBACH RE, KITCHING IJ. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Syst Entomol* [Internet]. 1998 Oct;23(4):327–70. Available from:

- <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x>
102. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonca-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* [Internet]. 2008;7(3):861–71. Available from:
<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2008/vol7-3/pdf/X-Meeting04.pdf>
 103. ICMBIO. APA da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado [Internet]. 2020. Available from:
<https://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/mata-atlantica/unidades-de-conservacao-mata-atlantica/2169-apa-da-bacia-do-rio-sao-joaomico-leao-dourado>
 104. MMA. Plano De Manejo Da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Micoleão-Dourado [Internet]. Ministério do Meio Ambiente; 2008. p. 325. Available from: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/mata-atlantica/lista-de-ucs/apa-da-bacia-do-rio-sao-joao-mico-leao-dourado/arquivos/apa_bacia_rio_sao_joao.pdf
 105. Kenkel NC, Juhász-Nagy P, Podani J. On sampling procedures in population and community ecology. *Vegetatio*. 1989;83(1–2):195–207.
 106. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Past : paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*. 2001;4(1):1–9.
 107. ICMBio. PARQUE NACIONAL DA SERRA DOS ÓRGÃOS (PARNASO) [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 27]. Available from:
<https://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/>
 108. INPE. Estações do Ano [Internet]. 2021. Available from:
<https://clima1.cptec.inpe.br/estacoes/>
 109. INEA. Plano de Manejo Área de Proteção Ambiental Estadual de Macaé de Cima (Módulo 1) [Internet]. Rio de Janeiro: Diretoria da Biodiversidade e Áreas Protegidas; 2014. Available from:
<http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwew/mdgz/~edisp/inea0083752.pdf>
 110. Alencar J et al. Utilização de armadilha “ovitrampa” para monitoramento de *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) em área de Mata Atlântica.

- Entomol y Vectores. 2004;2:369–72.
111. Mangudo C, Aparicio JP, Rossi GC, Gleiser RM. Tree hole mosquito species composition and relative abundances differ between urban and adjacent forest habitats in northwestern Argentina. *Bull Entomol Res.* 2018;108(2):203–12.
 112. Pancetti FGM, Honório NA, Urbinatti PR, Lima-Camara TN. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: A rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(1):87–9.
 113. Alencar J, Mello CF de, Barbosa LS, Gil-Santana HR, Maia D de A, Marcondes CB, et al. Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2016 Jun;49(3):351–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822016000300351&lng=en&tlng=en
 114. Silva SOF, Ferreira De Mello C, Figueiró R, De Aguiar Maia D, Alencar J. Distribution of the Mosquito Communities (Diptera: Culicidae) in Oviposition Traps Introduced into the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2018;18(4):214–21.
 115. Serpa LLN, Costa KVRM, Voltolini JC, Kakitani I. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2006 Dec;40(6):1101–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102006000700020&lng=pt&tlng=pt
 116. Silva SOF, de Mello CF, Figueiró R, Docile T, Serdeiro M, Fumian FF, et al. Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85752-y>
 117. Campos RE. Phytotelmata colonization in bamboo (*Guadua* sp.) culms in northeast Argentina. *J Nat Hist.* 2016;50(15–16):923–41.
 118. Catenacci LS, Nunes-Neto J, Deem SL, Palmer JL, Travassos-da Rosa ES, Tello JS. Diversity patterns of hematophagous insects in Atlantic forest fragments and human-modified areas of southern Bahia, Brazil. *J Vector Ecol.* 2018;43(2):293–304.
 119. Wilke ABB, Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Junior W, Marrelli MT. Mosquito populations dynamics associated with climate variations. *Acta Trop* [Internet]. 2017;166:343–50. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.10.025>
120. Chadee DD, Tikasingh ES. Seasonal incidence and diel oviposition periodicity of *Haemagogus* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Trinidad, W.I. Part III. *Haemagogus celeste* (Dyar and Nunez Tovar) and *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar and Shannon). *Ann Trop Med Parasitol*. 1991;85(5):543–50.
 121. Müller G, Marcondes C. Immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) on the bromeliad *Nidularium innocentii* in ombrophilous dense forest of Santa Catarina Island, Florianópolis, Santa Catarina State, southern Brazil. *Biotemas*. 2007;20(2):27–31.
 122. Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Júnior W, de Carvalho GC, Nardi MS, Araujo AB, Vendrami DP, et al. Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an urban park: Larval habitats and temporal variation. *Acta Trop* [Internet]. 2015;150:200–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.002>
 123. Couto-Lima D, Andreazzi CS, Leite PJ, Bersot MIL, Alencar J, Lourenço-De-oliveira R. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *haemagogus leucocelaenus* (Dyar & shannon) (diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the atlantic forest, Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115(6):1–13.
 124. Guedes MLP, Navarro-Silva MA. Mosquito community composition in dynamic landscapes from the Atlantic Forest biome (Diptera, Culicidae). *Rev Bras Entomol*. 2014;58(1):88–94.
 125. Cardo MV, Vezzani D, Carbajo AE. Immature Mosquitoes from Groundwater Habitats in a Temperate Wetland of Argentina: Environmental Associations and Seasonal Variation of Community Attributes. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 2012 Sep;28(3):151–9. Available from:
<http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/12-6225R.1>
 126. Freitas R. Avaliação de classificação de imagens para mapeamento digital do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO). *Rev Bras Cartogr* [Internet]. 2014;66(6):1203–13. Available from:
<https://www.semanticscholar.org/paper/Avaliação-de-classificação-de-imagens-para-digital-Freitas-Ribeiro/fa187d856d3284bc8317adcf09b8a249a8756944?sort=relevance&pdf=true>

127. Rai KS. *Aedes Albopictus* in the Americas. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 1991 Jan;36(1):459–84. Available from:
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.36.010191.002331>
128. Lopes J. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. V. Coleta de larvas em recipientes artificiais instalados em mata ciliar. *Rev Saude Publica* [Internet]. 1997 Aug;31(4):370–7. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101997000400006&lng=pt&tlng=pt
129. Travassos D. Os Arbovirus no Brasil: Generalidades, , Metodose e Tecnicas de Estudo [Internet]. Instituto Evandro chagas, editor. Belém: Ministério da Saúde; 1994. 42 p. Available from: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010006994>
130. Rueda LM, Patel KJ, Axtell RC, Stinner RE. Temperature-Dependent Development and Survival Rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* [Internet]. 1990 Sep 1;27(5):892–8. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/27.5.892>
131. Bayoh MN, Lindsay SW. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* [Internet]. 2003 Sep 9;93(5):375–81. Available from:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007485303000440/type/journal_article
132. Lega J, Brown HE, Barrera R. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) abundance model improved with relative humidity and precipitation-driven egg hatching. *J Med Entomol*. 2017;54(5):1375–84.
133. Possas C, Lourenço-De-oliveira R, Tauil PL, Pinheiro F de P, Pissinatti A, da Cunha RV, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: The puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(10):1–12.
134. Santos EB, Favretto MA, Müller GA. When and what time? On the seasonal and daily patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest remnant from Southern Brazil. *Austral Entomol*. 2020;59(2):337–44.
135. Alencar J, De Mello CF, Guimarães AÉ, Gil-Santana HR, Dos Santos Silva J, Santos-Mallet JR, et al. Culicidae community composition and temporal

- dynamics in Guapiaçu ecological reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2015;10(3):1–16.
136. Freire RC de M, Barbosa T de M, Jales JT, Ximenes M de FF de M, Corte R La, Gama RA. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a fragment of seasonal dry tropical forest (Caatinga) in Brazil. *J Arid Environ*. 2021;190(May).
 137. Lima-Camara TN De, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(10):2079–84.
 138. Alencar J, Pacheco JB, dos Santos Silva J, Silva SOF, Guimarães AÉ. Influence of Climatic Factors On *Psorophora* (*Janthinosoma*) *Albigenu* In Pantanal Landscape, Mato Grosso State, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 2018 Sep 1;34(3):177–81. Available from: <https://meridian.allenpress.com/jamca/article/34/3/177/131495/Influence-of-Climatic-Factors-On-Psorophora>
 139. Colombo AF, Joly CA. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: The most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian J Biol*. 2010;70(3 SUPPL.):697–708.
 140. MS. Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020 [Internet]. Vol. 51, *Boletim Epidemiológico*. Brasília; 2020. p. 19. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim-epidemiologico-vol-51-no-01>
 141. Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, dos Santos FCP, Nogueira JS, et al. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
 142. Shannon RC. Yellow Fever Virus in Jungle Mosquitoes. *Science* (80-) [Internet]. 1958 Aug;272(7041):317. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673658901764>
 143. Schick R. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae). XX. The *terrens* group of *Aedes* (*Finlaya*). *ContibAmerEntomolInst*. 1973;2:1–174.
 144. Barbosa AA, Silva MAN da. Preferência por local de oviposição de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae), em relação à presença de imaturos da

- própria espécie, sob condições de laboratório. *Rev Bras Zool.* 2002;19(4):1147–52.
145. Goubert C, Minard G, Vieira C, Boulesteix M. Population genetics of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*, an invasive vector of human diseases. Vol. 117, *Heredity.* 2016. p. 125–34.

Anexo A

Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 68206-1	Data da Emissão: 07/06/2019 12:41:29	Data da Revalidação*: 07/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar	CPF: 005.893.247-05
Título: Taxocenose de <i>Haemagogus</i> (Diptera: Culicidae) e Investigação da circulação de flavivírus em áreas de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil	
Nome da Instituição: Fundação Oswaldo Cruz	CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.

7	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0682060120190607



Anexo B

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO

Licença permanente para coleta de material biológico

Número: 34911-2	Data da Emissão: 18/09/2019 15:54:12	Data da Revalidação*: 01/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão		

Dados do titular

Nome: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar	CPF: 005.893.247-05
Nome da Instituição: Fundação Oswaldo Cruz	CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
3	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
4	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
5	Esta licença permanente NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se

	destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
8	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
11	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
12	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0349110220190918

Anexo C



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44333-3	Data da Emissão: 07/04/2017 12:51	Data para Revalidação*: 07/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Jeronimo Augusto Fonseca Alencar	CPF: 005.893.247-05
Título do Projeto: Biodiversidade de insetos das famílias Culicidae (Diptera) e Reduviidae (Hemiptera), no Estado do Rio de Janeiro.	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a

	viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 28345725



Anexo D

**Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in
an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil**



OPEN

Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil

Shayenne Olsson Freitas Silva^{1,2}, Cecilia Ferreira de Mello^{1,3}, Ronaldo Figueiró^{4,5,6}, Tatiana Docile^{7,8}, Michele Serdeiro¹, Fabiana Fagundes Fumian^{1,4} & Jeronimo Alencar^{1✉}

Although there are many studies on the control of mosquito vectors of the yellow fever virus (YFV) in tropical forests, there are still few ecological studies regarding abiotic factors effect on these mosquitoes. Here we characterize these effects on oviposition behavior, abundance, and diversity of mosquito vectors of YFV. The study was conducted in Córrego da Luz Municipal Park, in Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state, Brazil, from July 2018 to December 2019. Ovitrap were placed at ground level and 3 m high. The data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test, followed by an independent sample analysis, the Mann–Whitney test. The Shannon Diversity Index was used to evaluate the abundance of mosquitos' eggs collected at both ground level and 3 m high. We highlight the presence of *Haemagogus janthinomys* and *Hg. leucocelaenus*, primary YFV vectors in forest areas. The abundance of *Hg. leucocelaenus* (63%), *Hg. janthinomys* (75%), and *Aedes terrens* (58%) was higher at the height of 3 m, while *Ae. albopictus* (52%) was higher at ground level. *Aedes albopictus* was positively correlated with temperature. Culicidae monitoring is essential for assessing the YFV transmission cycle in Atlantic forest fragments.

The interference of anthropic activities such as biome fragmentation, the introduction of exotic species, climate change, and environmental pollution in the ecosystem can significantly impact biodiversity, causing a decrease in species richness that leads to an imbalance in the natural cycles of an ecosystem^{1,2}. The effects of these changes on climate variables lead to favorable conditions for mosquito proliferation^{3,4}. There has therefore been an increasing expansion of mosquito-borne diseases associated with climate change and habitat destruction^{5,6}.

Mosquitoes have attracted considerable attention due to their role in the transmission of several major pathogens, such as arboviruses (e.g., Zika, dengue, chikungunya, and yellow fever) and malaria. These illnesses are considered a serious worldwide public health problem, especially in tropical countries, like Brazil⁷.

Mosquitoes belonging to the genus *Haemagogus* and *Sabethes* are epidemiologically important as they act as biological vectors in the transmission of the wild yellow fever virus (YFV) in forest areas of the Americas⁸. *Haemagogus* species are diurnal mosquitoes most frequently found near the treetops in forest fragments. The height at which their acrodendrophilic activity occurs, also known as their vertical distribution, is quite wide and influences their oviposition behavior^{9,10}.

¹Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil. ²Postgraduate Program in Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil. ³Postgraduate Program in Animal Biology, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro 23890-000, Brazil. ⁴Foundation State University Center of the West Zone (UEZO), Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, Rio de Janeiro 120323070-200, Brazil. ⁵Volta Redonda University Center (UniFOA), Av. Paulo Erlei de Abrantes, 1325, Volta Redonda, RJ 27240-560, Brazil. ⁶Castelo Branco University (UCB), Av. Santa Cruz, 1631, Rio de Janeiro 21710-250, Brazil. ⁷Laboratory of Professional Education in Health Surveillance (LAVSA), Joaquim Venâncio Polytechnic School of Health, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, Manguinhos, Rio de Janeiro 436521040-900, Brazil. ⁸Application Institute Fernando Rodrigues da Silveira (Cap-UERJ), State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil. ✉email: jalencar@ioc.fiocruz.br

Species	Ground level		3 m		Total
	N	(%)	N	(%)	
<i>Hg. leucocelaenus</i>	113	37	192	63	305
<i>Hg. janthinomys</i>	1	25	3	75	4
<i>Ae. albopictus</i>	554	52	521	48	1075
<i>Ae. terrens</i>	27	42	38	58	65
Total	695	48	754	52	1449
Shannon's Diversity Index	0.6		0.8		
	0.7				

Table 1. Relative abundance, Shannon index and total number of culicids collected in Córrego da Luz, Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro, Brazil, from July 2018 to December 2019.

According to Pessanha¹¹, an increasing number of cases of zoonotic diseases have been noticed in transition areas over the last three decades as the process of deforestation has intensified.

The Brazilian coast from the state of Piauí to Rio Grande do Sul was considered a YFV-free area until 2016 and, consequently, was not subject to vaccination recommendations. However, a serious outbreak was observed in center-western Brazil between 2014 and 2015 that quickly spread through the most populous region of the Atlantic Forest, which had not seen circulation of the virus in almost 80 years¹². The pathogen quickly spread through this heavily populated region, resulting in a severe outbreak from 2016 to 2018. In 2017, yellow fever cases were detected in Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state, resulting in one fatality. A comprehensive entomological survey by Abreu et al.¹², conducted in 44 municipalities in five Brazilian states, analyzed the distribution, abundance, and natural infection by YFV of mosquitoes captured before and during the outbreak. The authors found that *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 and *Hg. leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 were the primary vectors due to their wide distribution, high abundance, and natural infection rates. The results of Abreu et al.¹² highlight the important role of these species in the rapid spread and severity of this outbreak.

A clearer understanding of mosquito communities' biodiversity in forest environments such as the Atlantic Forest, either during anthropic activities or periods of vegetation recovery, is crucial to understanding changes in behavior patterns among these wild mosquito populations.

Although the monitoring of mosquito vectors of YFV in tropical forests is the subject of a large body of literature^{10,13}, there are still few ecological studies that focus on changes in the populations and communities of these vectors in fragmented forested environments, especially on how climatic factors affect the oviposition behavior of these mosquitoes.

In this study, we evaluate the influence of oviposition behavior and abiotic factors (temperature and rainfall) on the abundance and diversity of mosquito vectors of YFV from July 2018 to December 2019 in a remnant of Atlantic Forest of Córrego da Luz Municipal Park, Casimiro de Abreu city, Rio de Janeiro state, Brazil.

Results

During the study period from July 2018 to December 2019, 6535 mosquito eggs were collected in the Córrego da Luz Municipal Park area. Of this total, 1449 eggs reached the adult stage, and four species were identified: *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. albopictus* (Skuse, 1894), and *Ae. terrens* Walker, 1856. Both genera are epidemiologically important as they are known vectors of arboviruses such as dengue and yellow fever.

The abundance of *Hg. leucocelaenus* (63%), *Hg. janthinomys* (75%), and *Ae. terrens* (58%) was greater at the height of 3 m, while *Ae. albopictus* (52%) was more abundant at ground level (Table 1).

There was no statistically significant difference in the number of individuals of *Hg. leucocelaenus* ($p=0.3$), *Hg. janthinomys* ($p=0.4$), *Ae. albopictus* ($p=0.9$), and *Ae. terrens* ($p=0.7$) collected at the ground level and 3 m high. At the height of 3 m, a significant difference was observed ($p\leq 0.05$) between the numbers of *Hg. leucocelaenus* and *Ae. terrens* ($p=0.03$) and a very significant difference ($p\leq 0.01$) between *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* ($p=0.003$). Similarly, a very significant difference was also observed between *Hg. janthinomys* and *Ae. albopictus* ($p=0.001$).

At ground level, there was a significant difference in the abundance of *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* ($p=0.02$), and a very significant difference between *Hg. leucocelaenus* and *Ae. albopictus* ($p=0.002$). There was also an extremely significant difference ($p\leq 0.001$) between *Hg. janthinomys* and *Ae. albopictus* ($p<0.0001$). As for diversity, the height of 3 m proved to be the preferred habitat for most species, with greater values in both the Shannon (0.8) and Simpson (0.46) indices. A majority of the Culicidae specimens (52%) was detected at this height (Tables 1, 2).

Aedes albopictus was the most abundant species, with 554 individuals collected at the ground level and 521 at 3 m high. This species was followed by *Hg. leucocelaenus*, with 113 individuals at the ground level and 192 at 3 m high. *Aedes terrens* and *Hg. janthinomys* were the least frequent species, with a total of 65 and four captured individuals, respectively (Fig. 1).

The abundance of the two most common species, *Ae. albopictus* and *Hg. leucocelaenus*, were tested for correlation with rainfall and temperature (Brazilian Institute of Space Research – INPE, 2020) using linear regressions. Neither species was correlated with rainfall, though *Ae. albopictus* showed a significant positive correlation with temperature (p -value = 0.004; Fig. 2).

Species	Ground level			3 m		
	N	Ni/N = pi	(pi ²)	N	Ni/N = pi	(pi ²)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	113	0.16	0.03	192	0.25	0.06
<i>Haemagogus janthinomys</i>	1	0.00	0.00	3	0.00	0.00
<i>Aedes albopictus</i>	554	0.80	0.64	521	0.69	0.48
<i>Aedes terrens</i>	27	0.04	0.00	38	0.05	0.00
Total	695	1.00	0.66	754	1.00	0.54
Simpson Index			0.34			0.46

Table 2. Simpson's index of culicids collected in Córrego da Luz, Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro, Brazil, from July 2018 to December 2019. N, number of mosquitoes; Ni, number of mosquitoes of each species; pi, proportion of individuals of a species.

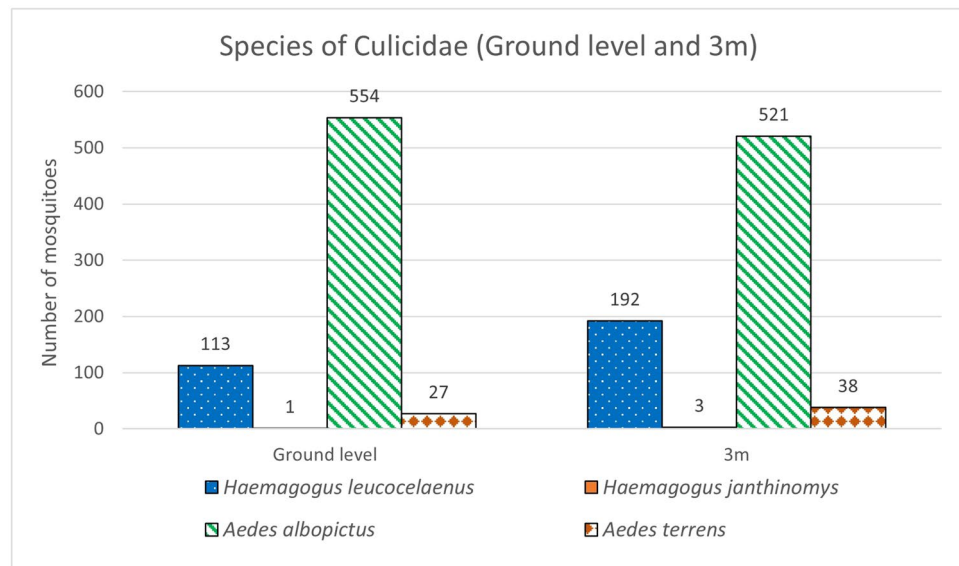


Figure 1. Species of Culicidae collected at ground level and 3 m, in Córrego da Luz Municipal Park, in the city of Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state, Brazil.

Discussion

Studies of mosquito biodiversity in the Atlantic Forest contribute to a better understanding of the distribution patterns in mosquito populations. Specifically, possible changes in mosquito behavior and adaptations to the various environmental conditions or impacts in this biome are especially important⁷. Guimaraes et al.¹⁹ observed that an increased incidence of epidemics related to anthropic environmental impacts is to be expected due to modifications in the behavior of pathogens and vectors.

Thus, the recent emergence of viral epidemics may be directly related to environmental impacts associated with human actions. This study was carried out in an altered landscape with fragments of the original Atlantic Rainforest ecosystem. *Aedes albopictus*, *Haemagogus leucocelaenus*, and *Hg. janthinomys* are very important epidemiologically due to their ability to transmit various arboviruses^{8,20}.

In particular, the recent (2016–2019) outbreak of yellow fever in Brazil reinforces the importance of such studies in this biome²¹. Approximately 98% of the 2259 recorded human cases and 773 deaths occurred in localities in the Cerrado and Atlantic Forest biomes of southeastern Brazil²². The highest number of cases was reported in 2017, including one death in Casimiro de Abreu, the sampling area of this study.

Entomological studies conducted during the 2016–2019 outbreak in southeastern Brazil pointed to *Hg. leucocelaenus* as the primary vector of YFV along with *Hg. janthinomys*, while some species of *Aedes* and *Sabethes* were considered secondary vectors²³. Cunha et al.²³ observed that *Hg. leucocelaenus* was abundant in the foci of the disease and detected high rates of natural infections.

In addition to its role in the transmission of YFV, *Hg. leucocelaenus* has been experimentally shown to be able to transmit the chikungunya virus²⁴. Furthermore, a fragment of the DENV-1 virus has already been found in some *Hg. leucocelaenus* specimens collected in northeastern Brazil²⁵. *Aedes albopictus* is a competent vector of dengue and zika²⁶, among other arboviruses²⁷. This species can also be an intermediate vector for yellow fever between wild and urban areas²⁸.

In Brazil, the research programs that led to studies on the vertical distribution of acrodendrophilic mosquitoes were intended to clarify the transmission of wild yellow fever and simian malaria²⁹. Studies on vertical

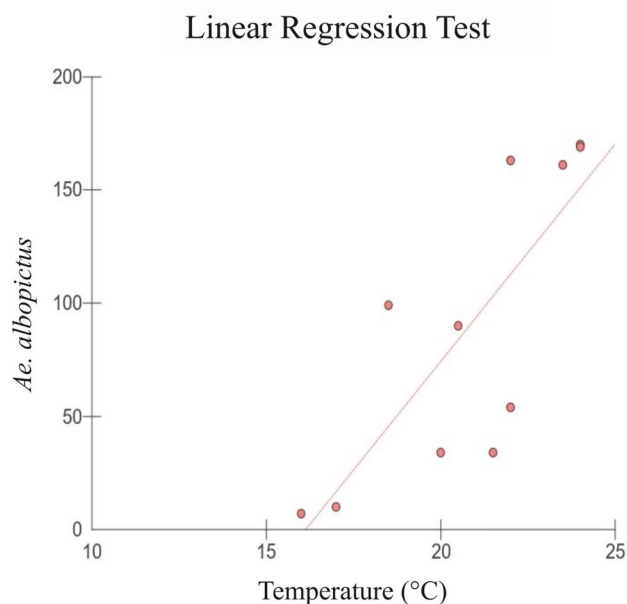


Figure 2. Linear regression test graph of *Ae. albopictus* related to temperature (°C), in Córrego da Luz Municipal Park, in the city of Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state, Brazil.

stratification expand the ecological knowledge of the insect population in the forest, which is of fundamental importance for interpreting the biology of these critical species³⁰.

Although there was no significant difference in the abundance of *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* at ground level and a height of 3 m, the overall abundance and diversity rates were higher in the samples collected at the height of 3 m. These results are consistent with those of Alencar et al.^{9,10,31}, that populations of *Hg. leucocelaenus* in southeastern Brazil preferentially lays their eggs in the highest tree strata. Forattini³² suggested that *Haemagogus* spp. females search predominantly for blood meals at the highest levels of a treetop. It seems that these species can oviposit at a wide variety of heights in the Atlantic Forest^{9,10,31}.

According to Consoli and Lourenço-de-Oliveira³³, *Hg. janthinomys* also shows a clear preference for biting at the highest strata of the forest. Overall, we observed that specimens of *Hg. leucocelaenus* presented an eclectic, opportunistic, and adapted behavior regarding the search for hosts in the flight trend concerning the oviposition traps installed at different stratification levels.

On the other hand, individuals of *Ae. albopictus* showed a greater abundance and diversity at the ground level. Our results corroborate other studies showing that *Ae. albopictus* has an oviposition preference for low tree heights and ground level^{9,10,34}. The occurrence of *Ae. albopictus* only in ovitraps at low levels can be attributed to the high availability of potential larval habitats. In this context, Obenauer et al.³⁵ suggested that a potential decrease in habitat availability caused a more opportunistic and variable oviposition behavior. The presence of *Ae. albopictus* and other species susceptible to infection and flavivirus transmission may also pose a risk for spreading the zika virus. There is growing concern about the possibility of the zika virus establishing wild transmission cycles due to the high diversity of potential vectors, enhanced by the recent detection of this virus in neotropical primates³⁶.

In this study, a significant difference was detected between the species found at the ground level and 3 m height. This finding may be related to the selection of sites at different heights for oviposition, which can be seen as a strategy to reduce interspecific competition¹⁰.

Weather conditions can also play a role in the vertical selection of oviposition sites¹⁶. Some studies have been shown that higher average temperatures favor mosquito eggs hatching, accelerates larval development^{33,37}, and consequently speeds the YFV transmission³⁸. Higher average temperatures also increase the frequency of biting activities³³ and reduce the duration of YFV incubation in the vector, which is the time elapsed between the mosquito's infectious blood meal and the arrival of these viral particles in its salivary glands^{39,40}. Thus, temperature plays an important role in the circulation of this virus. Therefore, monitoring the average temperature in risk areas can help to predict an increase in arbovirus transmission. Despite the unstable climate in southeastern Brazil, temperature and precipitation are critical abiotic factors in maintaining the YFV transmission throughout the year⁴¹.

In the present work, only *Ae. albopictus* was statistically positively influenced by temperature. This result corroborates the studies by Calado and Navarro-Silva⁴² and Docile et al.⁴³, who found this species to be more frequent in breeding sites with high temperatures. However, the other vector species were not statistically significantly influenced by the climatic variables tested. *Haemagogus leucocelaenus* fluctuates in number of individuals throughout the year; however, the uninterrupted observation of eggs from this species in breeding sites illustrates that it maintains hematophagy activity throughout the studied months, regardless of climatic conditions^{9,38}. This

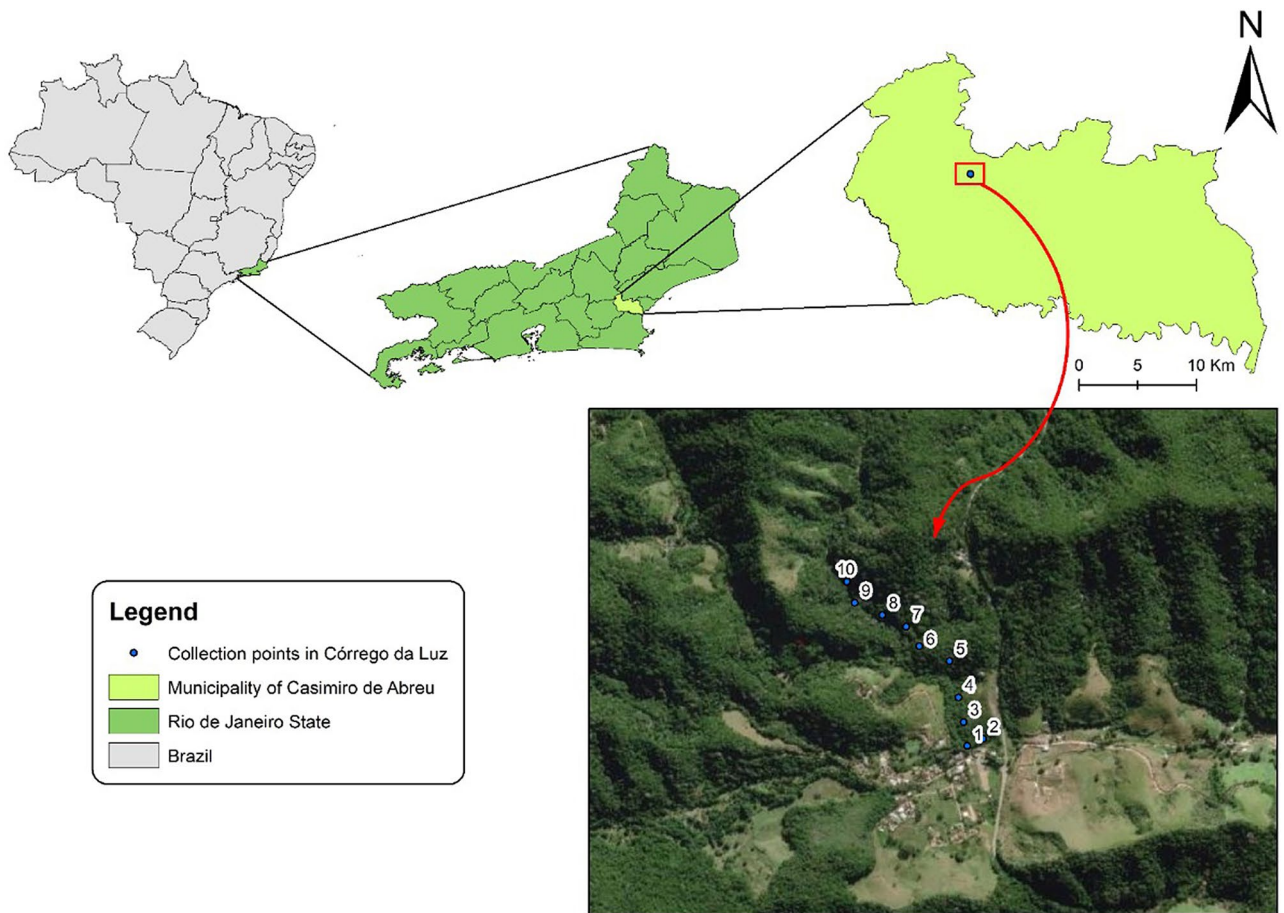


Figure 3. Sampling sites in the Córrego da Luz Municipal Park, located in the city of Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state, Brazil. Maps were prepared in ArcGIS Desktop: Release 10.5. Redlands, CA (ESRI) (<https://www.esri.com/en-us/arcgis/products/arcgis-pro/overview/>). Accessed: November 2020).

pattern of monthly egg collection and constant activity of *Hg. leucocelaenus* has also been described in other sites of the Atlantic Forest biome in southeastern Brazil^{9,10}.

Monitoring the population dynamics of yellow fever vectors in areas of increased transmission risk is a critical component of the yellow fever health surveillance system. Elucidating the acrodendrophilic elements of these vectors' oviposition and the effect of climatic variables that may influence these dynamics can be useful for yellow fever control programs by assisting in the development and improvement of health surveillance procedures by providing relevant biological data.

The results of our study provide information of interest for prophylaxis and control strategies, such as the definition of expanded risk areas and the prediction of silent virus circulation, which may help target the intensification of local vaccination campaigns in high-risk areas.

Materials and methods

Study area. The Córrego da Luz Municipal Park is located in Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil. The original vegetation cover of the region is typical of alluvial Atlantic Forest communities (herbaceous vegetation), dunes, and restingas (tree and herbaceous vegetation). Bergallo et al.¹⁴ reported that remnants of the Atlantic Forest are scarce. However, representative forest fragments do remain, as well as significant patches of secondary vegetation in advanced successional stages in the hills and coastal massifs, especially in the Rio de Janeiro municipalities of Maricá, Saquarema, and Silva Jardim (Fig. 3).

Sampling. Ovitrap traps were used for collecting Culicidae eggs. These are composed of a black 500 mL pot with no lid. They also have three wooden paddles each (Eucatex plates), vertically held inside the trap by clips, an infusion of dry leaves and natural water is added into the ovi-traps to reproduce a microecosystem as close as possible to the mosquitoes' natural habitat^{10,15} (Alencar et al. 2016; Silva et al. 2018).

A total of twenty traps were installed at random intervals, with two traps per tree (one at ground level and another one at 3 m above the ground), between July 2018 and December 2019. The traps were installed at ten different sampling sites under the same height conditions, as follows: site 1, 22°28'32.9" S 42°12'07.01" W; site 2, 22°26'54.8" S 42°12'23.3" W; site 3, 22°26'49.1" S 42°12'24.8" W; site 4, 22°26'49.1" S 42°12'24.8" W; site 5,

22°26'46.0" S 42°12'28.1" W; site 6, 22°26'41.9" S 42°12'30.8" W; site 7, 22°26'38.1" S 42°12'36.4" W; site 8, 22°27'05.2" S 42°13'53.7" W; site 9, 22°26'51.2" S 42°13'49.2" W; site 10, 22°26'36.2" S 42°12'37.6" W.

The paddles in the traps were examined monthly, and taken to the Diptera Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro. Positive paddles (containing eggs) were separated in the laboratory, had their eggs counted and were immersed in transparent trays containing dechlorinated water. The eggs were then placed in a controlled experimental environment with a thermoperiod regulated at a temperature of $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, relative air humidity of 75–90%, and a 12-h day/night cycle. These conditions allowed us to keep the specimens alive to adulthood for species determination.

In the laboratory, all the collected eggs were placed to hatch, with species determination upon reaching adulthood. After reaching the adult stage, the morphological characters were observed under a stereoscopic microscope, and the identification was carried out based on the dichotomous keys prepared by Forattini¹⁶ and Marcondes and Alencar¹⁷. The abbreviations of generic and subgeneric names follow Reinert's¹⁸ proposal. After the species determination, all specimens were incorporated into the Entomological Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, under the collection name "Atlantic Forest".

Statistical analyses. The number of individuals of each species found at ground level and 3 m was tested for normality using the Shapiro–Wilk test, followed by an analysis of independent samples, the Mann–Whitney test. The Shannon Diversity Index was used to evaluate the abundance of mosquitoes' eggs collected at both ground level and 3 m high. The Simpson Dominance Index was used to measure the probability of two individuals randomly selected in the sample belonging to the same species; higher values of the latter index imply lower diversity levels. The relationship between the number of specimens per Culicidae species and the climatic variables of rainfall and temperature was shown to have a normal distribution through the Shapiro–Wilk test. The linear regression test was used to evaluate the relationship and influence of abiotic factors on the number of specimens per Culicidae species.

Ethics statement. The permanent license for collecting and transporting zoological material from the Córrego da Luz Municipal Park within Brazil was granted by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) through the Brazilian Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO), under permit number 34911-1 dated 06/14/2020.

Received: 12 January 2021; Accepted: 5 March 2021

Published online: 16 March 2021

References

- Alho, C. J. R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. *Estud. Avançados* **26**, 151–166 (2012).
- Docile, T. N., Figueiró, R., Portela, C. & Nessimian, J. L. Macroinvertebrate diversity loss in urban streams from tropical forests. *Environ. Monit. Assess.* <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5237-z> (2016).
- Mutuku, F. M. *et al.* Distribution, description, and local knowledge of larval habitats of *Anopheles gambiae* s.l. in a village in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 44–53 (2006).
- Simard, F. *et al.* Ecological niche partitioning between *Anopheles gambiae* molecular forms in Cameroon: the ecological side of speciation. *BMC Ecol.* **9**, 17 (2009).
- Reiter, P. Yellow fever and dengue: a threat to Europe?. *Eurosurveillance* **15**, 11–17 (2010).
- Medlock, J. M. & Leach, S. A. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 721–730 (2015).
- Alencar, J. *et al.* Ecosystem diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a remnant of Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, Brazil. *Austral Entomol.* <https://doi.org/10.1111/aen.12508> (2020).
- Arnell, J. H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **10**, 1–174 (1973).
- Alencar, J. *et al.* Flight height preference for oviposition of mosquito (diptera: Culicidae) vectors of sylvatic yellow fever virus near the hydroelectric reservoir of simplicio, minas Gerais, Brazil. *J. Med. Entomol.* **50**, 791–795 (2013).
- Alencar, J. *et al.* Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **49**, 351–356 (2016).
- Gerais, M. Febre Amarela : uma visão do cenário atual. (2014).
- De Abreu, F. V. S. *et al.* Combination of surveillance tools reveals that yellow fever virus can remain in the same atlantic forest area at least for three transmission seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076> (2019).
- Moreno, E. S. *et al.* Reemergência de febre amarela: Detecção de transmissão no estado de São Paulo, Brasil, 2008. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**, 290–296 (2011).
- Bergallo, H. *Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no estado do Rio de Janeiro.* (Instituto Biomas, 2009).
- Silva, S. O. F. *et al.* Evaluation of multiple immersion effects on eggs from *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) under experimental conditions. *J. Med. Entomol.* **55**, 1093–1097 (2018).
- Forattini, O. P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia.* (Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2002).
- Marcondes, C. & Alencar, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev. Biomed.* **21**, 221–238 (2010).
- Reinert, J. F. Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (diptera) and notes on generic and subgeneric changes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **17**, 51–55 (2001).
- Guimarães, A. E., De Mello, R. P., Lopes, C. M. & Gentile, C. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. I—monthly frequency and climatic factors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**, 1–16 (2000).
- Gratz, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* **18**, 215–227 (2004).
- Possas, C. *et al.* Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, e180278 (2018).
- Brasil, M. da S. *Uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização.* Ministério da Saúde https://bvsm.sau.gov.br/bvsm/sau/legis/gm/1998/prt3916_30_10_1998.html http://bvsm.sau.gov.br/bvsm/sau/legis/gm/2017/prt2436_22_09_2017.html (2019).

23. Cunha, M. S. *et al.* Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci. Rep.* **9**, 1–13 (2019).
24. Lourenço-de-Oliveira, R. & Failloux, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–11 (2017).
25. De Figueiredo, M. L. *et al.* Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virol. J.* **7**, 1–5 (2010).
26. Marcondes, C. B. & de Ximenes, M. F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by aedes (*Stegomyia*) mosquitoes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **49**, 4–10 (2016).
27. Grard, G. *et al.* Zika virus in Gabon (Central Africa) - 2007: a new threat from *Aedes albopictus*?. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, 1–6 (2014).
28. de Gomes, A. C. *et al.* *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. *Rev. Saude Publica* **33**, 95–97 (1999).
29. Guimarães, A. E. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. II. Distribuição vertical. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **80**, 1–2 (1985).
30. Lopes, J., Arias, J. R. & Yood, J. D. C. Evidências Preliminares De Estratificação Vertical De Postura De Ovos Por Alguns Culicidae (Diptera), Em Floresta No Município De Manaus - Amazonas. *Acta Amaz.* **13**, 431–439 (1983).
31. Alencar, J. *et al.* A comparative study of the effect of multiple immersions on Aedini (Diptera: Culicidae) mosquito eggs with emphasis on sylvan vectors of yellow fever virus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**, 114–117 (2014).
32. *Entomologia médica. 2.º Volume. Culicini: Culex, Aedes e Psorophora | Mosquito Taxonomic Inventory.* (1965).
33. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciência e tecnologia em saúde para a população brasileira.* (FIOCRUZ, 1994).
34. Amerasinghe, F. P. & Alagoda, T. S. B. Mosquito oviposition in bamboo traps, with special reference to *Aedes albopictus*, *Aedes novalbopictus* and *Armigeres subalbatus*. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **5**, 493–500 (1984).
35. Obenauer, P. J., Kaufman, P. E., Allan, S. A. & Kline, D. L. Infusion-baited ovitraps to survey ovipositional height preferences of container-inhabiting mosquitoes in two Florida habitats. *J. Med. Entomol.* **46**, 1507–1513 (2009).
36. Althouse, B. M. *et al.* Potential for Zika virus to establish a sylvatic transmission cycle in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–11 (2016).
37. Hamrick, P. N. *et al.* Geographic patterns and environmental factors associated with human yellow fever presence in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–27 (2017).
38. Couto-Lima, D. *et al.* Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *haemagogus leucocelaenus* (Dyar & shannon) (diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the atlantic forest, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **115**, 1–13 (2020).
39. Davis, N. C., Division, I. H., Foundation, R., Health, P. & Health, P. The effect of various temperatures in modifying the extrinsic incubation period of the yellow fever virus in *Aedes Aegypti*. *Am. J. Epidemiol.* **16**, 163–176 (1931).
40. Johansson, M. A., Arana-Vizcarrondo, N., Biggerstaff, B. J. & Staples, J. E. Incubation periods of yellow fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 183–188 (2010).
41. De Paiva, C. A. *et al.* Determination of the spatial susceptibility to yellow fever using a multicriteria analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **114**, 1–8 (2019).
42. Calado, D. C. & Navarro da Silva, M. A. Evaluation of the temperature influence on the development of *Aedes albopictus*. *Rev. Saude Publica* **36**, 173–179 (2002).
43. Docile, T. N. *et al.* Frequency of *Aedes* sp. Linnaeus (Diptera: Culicidae) and Associated Entomofauna in Bromeliads from a Forest Patch within a densely Urbanized Area. *Neotrop. Entomol.* **46**, 613–621 (2017).

Acknowledgements

This work was supported by the Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ; Grant Number E-26/202.658/2018), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; 301707/2017-0) and Mico-Leão-Dourado Association.

Author contributions

S.O.F.S. responsible for the statistical analyses of the paper, constructed, and edited the tables and graphs of the paper and participated in the revision of the manuscript. J.A. designed and coordinated the study, participated in the writing and revision process of the paper. C.F.M. and J.A. collected the mosquito samples in the field. C.F.M. constructed the map representing the collection sites of the study. R.F. participated in and reviewed the statistical analyses of the study. T.D., M.S. and F.F.F. carried out the bibliographic research and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Anexo E

Interaction of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) and other Mosquito Vectors in a Forested Area, Rio de Janeiro, Brazil



Article

Interaction of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) and Other Mosquito Vectors in a Forested Area, Rio de Janeiro, Brazil

Shayenne Olsson Freitas Silva^{1,2}, Cecilia Ferreira de Mello^{1,3}, Sergio Lisboa Machado⁴, Paulo José Leite¹ and Jeronimo Alencar^{1,*} 

¹ Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Av. Brazil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil; shayennesilva@aluno.fiocruz.br (S.O.F.S.); ceciliamello@aluno.fiocruz.br (C.F.d.M.); paulo.leite@ioc.fiocruz.br (P.J.L.)

² Postgraduate Program in Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Av. Brazil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

³ Postgraduate Program in Animal Biology, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro 23890-000, Brazil

⁴ Laboratory of Molecular Diagnosis and Hematology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil; sergio@pharma.ufrj.br

* Correspondence: jalencar@ioc.fiocruz.br

Abstract: The yellow fever (YF) virus has been detected throughout Brazil, with the occurrence of human cases, cyclic epizootics, and its isolation from *Haemagogus janthinomys* and *Hg. leucocelaenus*. We assessed the seasonal occurrence, egg abundancy, and oviposition interaction of mosquito vector species captured at a Private Natural Heritage Reserve in the Atlantic Forest biome. A total of 2943 eggs and 1538 mosquito larvae were collected from which 1231 belonged to entomologically important species. Ovitrap were used to collect immature mosquitoes from September 2019 to January 2021. The Mann–Whitney test was used to assess the differences in the abundance of eggs between rainy and dry seasons. Kruskal–Wallis and Dunn’s post hoc tests were used to evaluate the significance of the differences in the number of individuals from vector species. The highest percentage of mosquito vector eggs were collected during the rainy season, from December to February. Most eggs recovered from ovitraps belonged to the species *Hg. leucocelaenus*, representing 85% of all mosquito eggs identified. The other species had lower abundances and percentages: *Aedes terreus* (7%), *Haemagogus janthinomys* (5%) and *Aedes albopictus* (3%). The species that shared breeding sites with a higher frequency were *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys*, with a statistically positive correlation ($\rho = 0.74$). This finding suggests that maybe the presence of *Hg. leucocelaenus* eggs acted as an attractant for *Hg. janthinomys* or vice versa. An understanding of mosquito oviposition behavior is necessary for the development of surveillance and control approaches directed against specific pathogen vectors of medical and veterinary importance.

Keywords: mosquito vectors; oviposition; seasonality; surveillance; yellow fever



Citation: Freitas Silva, S.O.; de Mello, C.F.; Machado, S.L.; Leite, P.J.; Alencar, J. Interaction of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) and Other Mosquito Vectors in a Forested Area, Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 94. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7060094>

Academic Editor: Goudarz Molaei

Received: 10 May 2022

Accepted: 5 June 2022

Published: 8 June 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The maintenance of arboviruses is mainly influenced by the spatial and temporal distribution of their vectors, which in turn have their behaviors affected by different ecological settings. Hence, weather conditions, including temperature, relative humidity, and wind, impact the dispersion of females and their selection of oviposition sites [1]. For example, environmental factors, such as rainfall, can modify the ecological scenario and favor breeding conditions for mosquitoes by providing additional aquatic habitats [2].

Mosquito reproduction is affected by natural and transitory breeding sites, e.g., flooded areas, floodplains, animal dens and coconut shells, as well as by permanent or semi-permanent breeding sites including bamboo internodes and bromeliads [3]. In addition,

several mosquito species are capable of breeding in water that has accumulated in tree holes, fruit peels, or even upon fallen leaves [4]. Oviposition sites are critical for the dynamics of mosquito populations and for their survival. Thus, ovitraps were used to observe alterations in the dynamics of mosquito populations, with a particular interest in oviposition behavior since it affects pathogen transmission [5]. Ovitrap were employed due to their sensitivity as a surveillance method extensively used to collect mosquito eggs in the field, even in the presence of natural breeding sites [6].

Among mosquito genera that breed in natural sites and are often associated with preserved forests are *Haemagogus* Williston, 1896, and some species of *Aedes* Meigen, 1818, such as *Ae. albopictus* Skuse, 1895 [3]. Both genera include vectors of important arboviruses, yellow fever, dengue and chikungunya, which are endemic to Brazil. These are considered by the Brazilian government as mandatory immediate notification diseases, that is, every suspected case must be promptly reported, within 24 h [7].

Haemagogus spp. are sylvatic mosquitoes that are found in tropical forests; they are active during the daytime and are mostly concentrated at the level of the forest canopy. In Brazil, the most hazardous sylvatic yellow fever virus (YFV) vector is *Hg. janthinomys* Dyar, 1921 [8,9]. This species has been found naturally infected with YFV in Eastern Amazonia, and in the states of Minas Gerais, Espírito Santos and Rio de Janeiro, located in the Southeast region of Brazil [10,11]. This raises concerns since epizootic YF outbreaks have apparently been shifting from the Amazon, where it is endemic, to the coast via the north–south route, through the Araguaia-Tocantins basin reaching the Central-West region of Brazil (State of Mato Grosso). Thus, YF has been reported in the northeast (State of Bahia), southeast (Minas Gerais, Espírito Santo, and São Paulo), and the southern regions of the country [12,13]. In the state of Bahia, an elevated population density of *Hg. janthinomys* was reported to be present on a road that gives access to a forest fragment near residences and is therefore dangerously close to human populations [14].

A predominance of human blood was detected in female *Hg. leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924, Rio Grande do Sul, Brazil. This finding demonstrates a broad range of hosts for *Hg. leucocelaenus*, as it feeds on wild animals and humans [15]. Importantly, there have already been reports of samples of this species infected with YFV in the state of Rio Grande do Sul; being considered a secondary vector of YFV in forest areas [16].

Due to their wide distribution, high abundance and natural infection, *Hg. janthinomys* and *Hg. leucocelaenus* are considered primary YFV vectors in preserved forests. We analyze the seasonal occurrence, egg abundancy, and oviposition interaction of these and other vector species to better understand the population dynamic of medically important mosquitoes.

2. Materials and Methods

2.1. Study Area

Samplings were carried out in an Atlantic Forest fragment of the Gaviões Private Natural Heritage Reserve (RPPN Gaviões) in Silva Jardim, Rio de Janeiro state. This private reserve comprises approximately 1600 hectares and is an Environmental Protection Area of the São João/Mico-Leão-Dourado River Basin (Figure 1). The vegetation is classified as dense ombrophilous lowland forest, one of the most threatened phytophysiognomies in the Atlantic Forest biome as a result of fragmentation [17]. Medium to advanced succession stages are predominant in this region, with characteristic secondary vegetation.

2.2. Ecological Analysis

Collection of mosquito immatures was performed using oviposition traps, which consisted of a black pot with a 500 mL capacity without a lid (Nutriplan Black Plastic Vase, Brazil). The study period went from September 2019 to January 2021. The data from the samplings were analyzed to determine mosquito ecological features by assessing the relationship between their populations and the seasonal distribution. The relative abundance of eggs was reported for the rainy (December, January, February) and dry (May, June, July, and August) seasons [18].

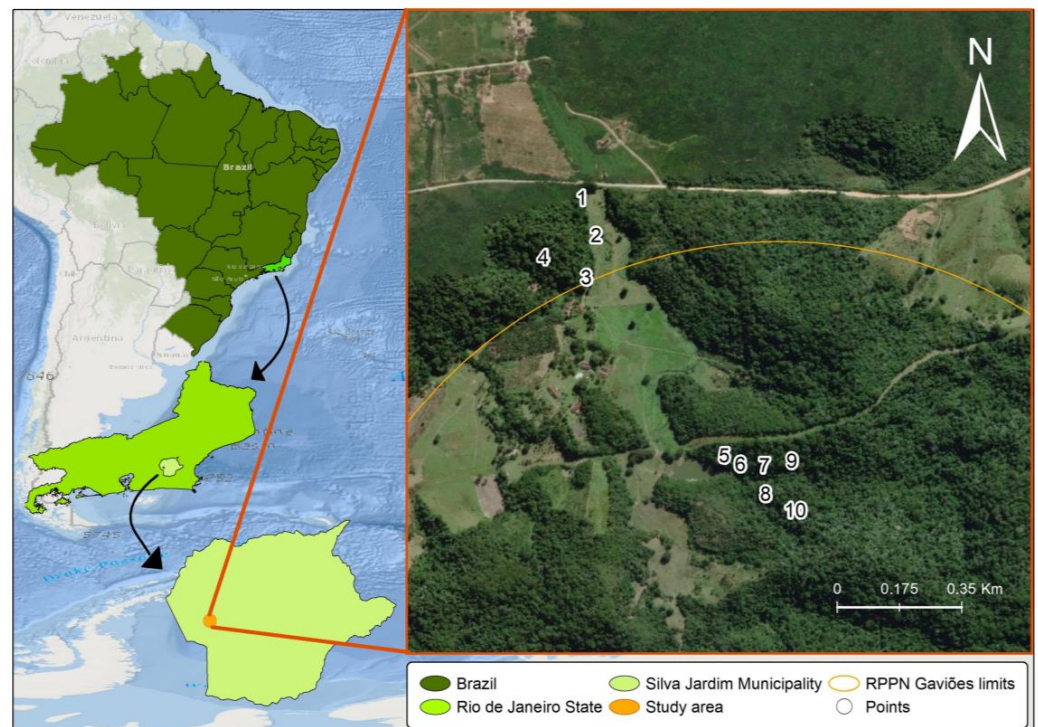


Figure 1. Sampling sites in the Sana Environmental Protection Area of the Private Reserve of the Gaviões Natural Heritage (RPPN Gaviões), Rio de Janeiro, Brazil. Maps were prepared using the QGIS 3.14.16 software and edited in Adobe Photoshop CS5 and CorelDraw X5. Reprinted from QGIS 3.14.16, a program under a CC BY license, with permission from Jeronimo Alencar—Fiocruz, original copyright 2021. The coordinates of the collection sites are as follows: Site 1: 22°34′08.5″ S 42°31′39.0″ W; Site 2: 22°34′11.9″ S 42°31′37.7″ W; Site 3: 22°34′15.7″ S 42°31′38.6″ W; Site 4: 22°34′13.9″ S 42°31′42.5″ W; Site 5: 22°34′31.9″ S 42°31′25.0″ W; Site 6: 22°34′32.7″ S 42°31′24.6″ W; Site 7: 22°34′32.8″ S 42°31′22.4″ W; Site 8: 22°34′35.4″ S 42°31′22.3″ W; Site 9: 22°34′32.4″ S 42°31′19.9″ W; Site 10: 22°34′36.9″ S 42°31′20.1″ W.

2.3. Collection and Rearing of Immature Culicids

A total of 10 ovitraps were installed, one trap per collection site, with three wooden oviposition paddles (2.5 cm × 14 cm) with textured surfaces, the paddles were vertically held in place by a clip. Ovitrap traps were filled with 300 mL of water and approximately 100 g of leaf litter. Both water and leaves were collected in bodies of water from areas near the collection sites in order to recreate a micro-ecosystem similar to natural breeding sites. Ovitrap traps were set at a height of 2.5 m and were fastened to the trees using nylon ropes and wire. An inspection of the traps was conducted every 20 days, and during these inspections, the water was changed and the wooden paddles replaced with new ones. The paddles were then sent to the Diptera Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute for egg counting and subsequent immersion in transparent trays (5 cm high × 15 cm wide × 22 cm long) containing dechlorinated water. The trays were then placed in a laboratory greenhouse under a controlled experimental environment with a thermoperiod regulated at 28 °C ± 1 °C, 75–90% relative air humidity, and a 12 h day/12 h night cycle. Following a three-day period, the paddles were removed from the water and air-dried for another three days in order to quantify the hatched larvae. The immersion and air-drying processes were repeated until the hatching of all viable eggs. Larvae were fed with TetraMin flakes fish food (Tetra, Blacksburg, VA, USA), placed directly on the surface of the water, and were monitored daily. These experimental conditions enabled us to keep the specimens alive until the adult stage; species identification was carried out following the methodology described by Alencar et al. (2016) [19]. Adult mosquitoes were identified through direct observation of their morphological characteristics under a stereomicroscope

(Zeiss New York, NY, USA) and using the dichotomous keys elaborated by Arnell (1973) and Forattini (2002) [4,20]. Following species identification, all specimens were submitted to the Entomological Collection of the Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ.

2.4. Statistical Analysis

The normal distribution of the data was assessed by applying the normality test. Subsequently, the Kruskal–Wallis and Dunn’s post hoc tests were used to verify the statistical significance of differences in the numbers of individuals from medically important mosquitoes. The Mann–Whitney test was used to assess the differences in the abundance of eggs between the rainy and dry seasons. Oviposition correlation between species of the same genera, sharing the same breeding sites, was evaluated using the Spearman Correlation test. All recorded data were analyzed using software PAST version 4.09 [21].

3. Results

3.1. Seasonal Abundance of Culicid Eggs

A total of 2943 eggs, 1538 larvae, were collected and 1231 were identified. An emphasis was given to vector species: *Hg. leucoelaenus* ($n = 1041$), *Hg. janthinomys* ($n = 62$), *Ae. albopictus* ($n = 40$), and *Ae. terrens* ($n = 88$). The highest percentage of Culicidae eggs was registered during the rainy season, with 96%, whereas the abundance of eggs in the dry season was scarcer, with only 4%. Through the Mann–Whitney test, it was possible to observe a statistically significant difference ($p \leq 0.01$) between the abundance of eggs in the rainy season compared to the dry season (Figure 2).

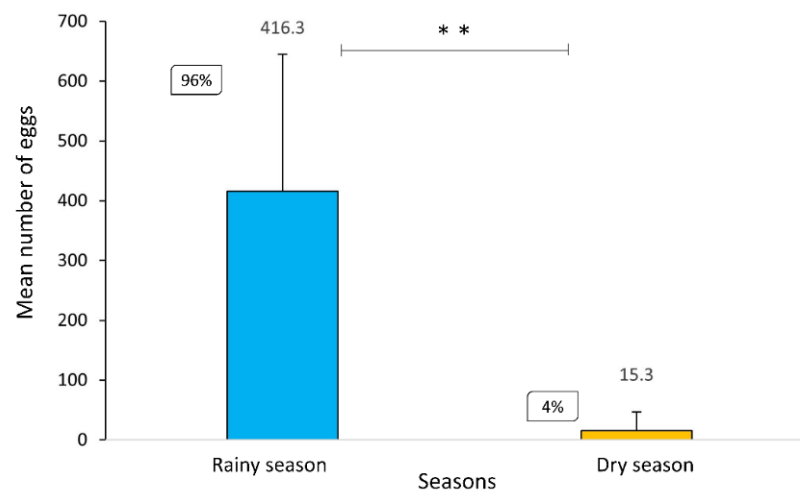


Figure 2. Statistically significant difference between the mean and standard deviation of the number of eggs collected in the rainy (December to March) and dry (June to August) seasons in the RPPN Gaviões ($U = 0.00$, $Z = 2.88$, $p = 0.004$). ** $p \leq 0.01$.

According to the Center for Weather Forecasting and Climate Studies (CPTEC), brief heavy rains and high temperatures occur from December to February, known as the rainy season, with the dry period ranging from June to August [18]. Most of the mosquito eggs collected in both seasons were unhatched eggs ($n = 2458$). Already hatched eggs were only found during the rainy season ($n = 292$), most likely due to high temperatures and rain abundance (Figure 3a). All eggs collected in the dry season were unhatched eggs since climatic variables were probably not ideal for egg hatching. (Figure 3b).

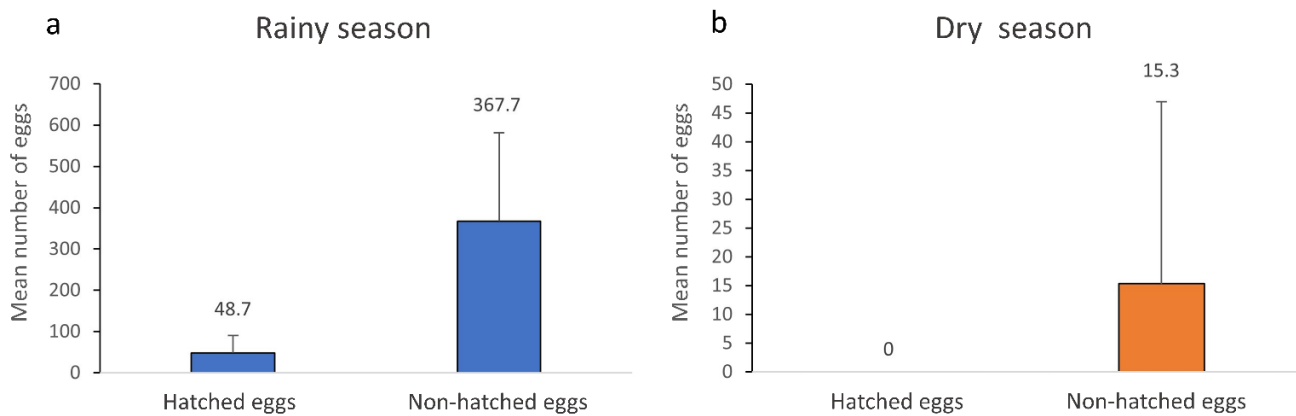


Figure 3. Mean and standard deviation of the number of hatched and non-hatched eggs from all Culicidae species collected from June to September 2020 in the RPPN Gaviões in the rainy (a) and dry (b) seasons.

3.2. Culicidae of Epidemiological Relevance

Among the species of epidemiological concern, *Hg. leucoclaenus* ($n = 1041$) 85% accounted for the highest number of eggs collected, followed by *Ae. terreus* ($n = 88$) 7%, *Hg. janthinomys* ($n = 62$) 5%, and *Ae. albopictus* ($n = 40$) 3% (Figure 4a). A significant difference with a p -value of 0.011 ($p \leq 0.05$) was detected among mosquito species' abundance. These differences were observed between *Hg. leucoclaenus* and *Hg. janthinomys* ($p = 0.009$), *Hg. leucoclaenus* and *Ae. albopictus* ($p = 0.012$) and *Hg. leucoclaenus* and *Ae. terreus* ($p = 0.003$).

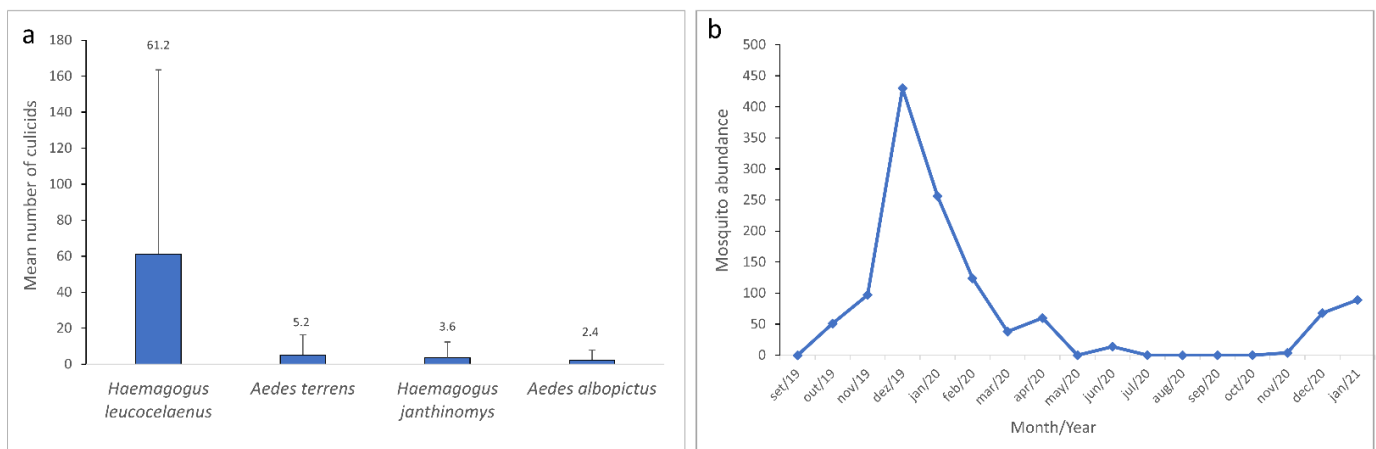


Figure 4. Culicidae of epidemiological concern collected from September 2019 to January 2021 in the Gaviões Reserve. (a) Mean and standard deviation for *Haemagogus leucoclaenus*, *Aedes terreus*, *Haemagogus janthinomys*, and *Aedes albopictus*. (b) Monthly mosquito abundance from September 2019 to January 2021.

The highest peak of mosquito occurrence was observed in the summer month of December 2019, during the rainy season. The Culicidae population began to decline in January, still a summer month of the rainy season, with a relatively high number of individuals ($n = 256$) that continued to drop until March 2020 ($n = 38$). An increase was observed in April ($n = 60$), however, this abundance dropped considerably in May ($n = 0$), underwent a slight increment in June ($n = 14$), and fell once again ($n = 0$) for the following four months. Few culicid specimens were detected again in November 2020 ($n = 4$), and more expressive peaks were observed during the summer rainy season in December 2020 ($n = 68$) and January 2021 ($n = 89$) (Figure 4b). Through the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test, it was possible to observe a statistically significant difference

($p \leq 0.05$) in the abundance of culicids between the summer month of January and the winter month of June 2020 ($p = 0.05$).

3.3. Species Distribution in Oviposition Traps

Ovitrap with eggs were evaluated to determine the abundance of different Culicidae species. The most abundant species, found in all locations sampled, was *Hg. leucocelaenus*, being the only species found in sites 1, 2, 7 and 10 (Supplementary Table S1). *Hg. janthinomys* was found in 70% of the sites, *Aedes albopictus* in 40% and *Ae. terrens* in 30%. *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* were frequently found together in the same larval habitat, in 6 of the 10 collection sites. Co-occurrence of all vector species was observed for sites 3, 5, and 9 (Figure 5).

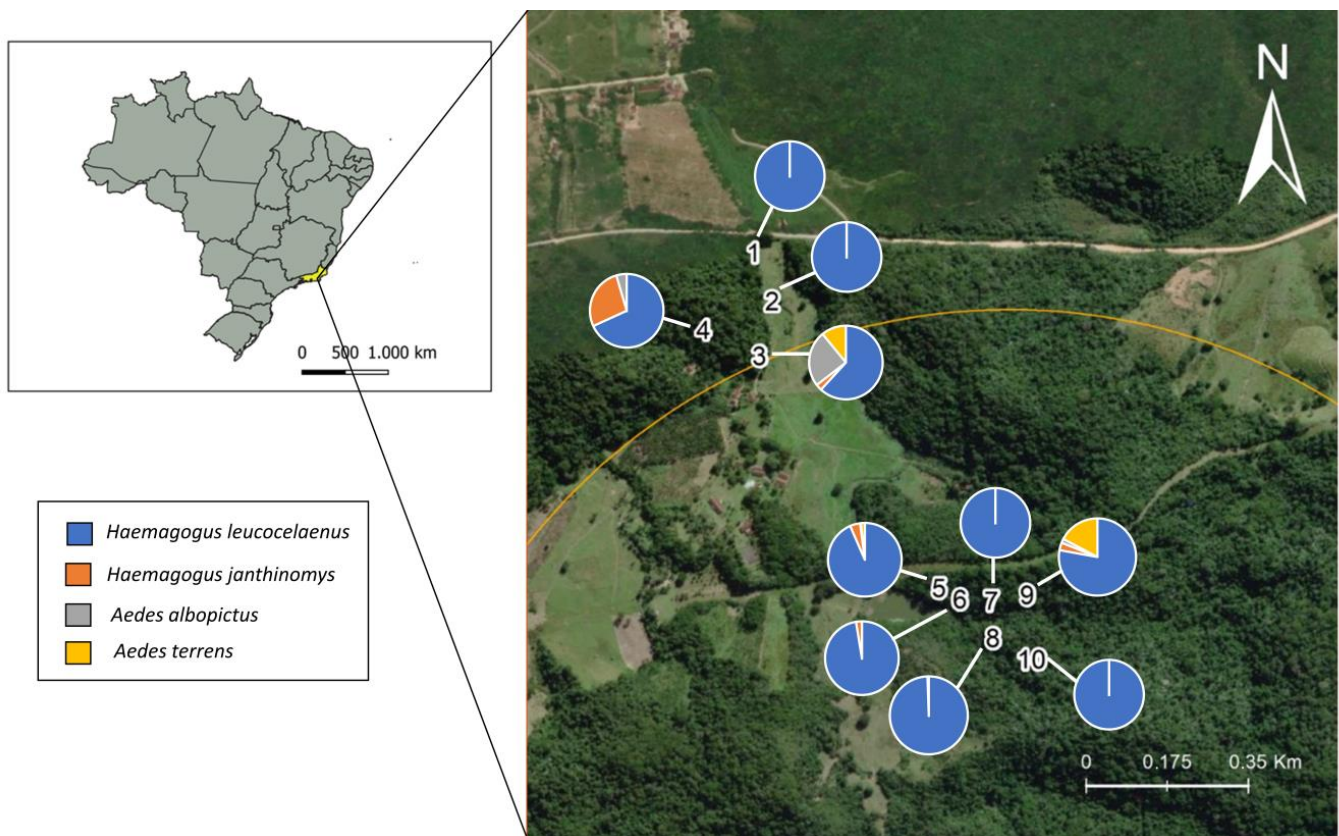


Figure 5. Relative frequencies of breeding sites containing immature stages of *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. albopictus* and *Ae. terrens*, collected from September 2019 to January 2021 in RPPN Gaviões.

Of the 30 paddles that were collected from the ovitraps, 10 contained eggs of different mosquito species. The highest number of overlapping eggs found on the same breeding site and on the same paddle were from *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys*. These two species were found co-occurring in sites 3, 4, 5, 6, 8 and 9 (Supplementary Table S1). All of the species that performed oviposition on the same paddle were positively correlated. Hence, the Spearman's correlation test detected a strong and statistically significant positive correlation ($\rho = 0.74$) between eggs from *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys*. A positive but non-significant correlation was also observed between eggs *Ae. terrens* and *Hg. janthinomys* ($\rho = 0.20$), and between *Hg. leucocelaenus* and *Ae. albopictus* ($\rho = 0.10$) eggs (Figure 6).

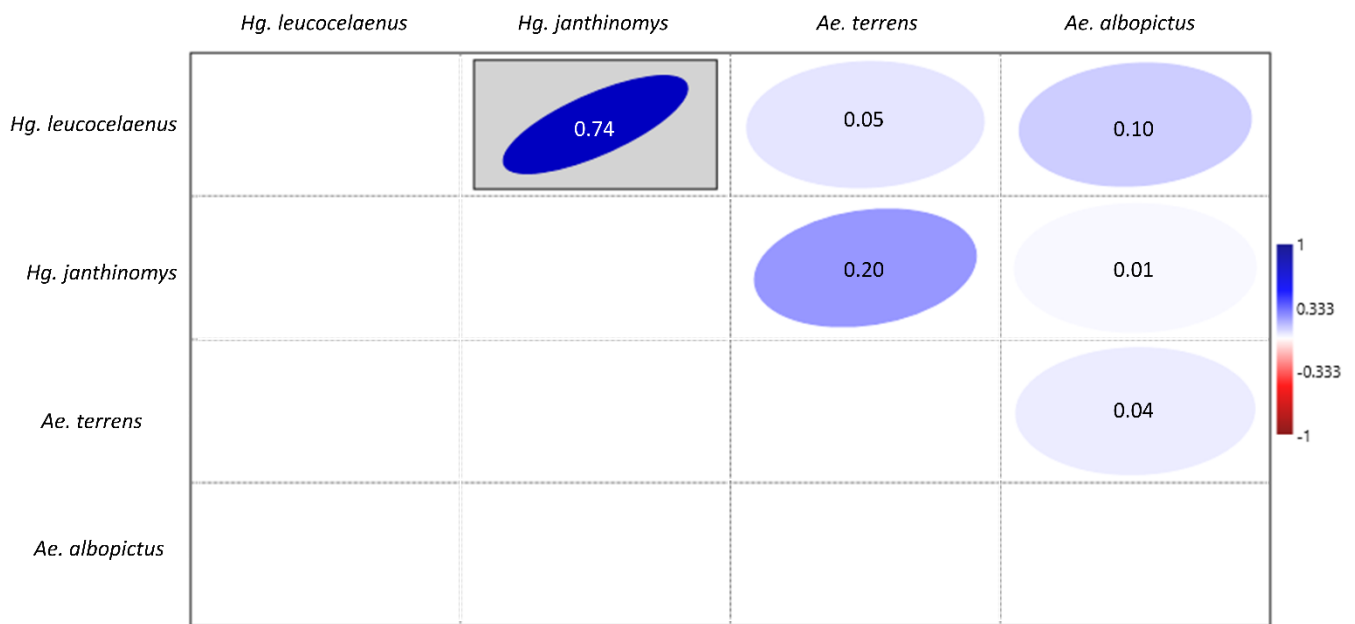


Figure 6. Spearman's correlation for the abundance of eggs of Culicidae species *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. albopictus*, and *Ae. terrens* that oviposited on the same paddles from September 2019 to January 2021 in RPPN Gaviões. $p \leq 0.05$.

4. Discussion

Populations of mosquitoes inhabiting fragments of the Atlantic Forest are affected by seasonality, which can therefore also impact the transmission dynamics of arboviruses [22,23].

The highest percentage of mosquito eggs were collected during the rainy season (December 2019, January, February, March, December 2020, and January 2021), with fewer mosquito eggs collected during the dry season (June, July, and August 2020). Similarly, a study conducted in the Private Natural Heritage Reserve of the Guapiaçu Ecological Reserve (REGUA) in the State of Rio de Janeiro recorded the highest numbers of mosquitoes in April and December (fall and summer, respectively), and the lowest numbers in June and October (winter and spring, respectively) [24]. However, this coincidence is not the case for other biomes, as reported by Freire et al. (2021) in a study on a fragment of seasonal dry tropical forest (Caatinga biome) of the Conservation Unit Floresta Nacional de Açú [25]. Freire et al. reported that the total number of mosquitoes collected varied widely, with September 2011 and July and May 2013 having a significantly higher abundance of culicids than in other months. This demonstrates how different biomes play an important role in the dynamics of mosquito populations across different regions of Brazil.

The most abundant species of epidemiological concern was *Hg. leucocelaenus*, representing more than 80% of all mosquito vector species identified. This species was also the most abundant during all of the seasons in the Córrego da Luz Municipal Park of Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro state, Southeastern Brazil [26]. Additionally, the temperature was a determining factor in the increased size of *Hg. leucocelaenus* populations in a study conducted in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro state, which showed that the likelihood of finding ovitraps containing eggs increased when the mean temperature was above 24 °C [27]. Similarly, our study detected a high frequency of *Hg. leucocelaenus* mosquitoes during the months of December 2019, January and February 2020, all of which are summer months in Brazil, characterized by high temperatures.

The diversity of mosquito oviposition behavior provides some of the most interesting examples of adaptation in the natural world. Understanding mosquito oviposition behavior is necessary for developing surveillance and control strategies against specific vectors. We observed eggs from vector mosquito species in the same breeding sites, specifically on the same paddles. Moreover, some studies suggest that the presence of congeneric or

conspecific eggs can act as an attractive factor since it serves as an indicator that the breeding site is viable, has food, ideal oxygenation and temperature conditions, and an appropriate pH range for the development of immatures [28–31]. Inacio et al. (2020) reported that *Hg. spegazzinii*, shared breeding sites with *Aedes albopictus*, *Aedes terrens*, *Culex spp.*, and *Toxorhynchites theobaldi* [32]. Similarly, we also observed shared breeding sites between two species of this genus, *Hg. janthinomys* and *Hg. leucocelaenus*, with the species *Ae. albopictus* and *Ae. terrens*. However, the highest overlapping oviposition was observed between the congeneric species *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys*. This outcome may indicate that the presence of eggs from *Hg. janthinomys* acts as an attractant for *Hg. leucocelaenus* or vice versa.

5. Conclusions

Our results present the first record of the behavior of different YFV vector species showing overlapping oviposition on the same breeding site. This outcome demonstrates that while some species may compete when coexisting in the same larval environment, such as *Ae. aegypti* and *Culex quinquefasciatus* [32], others can have a harmonic and mutually successful interaction, as is the case between *Hg. janthinomys* and *Hg. leucocelaenus*. The summer months of the Atlantic Forest's rainy season showed the highest peak in the number of epidemiologically important vector species such as *Hg. leucocelaenus*, a vector of the YFV. These findings demonstrate the importance of epidemiological surveillance in areas where mosquito vector species and sylvatic YFV might be circulating. Epidemiological surveillance is vital for setting off alerts for humans living or visiting the surrounding areas, specifically during the summer season in the hottest months of the year, where rainfall and mosquitoes are abundant.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/tropicalmed7060094/s1>, Table S1: Abundance of eggs of Culicidae species *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. albopictus*, and *Ae. terrens* at the collection sites in RPPN Gaviões, from September 2019 to January 2021.

Author Contributions: J.A. and C.F.d.M. conceived the idea for the study; J.A., C.F.d.M., and P.J.L. conducted the field collections and carried out laboratory experiments; S.O.F.S. performed the statistical analysis; J.A., S.O.F.S. and S.L.M. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Research Support Foundation of the state of Rio de Janeiro (FAPERJ; grant number E-26/202.658/2018; E-26/010.101076/2018), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant number 303286/2021-0), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; grant number 1539342).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The dataset analyzed during the current study is available from the last author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank Private Reserve of the Gaviões Natural Heritage (RPPN Gaviões) and Associação Mico Leão Dourado for their cooperativity and receptivity during the study period.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Day, J.F. Mosquito oviposition behavior and vector control. *Insects* **2016**, *7*, 65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hawaria, D.; Demissew, A.; Kibret, S.; Lee, M.C.; Yewhalaw, D.; Yan, G. Effects of environmental modification on the diversity and positivity of anopheline mosquito aquatic habitats at Arjo-Dedessa irrigation development site, Southwest Ethiopia. *Infect. Dis. Poverty* **2020**, *9*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Consoli, R.A.G.B.; Oliveira, R.L. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil—Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciência e Tecnologia em saúde Para a População Brasileira*; Fiocruz: Rio de Janeiro, Brazil, 1994; ISBN 85-85676-03-5.

4. Forattini, O.P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*; Edusp—Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, Brazil, 2002.
5. Day, J.F.; Curtis, G.A. When it rains, they soar—And that makes *Culex nigripalpus* a dangerous mosquito. *Am. Entomol.* **1994**, *40*, 162–167. [[CrossRef](#)]
6. Marques, C.C.; Marques, G.R.; de Brito, M.; dos Santos Neto, L.G.; Ishibashi, V.C.; Gomes, F.A. Estudo comparativo de eficácia de larvitrapas e ovitrapas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. *Rev. Saude Publica* **1993**, *27*, 237–241. [[CrossRef](#)]
7. Ministerio da Saude. *Situação Epidemiológica da Febre Amarela no Monitoramento, 2019/2020*; Ministerio da Saude: Brasília, Brazil, 2020; Volume 51.
8. Pinheiro, F.P.; Travassos Da Rosa, A.P.A.; Moraes, M.A.P.; Almeida Neto, J.C.; Camargo, S.; Filgueiras, J.P. An epidemic of yellow fever in Central Brazil, 1972–1973. I. Epidemiological studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1978**, *27*, 125–132. [[CrossRef](#)]
9. Vasconcelos, P.F.C.; Rodrigues, S.G.; Degallier, N.; Moraes, M.A.P.; Travassos Da Rosa, J.F.S.; Travassos Da Rosa, E.S.; Mondet, B.; Barros, V.L.R.S.; Travassos Da Rosa, A.P.A. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhao State, Brazil, 1993–1994: Epidemiologic and entomologic findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1997**, *57*, 132–137. [[CrossRef](#)]
10. Mondet, B.; Vasconcelos, P.F.C.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Travassos da Rosa, E.S.; Rodrigues, S.G.; Travassos da Rosa, J.F.S.; Bicout, D.J. Isolation of yellow fever virus from *Nulliparous Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* in Eastern Amazonia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2002**, *2*, 47–50. [[CrossRef](#)]
11. Pinheiro, G.G.; Rocha, M.N.; de Oliveira, M.A.; Moreira, L.A.; Filho, J.D.A. Detection of yellow fever virus in sylvatic mosquitoes during disease outbreaks of 2017–2018 in Minas Gerais state, Brazil. *Insects* **2019**, *10*, 136. [[CrossRef](#)]
12. Delatorre, E.; Santos De Abreu, F.V.; Ribeiro, I.P.; Gómez, M.M.; Cunha Dos Santos, A.A.; Ferreira-De-Brito, A.; Alberto Santos Neves, M.S.; Bonelly, I.; De Miranda, R.M.; Furtado, N.D.; et al. Distinct YFV lineages co-circulated in the central-western and southeastern Brazilian regions from 2015 to 2018. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1079. [[CrossRef](#)]
13. Strode, G.K. *Yellow Fever*; McGraw-Hill Book Co. Inc.: New York, NY, USA, 1951; ISBN 19522900612.
14. Marcondes, C.B.; Alencar, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev. Biomed.* **2010**, *21*, 221–238.
15. de Gomes, A.C.; Torres, M.A.N.; de Paula, M.B.; Fernandes, A.; Marassá, A.M.; Consales, C.A.; Fonseca, D.F. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizoóticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol. Serviços Saúde* **2010**, *19*, 101–113. [[CrossRef](#)]
16. Vasconcelos, P.F.C.; Sperb, A.F.; Monteiro, H.A.O.; Torres, M.A.N.; Sousa, M.R.S.; Vasconcelos, H.B.; Mardini, L.B.L.F.; Rodrigues, S.G. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *97*, 60–62. [[CrossRef](#)]
17. Ministério do Meio Ambiente. *Plano De Manejo Da Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João/Micoleão-Dourado*; Ministério do Meio Ambiente: Brasília, Brazil, 2008.
18. INPE. Estações do Ano. Available online: <https://clima1.cptec.inpe.br/estacoes/> (accessed on 31 May 2022).
19. Alencar, J.; de Mello, C.F.; Gil-Santana, H.R.; Guimarães, A.É.; de Almeida, S.A.S.; Gleiser, R.M. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* **2016**, *41*, 18–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Arnell, J.H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **1973**, *10*, 1–174.
21. Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. Paleontological statistics software package for education and data analysis past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 1–9.
22. Possas, C.; Lourenço-De-oliveira, R.; Tauil, P.L.; de Pinheiro, F.P.; Pissinatti, A.; da Cunha, R.V.; Freire, M.; Martins, R.M.; Homma, A. Yellow fever outbreak in Brazil: The puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, e180278. [[CrossRef](#)]
23. Santos, E.B.; Favretto, M.A.; Müller, G.A. When and what time? On the seasonal and daily patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest remnant from Southern Brazil. *Austral Entomol.* **2020**, *59*, 337–344. [[CrossRef](#)]
24. Alencar, J.; De Mello, C.F.; Guimarães, A.É.; Gil-Santana, H.R.; Dos Santos Silva, J.; Santos-Mallet, J.R.; Gleiser, R.M. Culicidae community composition and temporal dynamics in Guapiaçu ecological reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122268. [[CrossRef](#)]
25. de Freire, R.C.M.; de Barbosa, T.M.; Jales, J.T.; de Ximenes, M.d.F.F.; La Corte, R.; Gama, R.A. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a fragment of seasonal dry tropical forest (Caatinga) in Brazil. *J. Arid Environ.* **2021**, *190*, 104528. [[CrossRef](#)]
26. Silva, S.O.F.; de Mello, C.F.; Figueiró, R.; Docile, T.; Serdeiro, M.; Fumian, F.F.; Alencar, J. Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6081. [[CrossRef](#)]
27. Couto-Lima, D.; Andreazzi, C.S.; Leite, P.J.; Bersot, M.I.L.; Alencar, J.; Lourenço-De-oliveira, R. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the Atlantic forest, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2020**, *115*, e200218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Barbosa, A.A.; Silva, M.A.N. da Preferência por local de oviposição de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae), em relação à presença de imaturos da própria espécie, sob condições de laboratório. *Rev. Bras. Zool.* **2002**, *19*, 1147–1152. [[CrossRef](#)]

29. Simard, F.; Nchoutpouen, E.; Toto, J.C.; Fontenille, D. Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *J. Med. Entomol.* **2005**, *42*, 726–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Dixon, A.; Jackson, R.N.; Rowe, R.D.; Nease, R.; Fryxell, R.T.T. *Aedes albopictus* oviposits with other *Aedes* species in artificial oviposition cups: A case study in Knox County, Tennessee, U.S.A. *J. Vector Ecol.* **2020**, *45*, 2–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hashim, N.A.; Ahmad, A.H.; Talib, A.; Athaillah, F.; Krishnan, K.T. Co-breeding association of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) in relation to location and container size. *Trop. Life Sci. Res.* **2018**, *29*, 213–227. [[CrossRef](#)]
32. Santana-Martínez, J.C.; Molina, J.; Dussán, J. Asymmetrical competition between *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (diptera: Culicidae) coexisting in breeding sites. *Insects* **2017**, *8*, 111. [[CrossRef](#)]

Anexo F

Report of mosquito vectors of arboviruses from a federal conservation unit in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, Brazil

Article

Report of Mosquito Vectors of Arboviruses from a Federal Conservation Unit in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro State, Brazil

Shayenne Olsson Freitas Silva ^{1,2}, Cecília Ferreira de Mello ¹, Juan Augusto Rodrigues dos Campos ^{1,2}, Paulo José Leite ¹, Rebeca Sabino ¹ and Jeronimo Alencar ^{1,*}

¹ Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Av. Brazil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

² Graduate Program in Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Av. Brazil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

* Correspondence: jalencar@ioc.fiocruz.br

Abstract: Arbovirus infections, such as dengue, zika, chikungunya, and yellow fever, are a major public health problem worldwide. As the main vectors, mosquitoes have been classified by the Center for Disease Control and Prevention as one of the deadliest animals alive. In this ecological study, we analyzed the population dynamics of important genera and species of mosquito vectors. Mosquito immatures were collected using ovitraps and at natural breeding sites: bamboos and bromeliads. Adult mosquitoes were captured using CDC traps with CO₂, Shannon traps, and manual suction tubes. Collections took place during the rainy and dry seasons from 2019 to 2020 in the Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro state, Brazil. The highest number of species was recorded in the ovitraps, followed by CDC and bromeliads. The breeding site with the lowest diversity was bamboo, though it showed the highest level of evenness compared to the other breeding sites. The medically important genera reported were *Haemagogus* spp., *Aedes* spp., *Culex* spp., and *Wyeomyia* spp. Culicid eggs increased in the rainy season, with a peak in November 2019 and January and February 2020, and lower abundance in the dry season, from September to October 2019. Mosquito eggs had a strong positive correlation ($\rho = 0.755$) with temperature and a moderate positive correlation ($\rho = 0.625$) with rainfall. This study shows how environmental variables can influence the ecology of disease-vector mosquitoes, which are critical in the maintenance of arbovirus circulation in a threatened biome within the most densely populated region of Brazil.

Keywords: Culicidae; *Haemagogus leucocelaenus*; eggs; climatic variables; breeding sites

Citation: Silva, S.O.F.; de Mello, C.; Campos, J.A.R.d.; Leite, P.J.; Sabino, R.; Alencar, J. Report of Mosquito Vectors of Arboviruses from a Federal Conservation Unit in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro State, Brazil. *Life* **2022**, *12*, 1597. <https://doi.org/10.3390/life12101597>

Academic Editor: Yoh Iwasa

Received: 14 September 2022

Accepted: 30 September 2022

Published: 13 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Arbovirus infections are considered a major public health problem [1]. According to the Health Surveillance Department, Brazil recorded 761 suspected human cases of yellow fever (YF) between 2019 and 2020, as well as 603,951 probable cases of dengue, 2058 probable cases of zika, and 17,636 probable cases of chikungunya [2]. These arboviruses are transmitted to humans through bites from infected mosquitoes [3]. Mosquitoes of the genus *Aedes* spp. are important vectors of viruses that cause dengue, zika, and chikungunya, while *Haemagogus* spp. and *Sabethes* spp. are relevant YF and Mayaro virus vectors [4–8].

The co-circulation of dengue (DENV), zika (ZIKV), and chikungunya (CHIKV) viruses has been a burden for urban and peri-urban populations in the tropical and subtropical areas of low- and middle-income countries. A combination of poverty, rapid urban growth, and high-temperature climates sustains mosquito proliferation and the con-

ditions for arboviral outbreaks [9–11]. YF is an important arboviral disease in the American continent, with most cases occurring in Brazil [12]. The territorial area of Brazil is extensive (8,510,345.540 km²) and has a predominantly tropical climate, with vast forested areas in the Amazon region and rainforest remnants on the eastern, southeastern, and southern coasts [13]. The Brazilian Atlantic Coast is considered a global biodiversity hotspot based on the principles of irreplaceability and vulnerability added to the extraordinary endemism of plants and high levels of habitat loss [14]. Transmission of yellow fever virus (YFV) occurs mainly in forest areas between non-human primates and infected mosquitoes; this cycle is highly endemic in the Amazon region and causes sporadic cases or outbreaks of acute febrile illness with arthropathy [8]. In terms of feeding habits and oviposition patterns, *Hg. leucocelaenus* is considered an eclectic mosquito species [15,16].

Mosquito vectors of arboviruses proliferate in a variety of breeding sites, including a wide range of available aquatic environments. In nature, transient natural breeding sites include floods, floodplains, animal burrows, coconuts, shells, and fallen leaves, whereas permanent or semipermanent breeding sites are represented by bamboo internodes and bromeliads [17]. Ovitrap are a reliable and sensitive method since they mimic these natural breeding sites; as such, they are widely used in culicid surveillance for systematic samplings conducted in the field [18]. Ovitrap are considered an excellent instrument for early detection of mosquito-borne arboviruses such as dengue, zika, and yellow fever, which are classified by the Brazilian Ministry of Health as “compulsory and immediate reportable diseases” [19].

Environmental factors appear to have a major impact on the dynamics of arbovirus transmission. Climatic factors like rainfall seem to precede ZIKV and CHIKV epidemics, high temperatures have been shown to increase mosquito population numbers, and mosquito density has been widely associated with the spread of diseases transmitted by them, such as YF [20,21]. The epidemiology of the abovementioned mosquito-borne diseases is affected by rainfall, which plays a key role in the availability of mosquito breeding sites and, hence, their reproduction and proliferation [22]. Particularly in the context of climate change, developing countries face interrelated challenges, from expanding urbanization, inadequate access to infrastructure, and mosquito-borne viruses [23]. In this study, we evaluated the association between climatic variables and mosquito vector densities, along with a comparison of different collection methods and natural breeding sites, in a federal conservation unit situated in an Atlantic Forest fragment of Rio de Janeiro state, Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The permanent license for the collection, capture, and transport of biological material was granted by the Biodiversity Authorization and Information System-(SISBIO)—Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio) with the number: 68206-1. All team members were vaccinated against YF.

2.2. Study Area

This study was conducted in the Serra dos Órgãos National Park (PNSO), located in the municipalities of Teresópolis, Petrópolis, Magé, and Guapimirim, Brazil. The main entry point of the reserve is located near the city of Teresópolis, at Rotariana Avenue (which connects to BR 116 Rio-Bahia at km 89.5 of the municipality), with an altitude of approximately 900 m above sea level [24]. The park has an area of 20,024 hectares, and the vegetation cover is composed of a perennial hydrophilic coastal forest, also classified as dense ombrophilous forest, with a super humid temperate climate [25]. The sampling sites were as follows: Site 1 (22°26′54.0″ S 42°59′09.0″ W), Site 2 (22°27′10.8″ S 42°59′28.8″ W), Site 3 (22°27′21.2″ S 42°59′37.2″ W), Site 4 (22°27′22.3″ S 42°59′49.9″ W), and Site 5 (22°29′39.0″ S 43°00′10.0″ W) (Figure 1).

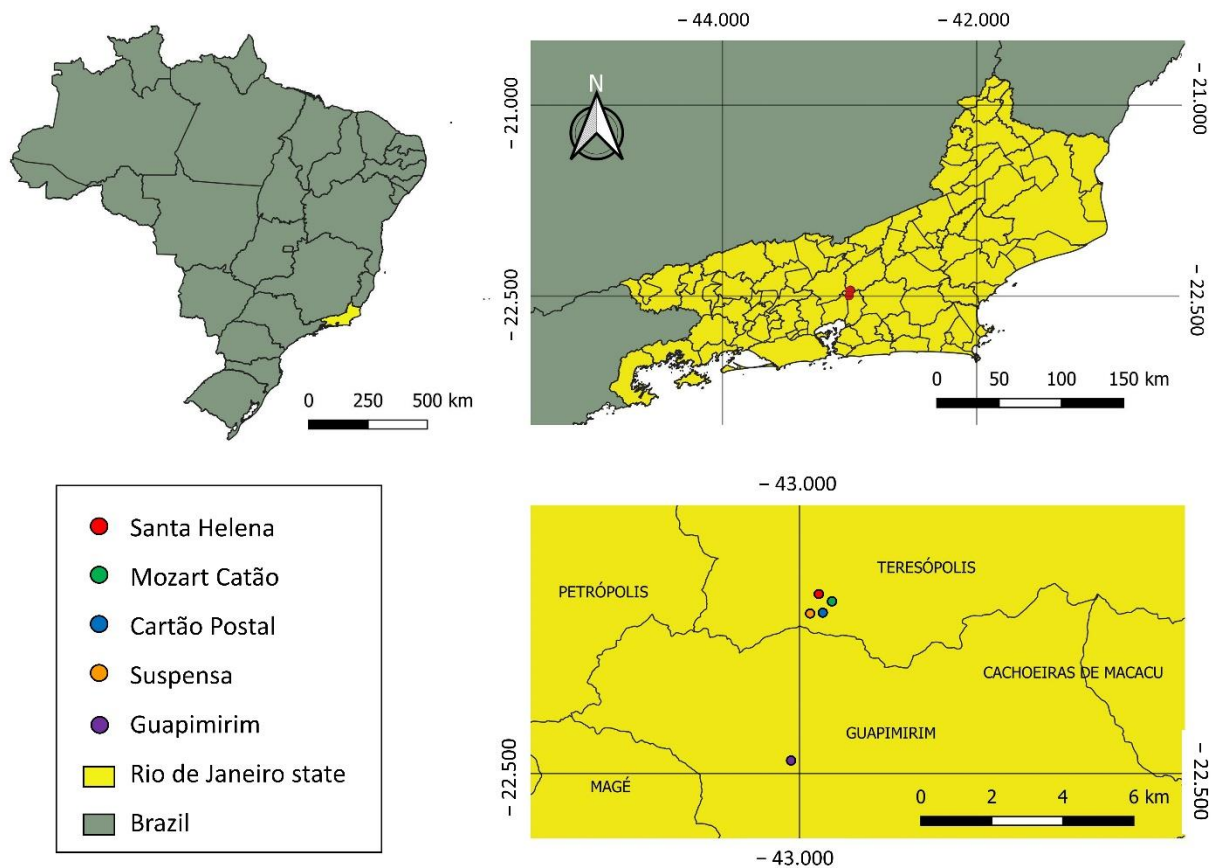


Figure 1. Collection sites at the Serra dos Órgãos National Park (PNSO) located in the municipalities of Teresópolis, Petrópolis, Magé, and Guapimirim, Rio de Janeiro state, Brazil.

2.3. Mosquito Sampling

Sampling was carried out monthly from 2019 to 2020. Oviposition traps (ovitrap) were used for collecting culicid eggs. These traps consist of a black container with a capacity of 500 mL without a lid that resembles a plant pot and contains four wooden oviposition pallets (2.5 cm × 14 cm), held vertically inside the trap by a clip. Natural water and litter were added to each ovitrap in order to recreate a microecosystem similar to the natural ones. The ovi-traps were distributed in five trails (Santa Helena, Cartão Postal, Mozart Catão, Suspensa, and Guapimirim trails) in the PNSO. Ten ovi-traps were distributed per collection site at ground level and at 2 m; two trees at the collection sites Santa Helena and Guapimirim were chosen to install ovi-traps at five heights (ground level, 3 m, 6 m, 9 m, and 12 m). Immatures were also collected from natural breeding sites: bamboos and bromeliads. Adults were collected with CDC traps with CO₂, Shannon traps, and manual suction tubes to catch adult mosquitoes. The eggs present in the pallets of the ovi-traps, along with the collected adult specimens, were sent to the Diptera Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute in the city of Rio de Janeiro, Brazil. The positive pallets (containing eggs) from the ovi-traps were separated, and the eggs were counted, following which they were immersed in transparent trays containing dechlorinated water for three days and spent three days in a dry environment. These conditions allowed us to keep the specimens alive until they reached adulthood for specific determinations, according to the methodology described by Alencar et al. (2013) [26]. The specific identification of adults was performed by direct observation of their morphological characters using a stereomicroscope and dichotomous keys following Arnell (1973), Forattini (2002), and Marcondes and

Alencar (2010) [17,27,28]. The collected and analyzed specimens were listed in the Entomological Collection of the Instituto Oswaldo Cruz under the title “Coleção Mata Atlântica.” The data from the collected mosquitoes, such as the ecological indices per collection method and site, were analyzed using PAST 4.03 statistical software [29].

3. Results

3.1. Species Diversity Per Breeding Site and Collection Method

A total of 6893 culicid eggs were collected, and 1975 mosquitoes were identified to the genus and species levels. The ovitrap had the highest number of species ($S = 14$) and the second-highest diversity index ($H' = 1.71$); however, the equability index was the lowest ($J' = 0.65$) compared to the other collection methods and breeding sites. There was a discrepancy in the number of individuals of each species collected, with some species being found at higher frequencies than others. The ovitraps showed a dominance of *Culex iridescens* (Lutz 1905) (44%), *Limatus durhamii* (Theobald 1901) (14.3%), *Haemagogus leucocelaenus* (Lutz 1904) (14.2%), and *Culex spinosus* (Lutz 1905) (10.5%). The second-highest richness and the highest diversity index were observed in the bromeliad ($S = 11$; $H' = 2.10$); this breeding site also had the highest equability index ($J' = 0.88$), meaning that the number of specimens from each species was similar. The most abundant species in bromeliads were *Culex intermedius* (Lane and Whitman 1951) (29%) and *Culex neglectus* (Lutz 1904) (16%). The CDC trap also showed a high richness and diversity index ($S = 10$; $H' = 1.74$); however, this trap had a low equability index ($J' = 0.76$). The CDC trap showed a particularly high abundance of *Trichoprosopon pallidiventer* (Lutz 1905) (27%). The lowest richness indices were observed in the bamboo ($S = 2$), Shannon ($S = 4$), and active capture methods ($S = 7$). These indices were generated considering only the mosquitoes identified at the species level (Table 1). Many medically important genera were identified in the PNSO; important vector genera found included *Culex* (50%), *Haemagogus* and *Sabethes* (11%), *Aedes* (6%), and *Wyeomyia* (6%).

Table 1. Ecological indices of the collection methods and natural breeding sites in the PNSO from 2019 to 2020.

Mosquito Species/Breeding Sites and Collection Methods	Bamboo	Active Capture	Shannon	Ovitrap	CDC	Bromeliad
<i>Aedes</i> sp.	0	0	0	0	2	0
<i>Ae. (Och.) rhyacophilus</i>	0	0	1	91	0	0
<i>Ae. (Och.) scapularis</i>	0	19	0	0	4	0
<i>Culex (Cux.) mollis</i>	0	6	0	11	54	4
<i>Culex (Cux.)</i> sp.	0	8	13	4	117	1
<i>Cx. (Car.) iridescens</i>	0	0	0	522	5	4
<i>Cx. (Mcx.) aureus</i>	0	0	0	0	0	8
<i>Cx. (Mcx.) imitator</i>	0	0	0	4	0	4
<i>Cx. (Mcx.) intermedius</i>	0	0	0	0	0	28
<i>Cx. (Mcx.) neglectus</i>	0	0	0	2	0	16
<i>Cx. (Mcx.) pleuristriatus</i>	0	0	2	28	0	7
<i>Cx. (Mcx.) retrosus</i>	0	0	0	11	0	7
<i>Cx. (Melanoconion)</i> sp.	0	0	0	0	0	1
<i>Cx. (Mcx.)</i> sp.	0	0	0	0	0	2
<i>Cx. (Cux.) spinosus</i>	0	0	0	124	1	0
<i>Haemagogus (Con.) leucocelaenus</i>	0	0	0	167	0	0
<i>Limatus durhamii</i>	0	1	1	169	65	5
<i>Li. pseudomethisticus</i>	0	2	0	37	1	0
<i>Orthopodomyia albicosta</i>	9	0	0	0	0	0
<i>Sabethes (Pel.) identicus</i>	0	3	0	0	46	0

<i>Trichoprosopon digitatum</i>	25	6	0	1	31	0
<i>Tr. pallidiventer</i>	0	12	4	4	154	0
<i>Trichoprosopon</i> sp.	0	0	0	1	1	0
<i>Toxorhynchites theobaldi/pusillus</i>	0	0	0	2	0	0
<i>Wyeomyia (Pho.) edwardsi</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Wy. (Pho.) pilicauda</i>	0	0	0	0	40	9
<i>Wyeomyia (Pho.)</i> sp.	0	7	4	1	54	1
Total	34	64	25	1179	575	98
Taxa (S)	2	7	4	14	10	11
Shannon (H')	0.58	1.61	1.21	1.71	1.74	2.10
Equitability (J')	0.83	0.83	0.88	0.65	0.76	0.88

S= Species, H'= Shannon's diversity index, J'= Pielou's equability.

3.2. Climatic Factors and Mosquito Abundance

The rainy season, which lasted from December 2019 to February 2020, had the highest number of mosquito eggs collected (4163 eggs), while the dry season, lasting from September to November 2019, had the lowest number (2564 eggs). In January 2020, there was a peak both in the total number of eggs (2056 eggs) collected and in temperature (17.3 °C). The number of eggs and rainfall peaked in November 2019, declined in December, and rose again in January 2020 similarly (INMET, 2020). Regression analysis showed that the number of eggs had a strong positive correlation with temperature ($r = 0.755$) (Figure 2A) and a positive correlation with rainfall ($r = 0.625$), although the latter was not as strong (Figure 2B). The number of culicid eggs considered for each season and associated climate factors was specific to the months of those seasons and the availability of climate data retrieved from the INMET database. The epidemiologically important vector *Hg. leucoce-laenus* was more abundant during November and December 2019 and January 2020, i.e., in the summer season, when the temperatures are high and rainfalls are frequent.

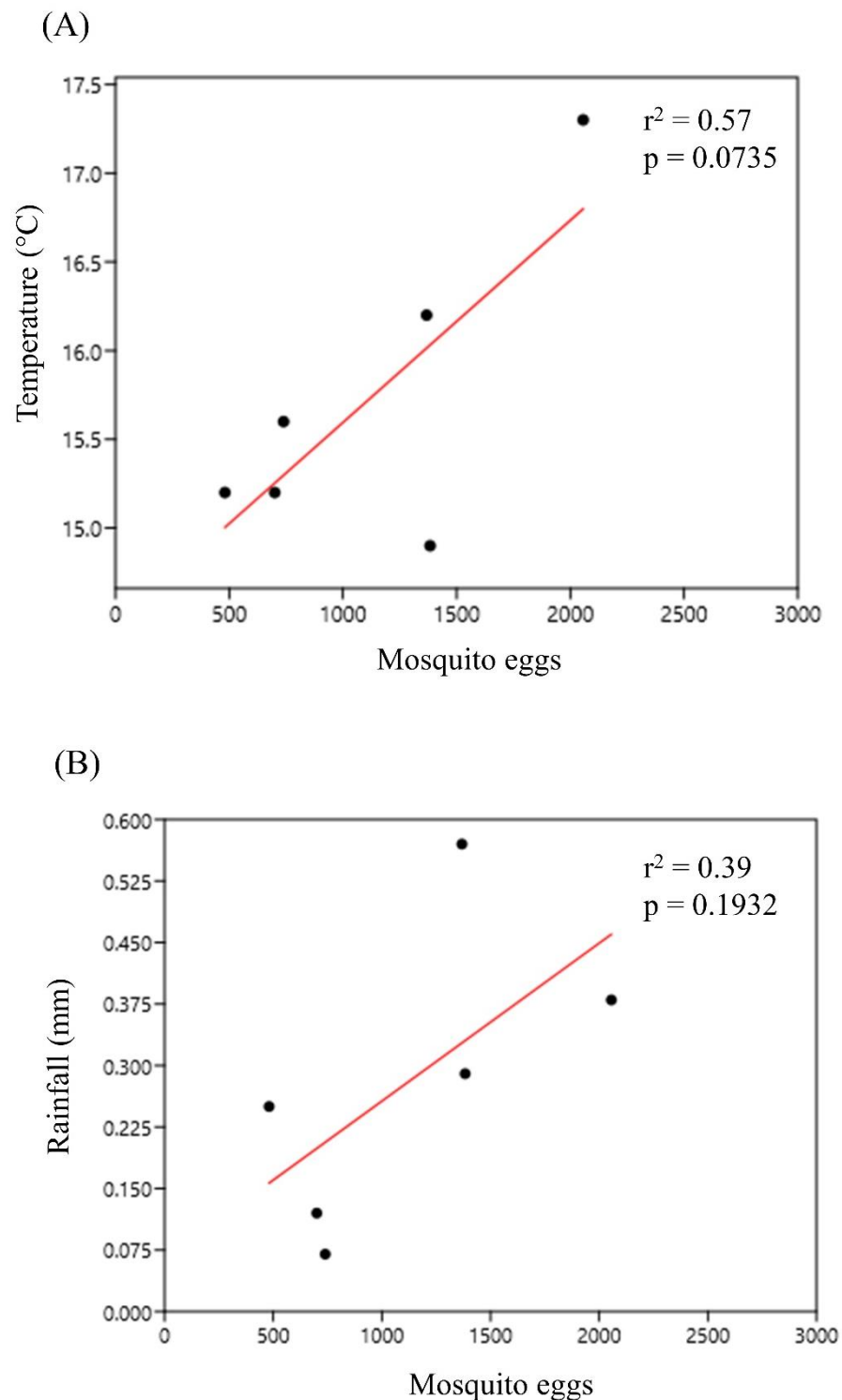


Figure 2. Regression analysis of the climatic factors: (A) temperature (°C) and (B) rainfall with mosquito egg abundance in the PNSO, Rio de Janeiro, Brazil.

3.3. Mosquito Abundance Per Collection Site at Ground Level and in the Tree Canopy

The ovitraps at ground level had the highest number of eggs collected ($n = 5395$), or 86% of all specimens, while the remaining 14% were found in the ovitraps at 2 m ($n = 891$). Considering only the individuals identified at the species level, the collection sites with the highest number of individuals collected were Mozart Catão ($n = 553$), Santa Helena (n

= 440), and Cartão Postal ($n = 331$). Santa Helena had the highest values of diversity index ($H' = 2.024$) and equability index ($J' = 0.7475$), while Suspensa had the lowest diversity index ($H' = 0.811$) and a high dominance of *Cx. spinosus*. The other collection sites had similar diversity indices, with Mozart Catão presenting dominance of *Cx. iridescens* and Guapimirim of *Hg. leucocelaenus* (Figure 3A). The species that were only found in the ovitraps at ground level were *Cx. imitator*, *Cx. neglectus*, *Tx. theobaldi/pusillus*, *Tr. digitatum*, and *Tr. pallidiventer*. The species that were found at both levels but were more abundant at ground level were *Ae. rhyacophilus*, *Cx. mollis*, *Cx. spinosus*, *Cx. iridescens*, *Li. durhamii*, and *Li. pseudomethisticus*. Only two species were more abundant at 2 m: *Hg. leucocelaenus* and *Cx. pleuristriatus*. Considering the ovitraps that were distributed at five heights in relation to ground level (ground, 3 m, 6 m, 9 m, and 12 m), the highest number of eggs were observed at 3 m ($n = 132$), 6 m ($n = 138$), and 9 m ($n = 116$) (Figure 3B). The heights with the lowest egg abundance were at ground level ($n = 55$) and 12 m ($n = 69$). The medically important mosquito species *Hg. leucocelaenus* had most eggs at the heights of 6 m ($n = 35$) and 12 m ($n = 32$) (Figure 3C).

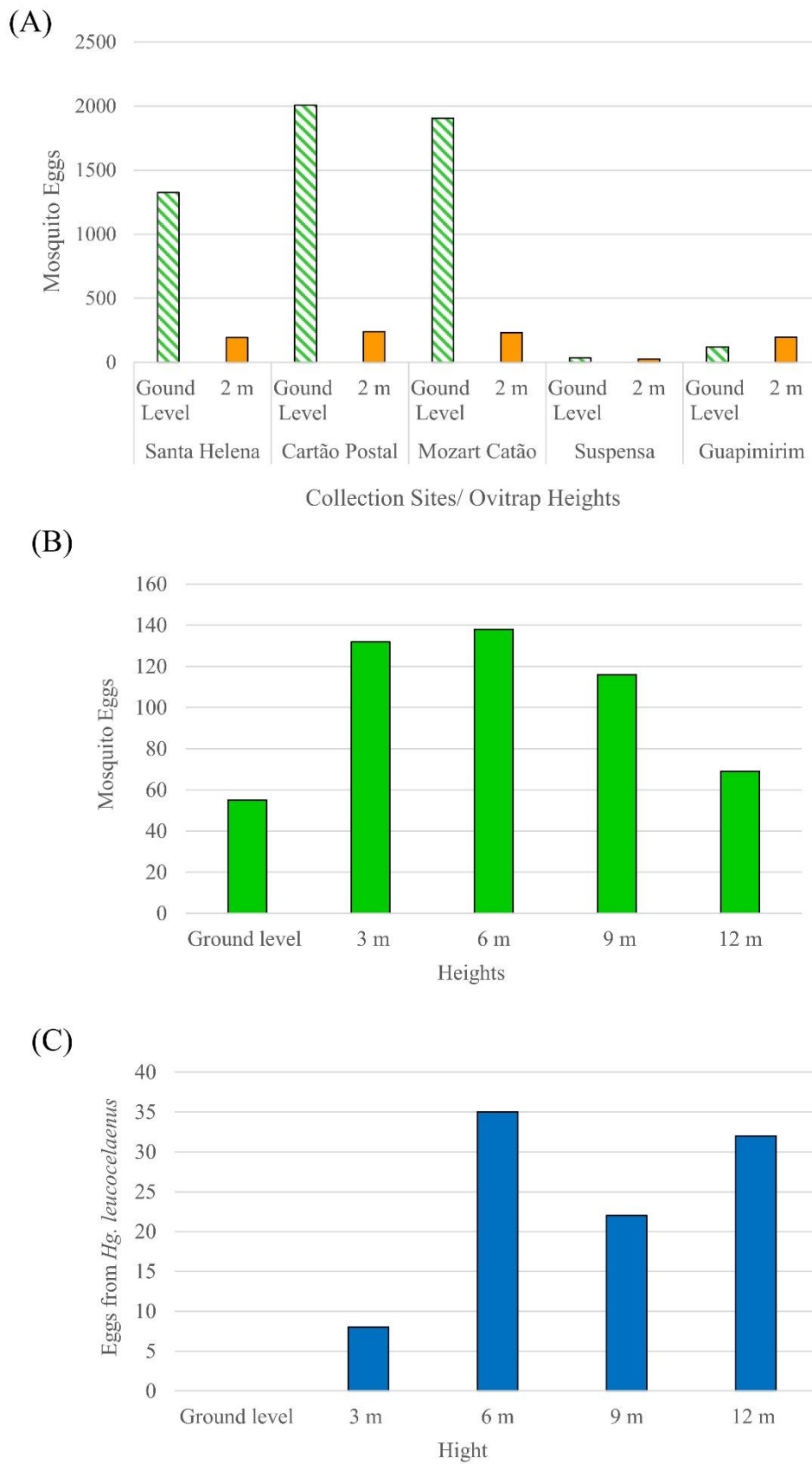


Figure 3. Mosquito egg abundance per collection site (A) and at different heights (B), eggs from the mosquito vector *Hg. leucocelaenus* per height (C).

4. Discussion

Ovitrap have a remarkable potential for systematic sampling in longitudinal and cross-sectional ecological studies in neotropical settings [30]. In our study, this collection method had the highest number of species and the second-highest diversity index. Species of the genus *Haemagogus* spp. are known to have a clear acrodendrophilic preference [28]. Here, we show that eggs from *Hg. leucocelaenus* were more abundant in the ovitraps installed at 6 m and 12 m above ground level. Our results are quite similar to those from a study conducted on the border between the states of Minas Gerais and Rio de Janeiro, in which the authors showed that the same species had the highest frequency of eggs in traps located at the highest levels of the trees [26]. Another study performed at an Ecological Reserve (REGUA) in the municipality of Cachoeiras de Macacu showed that the species was found more frequently in ovitraps set at 5 m or higher, while species of the genus *Limatus* were usually collected at ground level [31]. This was also observed in our study, with *Li. durhamii* and *Li. pseudomethisticus* being more abundant in ovitraps set at ground level.

The highest diversity index and second-highest richness were observed in bromeliads. Several species of mosquitoes use the water accumulated in bromeliads for breeding [3]. The most abundant species in this breeding site were *Cx. intermedius* and *Cx. neglectus*; these findings were very similar to those of a study performed in the municipality of Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brazil, where the dominant species were also from the same genus: *Cx. pleuristriatus* and *Cx. ocellatus*. Species of the subgenus *Microculex* are frequently found colonizing permanent natural breeding sites such as bromeliads, tree holes, and bamboo internodes [32]. In our study, *Tr. digitatum* was the only species found colonizing bamboo internodes. According to Thomas et al., bamboo internodes are one of the species' natural breeding sites; however, they can also be found in fallen fruit husks and water storage pots [33].

The rainy season had the highest number of mosquito eggs collected, and the eggs showed a positive correlation with rainfall. These findings corroborate those of a study on the diversity of culicid vectors in an Atlantic Forest remnant also performed with ovitraps; the authors noticed that culicid diversity was greatest in the rainy season [34]. There are many studies regarding wet and dry seasons' effect on malaria vector mosquitoes of the genus *Anopheles*; however, there are few studies on the effects of these seasons on YF vector mosquitoes of the genera *Haemagogus*, *Sabethes*, and *Wyeomyia*, like the ones described in this study [7,35,36]. We also observed mosquitoes of the genus *Aedes*, known for pathogen transmission of many arboviral diseases such as dengue, zika, and chikungunya [3,37]. Seventy-three percent of the individuals collected in the PNSO belonged to these epidemiologically important genera of mosquitoes. Since a positive and strong correlation was found between mosquito egg density with climatic variables temperature and rainfall, the wet months where the rain is heavy and temperatures are high, like December, January, and February, are expected to have high mosquito densities. The medically important vector *Hg. leucocelaenus* was reported with high densities at Guapimirim; this represents an alarming finding since this site is a touristic location of the PNSO near one of the park's main entry points, the guardhouse, and the visitor center. The proximity of these mosquitoes to places with a high concentration of people represents a potential risk of pathogen transmission if these mosquitoes are infected and bite humans. Particular caution must be taken by visitors and workers at the park in months with higher densities of this vector. Personal protection measures against mosquitoes include the use of insect repellents, avoiding exposure to the peak of mosquito activity during the evening crepuscular period, and the use of long-sleeved shirts and pants when going into the woods. Regarding the workers who have to be exposed to these periods, the use of permethrin-treated clothing for personal protection is also recommended [38–40]. It is worth emphasizing that, in the present study, this species was found with higher abundance in Guapimirim during November and December 2019 and January 2020.

5. Conclusions

We were able to establish preliminary parameters of how environmental changes influence the ecology of important disease-vector mosquitoes, which is critical for the circulation of arboviruses in one of the most threatened biomes and most densely populated regions of Brazil. The presence of vector species in natural breeding sites and the high density of these mosquitoes in specific seasons of the year (in this case, the wet season) highlights the importance of monitoring the emergence of febrile diseases among people visiting the PNSO. A deeper understanding of mosquito ecology based on these findings and studies with a similar approach will strengthen future mosquito control strategies in Atlantic Forest ecosystems in Rio de Janeiro, Brazil.

Author Contributions: Conceptualization: S.O.F.S. and J.A.; formal analysis: S.O.F.S.; methodology: J.A.R.d.C., S.O.F.S., C.F.d.M., P.J.L. and R.S.; supervision: J.A.; writing—original draft: S.O.F.S. and J.A.; writing—review and editing: S.O.F.S. and J.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (grant numbers E-26/202.658/2018; E-26/010.101076/2018), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number 303286/2021-0).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Weaver, S.C.; Reisen, W.K. Present and future arboviral threats. *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 328–345.
- MS/SVS. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes. *Bol. Epidemiológico Arboviroses.* **2020**, *51*, 1–33.
- Consoli, R.A.; Oliveira, R.L.D. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil—Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciência e Tecnologia em Saúde Para a População Brasileira*; FIOCRUZ: Rio de Janeiro, Brazil, 1994; p. 228.
- Romero, D.; Olivero, J.; Real, R.; Guerrero, J.C. Applying fuzzy logic to assess the biogeographical risk of dengue in South America. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 428.
- Gómez, M.M.; de Abreu, F.V.S.; dos Santos, A.A.C.; de Mello, I.S.; Santos, M.P.; Ribeiro, I.P.; Ferreira-De-Brito, A.; de Miranda, R.M.; de Castro, M.G.; Ribeiro, M.S.; et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 536–548.
- Vasconcelos, P.F.; Bryant, J.E.; Da Rosa, A.P.T.; Tesh, R.B.; Rodrigues, S.G.; Barrett, A.D. Genetic Divergence and Dispersal of Yellow Fever Virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 1578–1584.
- Cardoso, J.d.C.; de Almeida, M.A.B.; dos Santos, E.; da Fonseca, D.F.; Sallum, M.A.M.; Noll, C.A.; Monteiro, H.A.d.O.; Cruz, A.C.R.; Carvalho, V.L.; Pinto, E.V.; et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1918–1924.
- Figueiredo, L.T.M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2015**, *48*, 233–234.
- Zara, A.L.D.S.A.; Santos, S.M.D.; Fernandes-Oliveira, E.S.; Carvalho, R.G.; Coelho, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: Uma revisão. *Epidemiol. Serviços Saúde.* **2016**, *25*, 391–404.
- Girard, M.; Nelson, C.B.; Picot, V.; Gubler, D.J. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine* **2020**, *38*, 3989–3994.
- Lowe, R.; Lee, S.; Lana, R.M.; Codeço, C.T.; Castro, M.C.; Pascual, M. Emerging arboviruses in the urbanized Amazon rainforest. *BMJ* **2020**, *371*, m4385.
- Vasconcelos, P.F.d.C. Febre amarela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2003**, *36*, 275–293.
- IBGE. Áreas Territoriais. 2021. Available online: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15761-areas-dos-municipios.html?=&t=saiba-mais-edicao> (accessed on 19 April 2021).
- Mittermeier, R.A.; Turner, W.R.; Larsen, F.W.; Brooks, T.M.; Gascon, C. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In *Biodiversity Hotspots*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; pp. 3–22.
- Alencar, J.; Dégallier, N.; Hannart, A.; Silva, J.D.S.; Pacheco, J.B.; Guimarães, A. Circadian and seasonal preferences for hematophagy among *Haemagogus capricornii*, *Hg. janthinomys*, and *Hg. leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *J. Vector Ecol.* **2008**, *33*, 389–392.
- Tátilla-Ferreira, A.; Maia, D.D.A.; De Abreu, F.V.S.; Rodrigues, W.C.; Alencar, J. Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae), a vector of wild yellow fever in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* **2017**, *59*, e60.
- Forattini, O.P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*; Edusp-Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, Brazil, 2002; p. 549.

18. Navarro, J.-C.C.; Machado-Allison, C.E. Aspectos ecológicos de *Sabethes chloropterus* (Humboldt) (Diptera: Culicidae) en un bosque húmedo del Edo. *Boletín Entomol Venez.* **1995**, *10*, 91–104.
19. SVS. Monitoramento dos Casos de Arboviroses Urbanas Causados por Vírus Transmitidos pelo Mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 7, 2022. Available online: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-07-2022.pdf> (accessed on 30 August 2022).
20. Fuller, T.L.; Calvet, G.; Estevam, C.G.; Angelo, J.R.; Abiodun, G.J.; Halai, U.-A.; De Santis, B.; Sequeira, P.C.; Araujo, E.M.; Sampaio, S.A.; et al. Behavioral, climatic, and environmental risk factors for Zika and Chikungunya virus infections in Rio de Janeiro, Brazil, 2015–2016. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188002.
21. Bellone, R.; Failloux, A.-B. The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 584846.
22. Bicout, D.J.; Vautrin, M.; Vignolles, C.; Sabatier, P. Modeling the dynamics of mosquito breeding sites vs rainfall in Barkedji area, Senegal. *Ecol. Model.* **2015**, *317*, 41–49.
23. Kazazian, L.; Neto, A.S.L.; Sousa, G.S.; Nascimento, O.J.D.; Castro, M.C. Spatiotemporal transmission dynamics of co-circulating dengue, Zika, and chikungunya viruses in Fortaleza, Brazil: 2011–2017. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008760.
24. ICMBio. Parque Nacional Da Serra Dos Órgãos. Available online: <https://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/guia-dovisitante.html> (accessed on 30 August 2022).
25. ICMBio. Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Parnaso). Available online: <https://www.icmbio.gov.br/parnaserradosorgaos/> (accessed on 30 August 2022).
26. Alencar, J.; Morone, F.; De Mello, C.F.; Dégallier, N.; Lucio, P.S.; Da Serra-Freire, N.M.; Guimaraes, A. Flight Height Preference for Oviposition of Mosquito (Diptera: Culicidae) Vectors of Sylvatic Yellow Fever Virus Near the Hydroelectric Reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 791–795.
27. Arnell, J.H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **1973**, *10*, 1–174.
28. Marcondes, C.; Alencar, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev. Biomed.* **2010**, *21*, 221–238.
29. Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentol. Electron.* **2001**, *4*, 9.
30. Chaverri, L.G.; Dillenbeck, C.; Lewis, D.; Rivera, C.; Romero, L.M.; Chaves, L.F. Mosquito Species (Diptera: Culicidae) Diversity from Ovitrap in a Mesoamerican Tropical Rainforest. *J. Med. Entomol.* **2018**, *55*, 646–653.
31. Alencar, J.; de Mello, C.F.; Gil-Santana, H.R.; Guimarães, A.; de Almeida, S.A.S.; Gleiser, R.M. Vertical oviposition activity of mosquitoes in the Atlantic Forest of Brazil with emphasis on the sylvan vector, *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* **2016**, *41*, 18–26.
32. Forattini, O.P. *Entomologia médica. In Culicini: Culex, Aedes e Psorophora*; Sao Paulo University: Sao Paulo, Brazil, 1965; p. 506. Available online: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/entomologia-médica-20-volume-culicini-ltemgtculexltemgt-ltemgtaedesltemgt-e-ltemgtpsorophoraltemgt> (accessed on 30 August 2022).
33. Sherratt, T.N.; Church, S.C. Ovipositional preferences and larval cannibalism in the Neotropical mosquito *Trichoprosopon digitatum* (Diptera: Culicidae). *Anim. Behav.* **1994**, *48*, 645–652.
34. de Araujo-Oliveira, A.; Gil-Santana, H.R.; Teixeira, C.d.S.B.; dos Santos-Mallet, J.R.; Alencar, J. Evaluation of the Diversity of Culicidae Vectors of the Sylvatic Yellow Fever Virus in Atlantic Forest Remnants with the Use of Ovitrap and Bamboo Traps. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2021**, *21*, 875–883.
35. Ceretti-Junior, W.; Christe, R.D.O.; Rizzo, M.; Strobel, R.C.; Junior, M.O.D.M.; De Mello, M.H.S.H.; Fernandes, A.; Medeiros-Sousa, A.R.; De Carvalho, G.C.; Marrelli, M.T. Species Composition and Ecological Aspects of Immature Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Bromeliads in Urban Parks in the City of São Paulo, Brazil. *J. Arthropod Borne Dis.* **2015**, *10*, 102–112.
36. Freitas Silva, S.; de Mello, C.; Machado, S.; Leite, P.; Alencar, J. Interaction of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) and Other Mosquito Vectors in a Forested Area, Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 94.
37. Kean, J.; Rainey, S.M.; McFarlane, M.; Donald, C.L.; Schnettler, E.; Kohl, A.; Pondeville, E. Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in Aedes Mosquitoes. *Insects* **2015**, *6*, 236–278.
38. Alpern, J.D.; Dunlop, S.J.; Dolan, B.J.; Stauffer, W.M.; Boulware, D. Personal Protection Measures Against Mosquitoes, Ticks, and Other Arthropods. *Med. Clin. N. Am.* **2016**, *100*, 303–316.
39. Forattini, O.P.; Gomes, A.d.C. Biting activity of *Aedes scapularis* (Rondani) and *Haemagogus* mosquitoes in Southern Brazil (Diptera: Culicidae). *Rev. Saude Publica* **1988**, *22*, 84–93.
40. Orsborne, J.; Banks, S.D.; Hendy, A.; Gezan, S.A.; Kaur, H.; Wilder-Smith, A.; Lindsay, S.W.; Logan, J.G. Personal Protection of Permethrin-Treated Clothing against *Aedes aegypti*, the Vector of Dengue and Zika Virus, in the Laboratory. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152805.

Anexo G

Occurrence of the sylvatic yellow fever vector mosquito *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment of the touristic State of Rio de Janeiro, Brazil

Behavior, Chemical Ecology

Occurrence of the Sylvatic Yellow Fever Vector Mosquito *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest Fragment of the Touristic State of Rio de Janeiro, Brazil

Shayenne Olsson Freitas-Silva^{1,2} Cecília Ferreira-de Mello^{1,3} Anthony-Érico Guimarães¹
Paulo-José Leite¹ and Jeronimo Alencar^{1,4,✉}

¹Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Avenue Brazil 4365, 21040-360 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil, ²Graduate Program in Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute (FioCruz), Rio de Janeiro, Brazil, ³Graduate Program in Animal Biology, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil, and ⁴Corresponding author, e-mail: jalencar@ioc.fiocruz.br

Subject Editor: Barry Alto

Received 28 June 2022; Editorial decision 16 September 2022.

Abstract

The yellow fever virus is estimated to cause 30,000 deaths each year worldwide, with the majority of cases and deaths occurring in Africa. The virus is also endemic to Central and South America, including northern and western Brazil. The sylvatic cycle of the virus is related to wild and rural areas, with nonhuman primates as the primary host and wild mosquitoes, specifically from the genera *Haemagogus*, as vectors. The diversity of the mosquito community plays a significant role in the increase of pathogen transmission to humans. In the present study, we detected fluctuation in populations of vector mosquitoes using ovitraps for Culicidae egg collection. The study area is a forest fragment of the Atlantic Forest, one of the most threatened biomes in Brazil. This biome has been suffering significant deforestation due to anthropic activity. Worryingly, the proximity of human populations to forest environments increases the risk of spreading disease from forest fragments to urban areas. Our findings showed that the highest egg abundance occurred in December 2019, with a significant difference ($p = 0.005$) between rainy and dry seasons. Most eggs were collected during the rainy period. Subsequent quantification of specimens from epidemiologically relevant species hatched from field-collected eggs resulted in 1,131 (86%) *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924), 111 (8%) *Aedes terreus* (Walker, 1856), 47 (4%) *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), and 21 (2%) *Haemagogus janthinomys* (Dyar, 1921). Finally, we assessed the behavior of different vector species performing oviposition on the same breeding site. The highest correlation coefficient was observed between *Ae. albopictus* and *Ae. terreus* ($\rho = 0.52$) concerning other Culicidae species. Therefore, we believe that Culicidae population surveillance is crucial for disease monitoring since the increase in specimens of a number of vector species influences the emergence of yellow fever cases in nonhuman primates and human populations.

Key words: *Haemagogus leucocelaenus*, vector, yellow fever, correlation, rainy period

Yellow fever (YF) is an acute viral noncontagious hemorrhagic disease transmitted by infected mosquitoes (WHO 2019). Yellow fever virus (YFV) is estimated to cause 200,000 cases of disease and 30,000 deaths each year (CDC 2018) in the globe. This virus is endemic in tropical areas of Africa and Central and South America (WHO 2019). Specifically, for Brazil, sylvatic YF is endemic in the northern and

western areas of the country. YFV has advanced throughout Brazil since its reemergence in the Midwest region in 2014, reaching areas with low vaccination coverage and where vaccination has not been previously recommended (MS 2020a). The sylvatic cycle of the virus is related to wild and rural areas, with monkeys as the primary host and wild mosquitoes, specifically *Haemagogus* spp. Williston, 1896, as

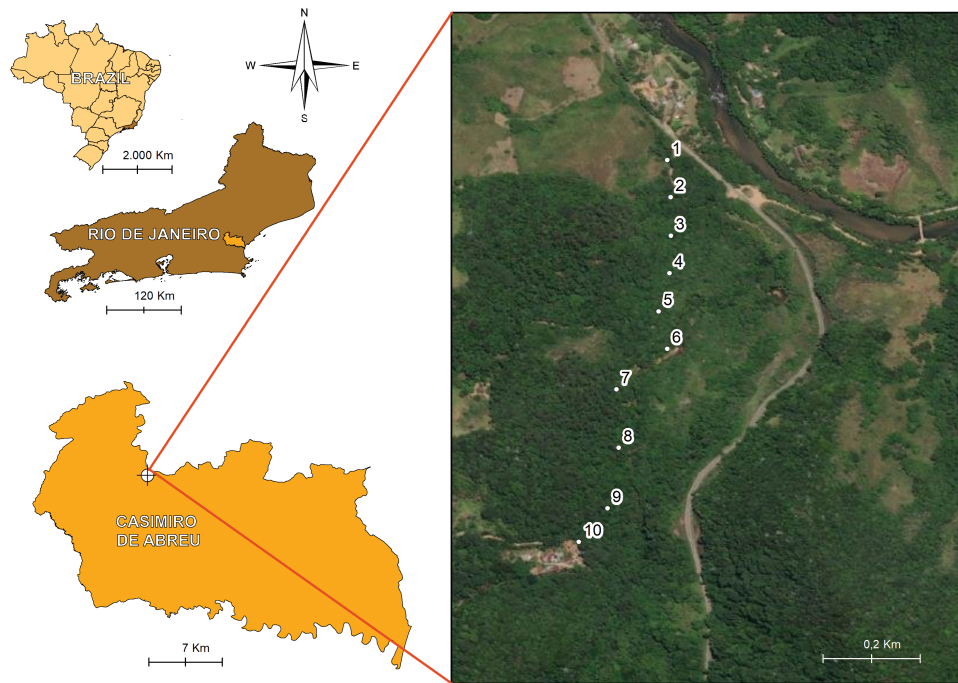


Fig. 1. Sampling sites in the Sana Environmental Protection Area, located in the sixth district of Macaé, Rio de Janeiro, Brazil. $22^{\circ} 25'44.9''$ S $42^{\circ} 12'17.5''$ W; $22^{\circ} 25'47.4''$ S $42^{\circ} 12'17.3''$ W; $22^{\circ} 25'49.9''$ S $42^{\circ} 12'17.3''$ W; $22^{\circ} 25'52.4''$ S $42^{\circ} 12'17.3''$ W; $22^{\circ} 25'55.0''$ S $42^{\circ} 12'18.1''$ W; $22^{\circ} 25'57.5''$ S $42^{\circ} 12'17.5''$ W; $22^{\circ} 26'00.2''$ S $42^{\circ} 12'20.9''$ W; $22^{\circ} 26'04.1''$ S $42^{\circ} 12'20.7''$ W; $22^{\circ} 26'08.1''$ S $42^{\circ} 12'21.5''$ W; $22^{\circ} 26'10.4''$ S $42^{\circ} 12'23.4''$ W. Maps were prepared in QGIS 3.14.16 software and edited in Adobe Photoshop CS5 and CorelDraw X5. Reprinted from QGIS 3.14.16, a program under a CC BY license, with permission from Jeronimo Alencar - Fiocruz, original copyright 2021.

vectors (de Abreu et al. 2019). Regarding natural habitats, the Atlantic Forest biome includes a range of forest morphologies harboring a rich and diverse mosquito community that displays considerable spatial variability (Correa et al. 2014). This natural condition is relevant since the risk of pathogen transmission from vectors to humans can significantly increase depending on mosquito community diversity (Keesing et al. 2006). Among this diverse community, the genus *Haemagogus* comprises 28 species widely distributed in the American continent (Marcondes and Alencar 2010). Of these species, *Hg. janthinomys* Dyar, 1921 is known as the primary vector; however, the species *Hg. leucocelaenus* Dyar & Shannon, 1924 is recognized as having a role in maintaining YFV in nature (Vasconcelos et al. 2003). Moreover, *Hg. leucocelaenus* has been detected in the states of Rio de Janeiro and São Paulo, which is alarming since these states represent Brazil's most densely populated regions (Zavartink 1972, IBGE 2010). *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* were considered the primary vectors in the biggest yellow fever outbreak that occurred in Brazil between 2016 and 2018, and the species *Hg. leucocelaenus* was found naturally infected with YFV in Rio de Janeiro State in 2019 (de Abreu et al. 2019). Hence, given the relevance of vector mosquitoes in public health, our study aimed to quantify, compare, and describe the fluctuation of Culicidae populations collected in an Atlantic Forest fragment with circulating YFV in Rio de Janeiro State.

Material and Methods

Ethics Statement

The permanent license for collecting, capturing, and transporting the biological material used in this study was granted by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO)/Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMbio) under number 34911-1. All research team members were previously vaccinated against YFV.

Study Area

The Figueira Branca Environmental Protection Area (APA) is located near the district of Casimiro de Abreu, in Macaé, Rio de Janeiro State, Brazil. This region is included in the Macaé State Environmental Protection Area, covering an area of 350.37 km² (Fig. 1), and is characterized by a predominant humid mesothermal climate and dense montane and submontane rainforest vegetation (INEA 2014).

Collection and Rearing of Immature Culicids

Culicidae eggs were sampled from September 2019 to April 2021 using 20 ovitraps placed at each collection site in a forest environment at 150 m from each other. The ovitraps were installed in trees at a height of 2.50 m and sequentially numbered. Each ovitrap consisted of a 500 ml lid-less black pot containing four plywood pallets (Eucatex pallets), each measuring 2.5 × 14 cm, fixed vertically inside the trap by clips (Silva et al. 2018). These pallets were examined every two weeks for egg detection and counting. Immediately after arriving in the laboratory, the positive pallets (pallets containing eggs) were immersed in white trays filled with dechlorinated water at $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and kept in an acclimatized chamber for hatching. After three days, the pallets were removed from the water and left to air-dry for another three days to quantify the hatched larvae. The immature forms were reared with TetraMint fish food (Tetra, Blacksburg, VA) and monitored daily. After the specimens reached the adult stage, Culicidae identification to genera and species level was conducted. Identifications were made by direct observation of morphological characters under a Zeiss stereo microscope, consulting the respective spp descriptions/diagnoses in dichotomous keys developed by Consoli and Lourenço-de-Oliveira (1994), Forattini (2002), and Marcondes and Alencar (2010). Abbreviations of genera and subgenera names were assigned following Reinert (2009).

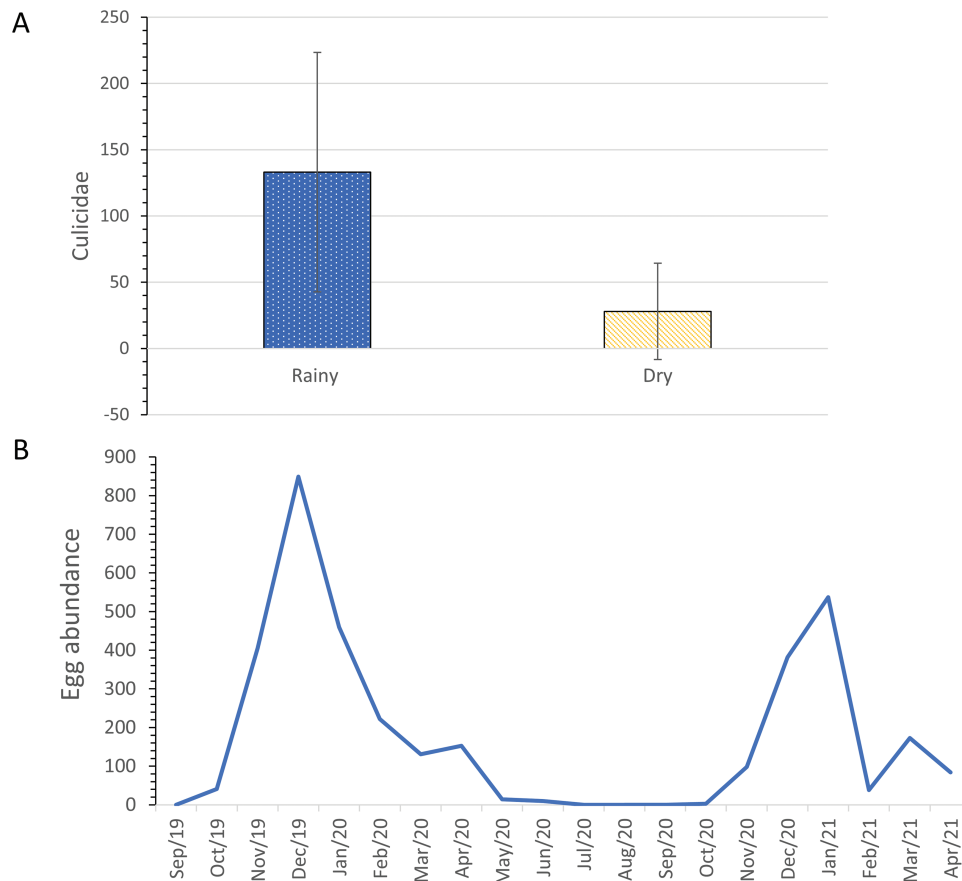


Fig. 2. Statistically significant difference ($p \leq 0.01$) between the number of Culicidae eggs collected during the rainy and dry periods ($p = 0.005$) (A). Egg abundance during the collection period (Sept/19–Apr/21) in the Figueira Branca Environmental Protection Area (APA) (B).

Table 1. Descriptive indices for egg collection and capture in Figueira Branca, Casimiro de Abreu – Rio de Janeiro State, Brazil

Month/year	OPI (%)	EDI (n)	AEI (n)	LPI (%)	LDI (n)	MLI (n)	Total	
							Eggs	Larvae
Sept./19	0	0	0	0	0	0	0	0
Oct./19	0.20	20.50	0.92	0.20	18	1.50	41	36
Nov./19	0.90	45.11	10.35	0.90	36.89	12.30	406	332
Dec./19	0.70	121.29	8.05	0.50	58.20	14.55	849	291
Jan./20	0.90	51.11	9.70	0.90	42.11	12.63	460	379
Feb./20	0.60	37	5.82	0.60	31.33	7.52	222	188
Mar./20	0.20	65.50	4.60	0.20	57.50	4.93	131	115
April/20	0.30	51	3.20	0.30	50.33	5.59	153	151
May/20	0.10	14	0.33	0.20	7	0.63	14	14
June/20	0.10	10	0.17	0.10	10	0.33	10	10
July/20	0	0	0	0	0	0	0	0
Aug./20	0	0	0	0	0	0	0	0
Sept./20	0	0	0	0	0	0	0	0
Oct./20	0.10	3	0.06	0.10	3	0.11	3	3
Nov./20	0.20	49	1.35	0.20	12	0.80	98	24
Dec./20	0.70	54.57	4.95	0.70	38.29	8.93	382	268
Jan./21	0.70	76.71	11.70	0.40	29.25	4.88	537	117
Feb./21	0.20	19	0.66	0.20	8.50	0.59	38	17
Mar./21	0.30	57.67	5.89	0.30	51	6.65	173	153
April/21	0.30	28	1.35	0.40	15	2	84	60

OPI, Ovitrap Positivity Index; EDI, Egg Density Index; AEI, Average Egg Index; LPI, Larvae Positivity Index; LDI, Larvae Density Index; MLI, Mean Larvae Index.

Statistical Analysis

The following indexes were calculated to conduct specific analysis on ovitrap efficiency: 1) Ovitrap Positivity Index (OPI) = (Number

of positive traps with eggs/Number of inspected ovitraps × 100); 2)

Egg Density Index (EDI) = (Total eggs in pallets/Total positive traps);

3) Average Egg Index (AEI) = (Number of eggs collected/Number of

ovitraps inspected); 4) Larvae Positivity Index (LPI) = (Number of positive traps with larvae/Number of ovitraps inspected \times 100); 5) Larvae Density Index (LDI) = (Total larvae in traps/Total positive traps); and 6) Mean Larvae Index (MLI) = (Number of larvae collected/Number of traps inspected). The quantity of Culicidae eggs was assessed for dry and rainy seasons, and the Mann–Whitney test was used to analyze the statistical significance of differences in egg abundance between these seasons. A regression analysis was performed between the number of eggs collected and temperature, rainfall, and relative humidity. The environmental variables were obtained from the Climate-Data.org website (Climate-Data.org 2022). In addition, the male-to-female ratio of the mosquitoes emerging from the collected eggs was calculated. A Kruskal–Wallis test, followed by Dunn’s post hoc test, was used to assess the statistical difference between the number of individuals belonging to each epidemiologically relevant species found in the study area. The correlation between different species found at the same collection sites was assessed by Spearman’s correlation test.

Results

From the 3,601 eggs collected during the entire sampling period, 141 (3.9%) were already hatched on the pallets. Of the remaining 3,460 viable eggs hatched in the laboratory, 1,310 eggs (37.9%) belonged to the Culicidae species of epidemiological relevance *Hg. leucocelaenus* ($n = 1,131$; 86%), *Aedes terreus* Walker, 1856 ($n = 111$; 8%), *Aedes albopictus* Skuse, 1894 ($n = 47$; 4%), and *Hg. janthinomys* ($n = 21$; 2%).

Culicidae Eggs Related to Seasons and Climatic Variables

The number of Culicidae eggs collected showed a highly significant difference ($p \leq 0.01$) between the rainy and dry periods ($p = 0.005$) (Fig. 2A). The month with the highest egg abundance was December 2019, representing 24% of all eggs collected during the study period and thus recording the largest EDI and LDI. After January 2020, there was a decrease in the OPI, which only increased again in December 2020 and January 2021 (70%) (Table 1). Over time, it is possible to notice a decrease in the number of eggs from the beginning to the end of the collection period (Fig. 2B). The decreased culicid population in the studied area during the colder months (July, August, and September 2020) may have influenced the lower number of positive ovitraps since OPI was zero (Table 1).

A regression analysis was conducted between the number of eggs collected and the environmental variables of temperature, rainfall, and relative air humidity to assess whether or not there was a correlation between egg abundance and climatic variables. In this way, the highest coefficient of determination was obtained for the variable rainfall ($r^2 = 0.709$; $p = 0.002$), indicating that this variable explained about 71% of a statistically significant variation ($p \leq 0.05$) in the number of eggs. The coefficient of determination regarding temperature was $r^2 = 0.429$, with $p = 0.040$, a positive and statistically significant correlation ($p \leq 0.05$). In contrast, for the humidity variable, the values were $r^2 = 0.176$ and $p = 0.227$, showing a positive but not statistically significant correlation (Fig. 3).

Epidemiologically Relevant Culicidae Emerged from Eggs Collected with Ovitrap

Ovitrap 3, 9, and 10 showed the highest average and total number of collected eggs (Fig. 4A). Regarding sex ratio, a higher percentage of females ($F = 51\%$) than males ($M = 49\%$) was observed. The percentages for each vector species were as follows: *Hg. leucocelaenus*

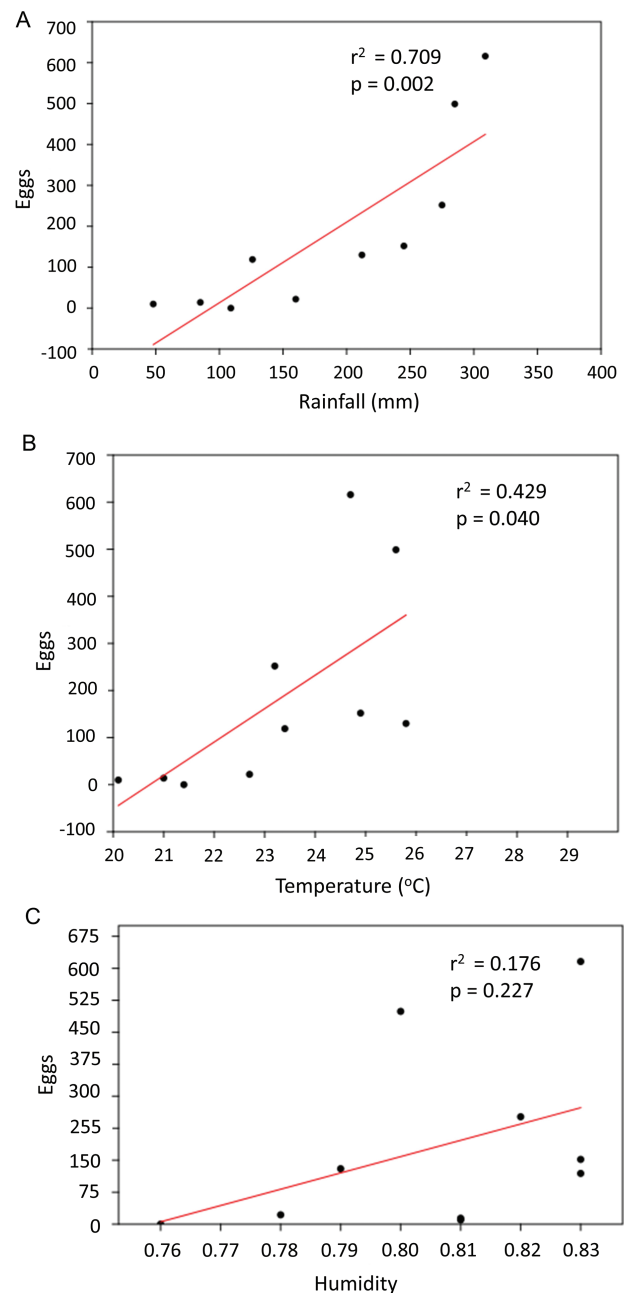


Fig. 3. Regression analysis between the number of eggs collected and environmental variables of temperature (A), rainfall (B), and relative air humidity (C).

($F = 54\%$, $M = 46\%$), *Hg. janthinomys* ($F = 57\%$, $M = 43\%$), *Ae. albopictus* ($F = 57\%$, $M = 43\%$), *Ae. terreus* ($F = 64\%$, $M = 36\%$). Ovitrap 10 stood out for having collected eggs that produced an equal number of males and females (Fig. 4B). The number of positive ovitraps for each species was *Hg. leucocelaenus* ($n = 9$), *Hg. janthinomys* ($n = 6$), *Ae. albopictus* ($n = 5$), and *Ae. terreus* ($n = 6$).

Oviposition Correlation Between Vector Species

Several vector species were observed performing oviposition in the same ovitrap. Hence, the data on species frequencies were analyzed to assess correlations between the species found at the same collection site. In this way, we evaluated whether these species were positively

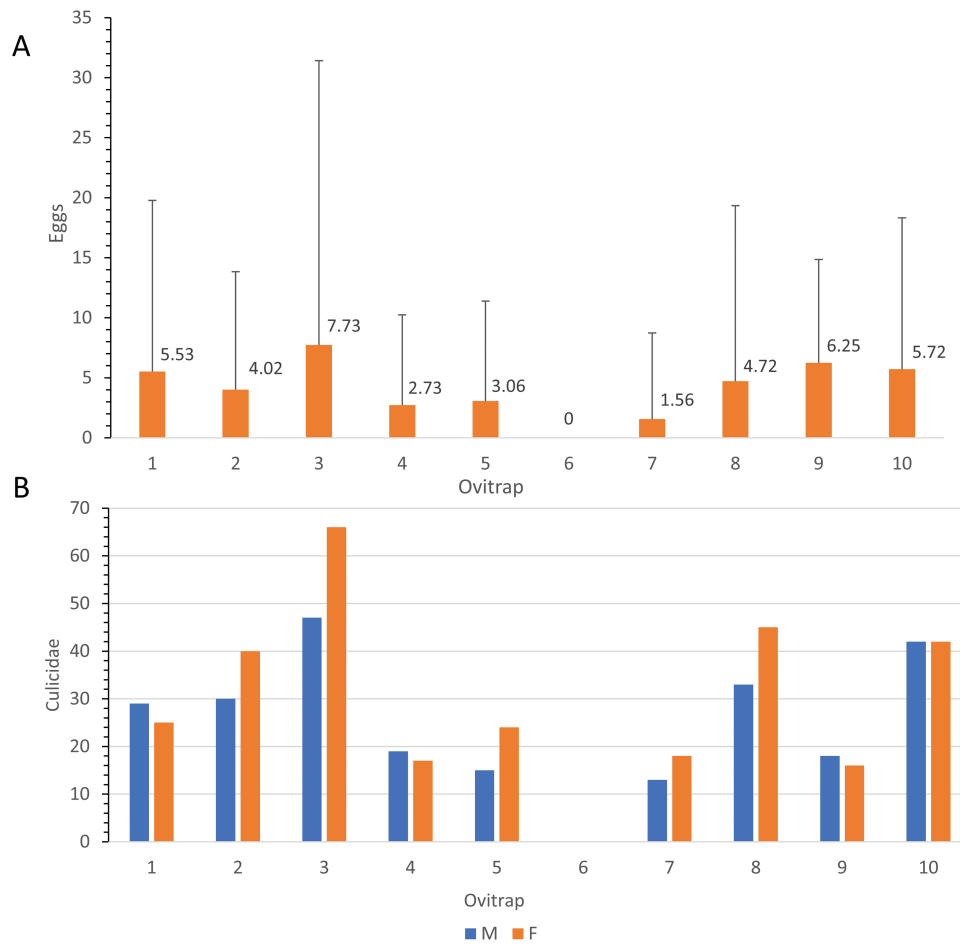


Fig. 4. Mean and standard deviation of Culicidae eggs in the ovitraps (A). Male to female ratio per ovitrap (B).

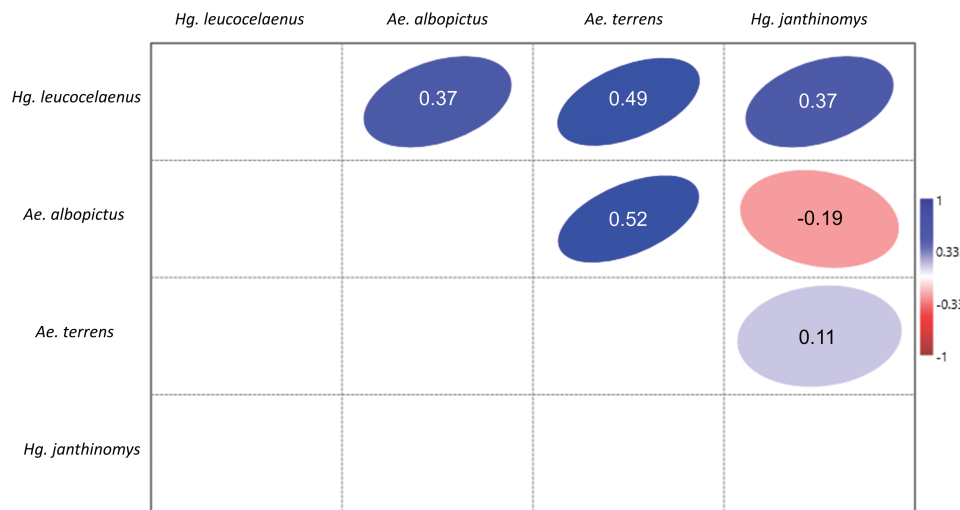


Fig. 5. Spearman correlation index between epidemiologically relevant mosquito species.

or negatively correlated. Although not statistically significant ($p \geq 0.05$), correlations between species were mostly positive. The highest Spearman correlation index was observed between *Ae. albopictus* and *Ae. terrens* ($\rho = 0.52$), with *Ae. terrens* being 8% more abundant than *Ae. albopictus*. A positive correlation was also detected between *Ae. terrens* and *Hg. leucocelaenus* ($\rho = 0.49$), and between *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* ($\rho = 0.37$) (Fig. 5).

Discussion

Mosquitoes of the genera *Haemagogus* inhabit regions of tropical forests, are most active during the hottest hours of the day, and have acrodendrophilic habits. These mosquitoes rarely leave the woods and so are exposed to the meteorological factors of the forest fragments they inhabit (Marcondes and Alencar 2010). Similarly,

several species from the genus *Aedes* are also found in preserved areas associated with forest environments and/or rural areas, such as those found in this study of *Ae. albopictus* and *Ae. terrens* (Lima-Camara et al. 2006, Silva et al. 2021). In addition, it is known that climatic variables, including rainfall, temperature, and humidity, influence Culicidae populations. Hence, these environmental factors can impact the abundance and activity of mosquito vectors, which in turn affect arbovirus transmission (Alencar et al. 2015, 2018; Silva et al. 2018).

In the present study, Culicidae egg abundance had a significantly high correlation with rainfall, a climatic variable that explained 71% of the variation in the number of eggs. Similarly, in a 2016 study by Silva et al., also in the Atlantic Forest of the Rio de Janeiro State, the rainfall variable was significantly correlated with the abundance of mosquito eggs ($p = 0.003561$) (Silva et al. 2018). Interestingly, three years later, this climatic factor continues to have a strong influence on the population of mosquito vectors inhabiting forest fragments within the most threatened Brazilian biome, the Atlantic Forest (Colombo and Joly 2010). A positive and statistically significant correlation was also observed between egg abundance and temperature. The same correlation was observed in a study conducted in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro State, for eggs of *Hg. leucocelaenus*, with an increment in the probability of finding more than half positive ovitraps when the mean temperature was higher (Couto-Lima et al. 2020). The peak in the abundance of Culicidae eggs in December 2019 coincides with the yellow fever seasonal period (from December to May) and the detection of the virus among non-human primates (NHP) (MS 2020b). Females represented 51% of the Culicidae that emerged from the eggs collected in the ovitraps, 2% higher than males, and all vector species identified had a higher number of females than males. More females in culicid populations may increase the risk of pathogen transmission since only female mosquitoes have a hematophagous behavior (Oliveira 1994).

A growing interest in studying the biology and ecology of *Hg. leucocelaenus* has developed due to its role in the sylvatic cycle of YFV and potentially other arboviruses (Cunha et al. 2019). This was the species of medical importance with the highest frequency (81%) found in our study. Similarly, the predominance of this vector was observed in 2015 in the Itatiaia National Park of Poço das Antas Biological Reserve and the Bom Retiro Private Natural Heritage Reserve, both in Rio de Janeiro State (Alencar et al. 2016). The second highest frequency observed was for *Ae. terrens*, a species that has already shown high infection and dissemination rates of Chikungunya virus (CHIKV) under experimental conditions (Lourenço-de-Oliveira and Failandou 2017). *Ae. terrens* is an arboreal species capable of breeding in tree holes and feeding on non-human primates (NHP) near the treetops and humans at ground level (Shannon 1958, Arnell 1973, Schick 1973).

Ae. terrens and *Ae. albopictus* performed oviposition in the same breeding site (ovitraps) and had a strong positive correlation ($\rho = 0.52$) with each other. This behavior shows that besides performing oviposition on a positive breeding site, these Culicidae seemingly prefer breeding sites already colonized by eggs of the same genera and/or species. This behavior was reported by Barbosa and da Silva (2002) for the species *Ae. albopictus*, showing this Culicidae prefers oviposition in sites with immatures of the same species under laboratory conditions (Barbosa and da Silva 2002). *Hg. leucocelaenus* also showed a positive correlation with a cogenetic species, *Hg. janthinomys*, ($\rho = 0.37$) and with *Ae. terrens* ($\rho = 0.49$). Coincidentally, Inacio et al. 2020 observed shared breeding sites between *Hg. spegazzinii* Brèthes 1912 and other species, such as *Ae. albopictus*, *Ae. terrens*, *Culex*

spp., and *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab, 1906). Thus, *Haemagogus* species seemingly prefer oviposition in breeding sites already colonized by either the same genera or completely different Culicidae species. This behavior could be related to the fact that these Culicidae share the ecological niche, being all sylvatic mosquitoes breeding and feeding near the treetops, and laying their eggs on wet breeding sites close to the surface of the water (Oliveira 1994).

Alarmingly, egg collection in the studied area of the main YFV vectors showed the occurrence of *Hg. leucocelaenus* and *Hg. janthinomys*, the possible CHIKV vector *Ae. terrens*, and *Ae. albopictus*, a known dengue vector in South and East Asia and a secondary DENV vector in the Americas. The presence of these vectors serves as a warning to the human population living around the area of Culicidae egg collections conducted in this study (INEA 2014, Goubert et al. 2016). Moreover, the high number of specimens of primary arbovirus vectors in some regions of Brazil makes monitoring cases of febrile diseases in their local population and communities living in the surrounding areas imperative.

Acknowledgments

We thank the association Mico-Leão-Dourado for the support in field logistics. This work was supported by the Research Support Foundation of the state of Rio de Janeiro (FAPERJ; E-26/202.658/2018; E-26/010.101076/2018; E-26/200.956/2002/2022), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; 303286/2021-0), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; 1539342).

Author Contributions

Conceptualization: Jeronimo Alencar, Cecilia Ferreira de Mello, Anthony Érico Guimarães. Formal analysis: Shayenne Olsson Freitas Silva. Methodology: Jeronimo Alencar, Cecilia Ferreira de Mello, Paulo José Leite. Supervision: Jeronimo Alencar. Writing – original draft: Shayenne Olsson Freitas Silva, Jeronimo Alencar. Writing – review & editing: Jeronimo Alencar, Anthony Érico Guimarães.

Supplementary Data

Supplementary data are available at *Journal of Medical Entomology* online.

S1 Table. Data from mosquito collections, carried out in Figueira Branca Environmental Protection Area (APA), municipality of Macaé, State of Rio de Janeiro, Brazil. (XLS)

References Cited

- de Abreu, F. V. S., I. P. Ribeiro, A. Ferreira-de-Brito, A. A. C. dos Santos, R. M. de Miranda, I. de S. Bonelly, M. S. A. S. Neves, M. I. Bersot, T. P. dos Santos, M. Q. Gomes, et al. 2019. *Haemagogus leucocelaenus* and *Haemagogus janthinomys* are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes Infect.* 8: 218–231.
- Alencar, J., C. F. De Mello, A. Guimarães, H. R. Gil-Santana, J. Dos Santos Silva, J. R. Santos-Mallet, and R. M. Gleiser. 2015. Culicidae community composition and temporal dynamics in Guapiáçu ecological reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 10: 1–16.
- Alencar, J., C. F. de Mello, L. S. Barbosa, H. R. Gil-Santana, D. de A. Maia, C. B. Marcondes, and J. D. S. Silva. 2016. Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49: 351–356.

- Alencar, J., J. B. Pacheco, J. dos Santos Silva, S. O. F. Silva, and A. Guimarães. 2018. Influence of climatic factors on *Psorophora (Janthinosoma) albigena* in Pantanal Landscape, Mato Grosso State, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 34: 177–181.
- Arnell, J. H. 1973. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* 10: 1–174.
- Barbosa, A. A., and M. A. N. da Silva. 2002. Preferência por local de oviposição de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae), em relação à presença de imaturos da própria espécie, sob condições de laboratório. *Rev. Bras. Zool.* 19: 1147–1152.
- CDC. 2018. Yellow fever. Available at: <https://www.cdc.gov/globalhealth/newsroom/topics/yellowfever/index.html#:~:text=Yellow fever virus is estimated, infected Aedes or Haemagogus mosquitos>.
- Climate-Data.org. 2022. Casimiro de Abreu: tabela climática e clima ao longo do ano. (<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/rio-de-janeiro/casimiro-de-abreu-33703/t/dezembro-12/?amp=true#climate-table-year>).
- Colombo, A. F., and C. A. Joly. 2010. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian J. Biol.* 70: 697–708.
- Consoli, R. A. G. B., and R. L. Oliveira. 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 228p.
- Correa, F. F., R. M. Gleiser, P. J. Leite, E. Fagundes, H. R. Gil-Santana, C. F. Mello, R. Gredilha, and J. Alencar. 2014. Mosquito communities in Nova Iguaçu Natural Park, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 30: 83–90.
- Couto-Lima, D., C. S. Andreazzi, P. J. Leite, M. I. L. Bersot, J. Alencar, and R. Lourenço-De-oliveira. 2020. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *haemagogus leucocelaenus* (Dyar & shannon) (diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the Atlantic forest, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 115: 1–13.
- Cunha, M. S., A. C. da Costa, N. C. C. de Azevedo Fernandes, J. M. Guerra, F. C. P. dos Santos, J. S. Nogueira, L. G. D'Agostino, S. V. Komninakis, S. S. Witkin, R. A. Ressio, et al. 2019. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Sci. Rep.* 9: 1–13.
- Forattini, O. P. 2002. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*. Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Goubert, C., G. Minard, C. Vieira, and M. Boulesteix. 2016. Population genetics of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*, an invasive vector of human diseases. *Heredity (Edinb)*. 117: 125–134.
- IBGE. 2010. IBGE lança mapa de Densidade Demográfica de 2010. (<https://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo.html?busca=1&id=1&idnoticia=2501&t=ibge-lanca-mapa-densidade-demografica-2010&view=noticia#:~:text=O mapa revela que as,consequência de um passado que>).
- INEA. 2014. *Plano de Manejo Área de Proteção Ambiental Estadual de Macaé de Cima (Módulo 1)*. Instituto Estadual do Ambiente (INEA), Rio de Janeiro.
- Keesing, F., R. D. Holt, and R. S. Ostfeld. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol. Lett.* 9: 485–498.
- Lima-Camara, T. N. D., N. A. Honório, and R. Lourenço-de-Oliveira. 2006. Freqüência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 22: 2079–2084.
- Lourenço-de-Oliveira, R., and A. B. Failloux. 2017. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: 1–11.
- Marcondes, C., and J. Alencar. 2010. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev. Biomed.* 21: 221–238.
- MS. 2020a. Boletim epidemiológico da Febre Amarela no Brasil 2019/2020. Ministério da Saúde do Bras. (<https://www.rets.epsvj.fiocruz.br/biblioteca/boletim-epidemiologico-da-febre-amarela-no-brasil-20192020>).
- MS. 2020b. Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020. *Bol. Epidemiológico.* 51: 1–19.
- Oliveira, R. A. G. B. C. e R. L. de. 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz): Ciência e tecnologia em saúde para a população brasileira*. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Reinert, J. F. 2009. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* 27: 68–76.
- Schick, R. 1973. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae). XX. The terrens group of *Aedes* (Finlaya). *Contib. Am. Entomol. Inst.* 2: 1–174.
- Shannon, R. C. 1958. Yellow fever virus in jungle mosquitoes. *Science (80-.)* 272: 317.
- Silva, S. O. F., C. Ferreira De Mello, R. Figueiró, D. De Aguiar Maia, and J. Alencar. 2018. Distribution of the mosquito communities (Diptera: Culicidae) in oviposition traps introduced into the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 18: 214–221.
- Silva, S. O. F., C. F. de Mello, R. Figueiró, T. Docile, M. Serdeiro, F. F. Fumian, and J. Alencar. 2021. Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil. *Sci. Rep.* 11: 1–7.
- Vasconcelos, P. F. C., A. F. Sperb, H. A. O. Monteiro, M. A. N. Torres, M. R. S. Sousa, H. B. Vasconcelos, L. B. L. F. Mardini, and S. G. Rodrigues. 2003. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97: 60–62.
- WHO. 2019. Yellow fever. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>).
- Zavartink, T. 1972. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXVIII. The New World species formerly placed in *Aedes* (Finlaya). *Contr. Am. Ent. Inst.* 8: 1–206.

Anexo H

Sexual proportion and egg hatching of vector mosquitos in an Atlantic Forest fragment with incidence of yellow fever in Rio de Janeiro, Brazil

Sexual proportion and egg hatching of vector mosquitos in an Atlantic Forest fragment with incidence of yellow fever in Rio de Janeiro, Brazil

Shayenne Olsson Freitas Silva^{1,2}, Cecilia Ferreira de Mello¹, Genimar Rebouças Julião^{3,4}, Rayane Dias^{1,2} and Jeronimo Alencar^{1*}

¹Diptera Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Postgraduate Program in Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Laboratory of Entomology I, Fiocruz Rondônia, Rua da Beira 7671, Lagoa, 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil

⁴National Institute of Epidemiology of the Western Amazon - INCT EpiAmO - Fiocruz Rondônia, Rua da Beira 7671, Lagoa, 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil

* Correspondence: author

E-mail: jalencar@ioc.fiocruz.br

Abstract: The present study evaluated the effect of multiple mosquito egg immersions and the sex ratio of male and female specimens from Atlantic Forest remnants in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Three sampling sites were selected in the municipality of Casimiro de Abreu: Três Montes Farm, Três Morros Natural Heritage Private Reserve, and Privately-Owned Nature Reserve Morro Grande. Fifty ovitraps were randomly installed to collect eggs from the ground level up to different heights. Monitoring was carried out monthly from August 2018 to December 2020. A total of 33,091 mosquito eggs were collected throughout the sampling period, of which 6,152 eggs were already hatched (18%), and 26,939 were unhatched; of these, about 76% subsequently hatched. The sex ratio (male:female) was variable concerning the sampling sites and the season. We found that 25% of the eggs corresponded to four epidemiologically important species, as follows: *Aedes albopictus* (n=1,277), *Ae. terrens* (n=793), *Haemagogus janthinomys* (n=89), and *Hg. leucocelaenus* (n=3,033). The number of immersions necessary for hatching the eggs in the paddles differed between mosquito species, and eggs collected in the dry season hatched both in the first immersions and the subsequent events.

Keywords: Culicidae; vectors; eggs; sex ratio; hatchability

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Life* **2022**, *12*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Studies of mosquito diversity in Atlantic Forest remnants, both in environments influenced by anthropogenic processes and in secondary growth fragments, are important to assess possible changes in behavior, distribution patterns, and activities of mosquito populations, including species previously considered exclusively sylvatic [1,2].

The main genera of mosquitoes capable of becoming infected and transmitting the sylvatic yellow fever virus (YFV) are *Haemagogus* Williston, 1896 and *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827, considered biological vectors and responsible for maintaining the natural cycle of this zoonosis in forested areas of the Americas. *Haemagogus* presents great diversity, including 28 species, nine of which have already been found in Brazil [3]. Some species from this genus have high epidemiological importance in the transmission of the sylvatic YFV [4].

The genus *Haemagogus* is restricted to the New World, and almost all species have a Neotropical distribution, except for *Haemagogus equinus* Theobald, 1903, which reaches some southern points of the Nearctic region [5]. They are essentially wild, diurnal, acrodendrophilic mosquitoes and primarily inhabit areas of dense and gallery forests [6–11].

Mosquitoes of the tribe Aedini tend to lay eggs in tree trunk cavities, bamboo, tree hollows, and coconut shells [4]. The eggs are very resistant and commonly hatch during the rainiest time of the year, although each species can show different hatching patterns to stimuli by contact with water [3].

Egg stage dormancy is a reproductive strategy for the long-term survival of multivoltine mosquitoes that develop in temporary larval habitats and water containers that are subject to water fluctuations [12].

Diapause, which is the suspension of egg development, involves a long and stable interruption of hatching, even when environmental conditions are favorable, allowing the egg to hatch even after an adverse condition. In contrast, the quiescence process is induced by unfavorable environmental conditions and ceases soon after exposure to hatching stimuli, such as flooding [13]. However, some quiescent eggs may require more than one flood event to hatch, which is known as parcel hatching [14]. The influence of the quiescence period on embryo viability has been shown to differ between taxa of the same species [15–17].

Serpa et al. (2008) studied the effects of conspecific and heterospecific larvae in the same breeding site water and their influence on oviposition of pregnant females. Such information can contribute to understanding the ecological relationships of the species and evaluating the reproductive potential of emerging females in a situation of coexistence in a given breeding site [18].

This study aimed to evaluate the effect of multiple immersion of mosquito eggs and sex ratio (male:female) from an Atlantic forest fragment in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics statement

All research was carried out in accordance with scientific license number 44333 from the Ministry of the Environment (MMA), Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio), and Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO). All members of the collection team were vaccinated against YFV and aware of the potential risks in the study areas.

2.2. Study areas

The municipality of Casimiro de Abreu is, respectively, 140 km from the city of Rio de Janeiro. The main vegetation cover in the region is characteristic of the Atlantic Forest biome, with dense submontane rainforests in moderate and advanced stages of regeneration. The region, located in the São João river basin, is in the intertropical zone (low latitudes).

Three sample sites were selected within a forest fragment, the extent of which has different degrees of preservation and legal status (two reserves and one private property), as follows: Três Montes Farm (FT), with an area of 194.0 ha (22°31'40.1"S 42°02'58.6"W); Três Morros Natural Heritage Private Reserve (TM), with an area of 508.78 ha (22°32'07.2"S 42°03'18.9"W); Privately-Owned Nature Reserve Morro Grande (MG), with an area of 192.34 ha (22°32'37.2"S 42°00'45.4"W). According to the Köppen classification system, the climate is predominantly AW, with dry winters and humid summers, an average annual temperature of 24.5° C, and average annual precipitation of 1,200 mm [19]. The sampling sites were selected in forest areas close to human transmission regions in the state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. A fragment of the Atlantic Forest remnant

from the municipality of Casimiro de Abreu was selected due to its vulnerability to arbovirus transmission (Figure 1). The region was affected by a serious outbreak of yellow fever in 2016–2018 [20].

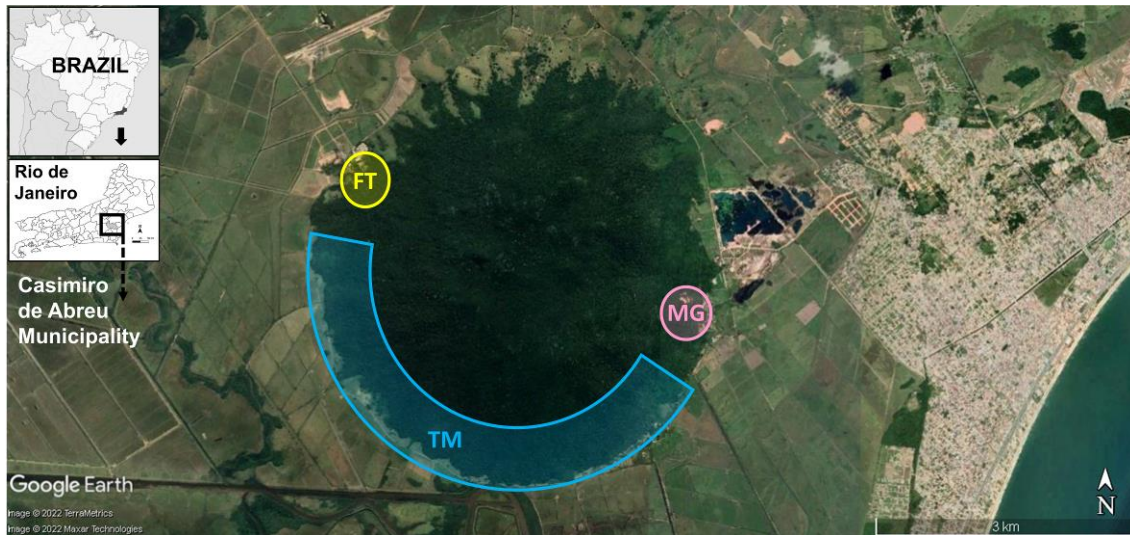


Figure 1. Location of three sampling sites – FT, MG, and TM - in an Atlantic Forest F=fragment at the municipality of Casimiro de Abreu, state of Rio de Janeiro, Brazil. Image adapted from Google Earth (accessed on August 8, 2022).

2.3. Sampling design and egg rearing

Sampling sites FT, MG, and TM were about 1km apart. In each site, 6–7 trees were randomly selected for trap installation, and the minimum and maximum distances between them were from 80 m to 120 m.

Ovitrap were used to collect the eggs, consisting of a 300 ml matte black pot without a lid and with four plywood straws (Eucatex paddles) measuring 2.5 × 14 cm, vertically stuck inside the trap by paperclips. Natural water and litter were added to the pot, aiming to reproduce an ecosystem similar to the natural one (Alencar et al. 2016, Alencar et al. 2021). The paddles inside the ovitraps were replaced monthly, identified according to the point, and transported to the Diptera Laboratory at Instituto Oswaldo Cruz.

In total, 50 ovitraps were randomly installed (FT, 15 traps; MG, 17 traps; TM, 18 traps) at different heights from ground level (0, 2, 4, 6, and 8 meters). The ropes were thrown using a fishing lead of ≈ 4 cm in diameter and hoisted by a nylon rope to install the traps in the trees. Traps were monitored, and paddles were collected monthly from August 2018 to December 2020. The positive straws were separated in the laboratory, subjected to egg counting, and immersed in transparent trays containing type I ultrapure water. Subsequently, the trays containing the paddles were placed in a controlled experimental environment in a greenhouse with temperature regulated at 28 ° ± 1 ° C, relative humidity from 75 to 90%, and a photoperiod of 12 hours. After three days, the paddles were removed from the water and allowed to dry at room temperature for another three days. The hatched larvae were kept alive according to the protocol of Alencar et al. (2008), aiming at identification at the species level when reaching adulthood. The eggs in the paddles were subjected to repeated immersion and drying cycles until all had hatched.

The species were identified by direct observation of the morphological characters evident under an optical microscope (Leica DMD108®) e consulta às pessoas/diagnóstico às espécies, using dichotomous keys by Arnell 1973, Forattini 2002, and Marcondes & Alencar 2010. The abbreviations of generic and sub-generic names follow Reinert 2009. After the species identification, all specimens were deposited into the Entomological Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, under the title “Atlantic Forest Mosquito Collection, Rio de Janeiro.”

2.4. Statistical analysis

Generalized linear mixed models (GLMM) were used to compare the mosquito sex ratios (male:female) between seasons (rainy and dry) and forest sites (FT, MG, and TM) as fixed factors. “Month” (for each season) and “tree” (for each site) were set as random effects in the models, and probable temporal and spatial autocorrelations in the outcomes were considered. Models were fitted to a binomial error distribution (see Crawley 2005) using the package *glmmTMB* due to its flexibility to deal with over and underdispersed data and excess of zero scores [23].

Model adequacy was verified utilizing residual diagnostics (distribution, dispersion, and outliers); when necessary, model residuals were checked for temporal autocorrelation using the Durbin-Watson (DW) test and ACF plot inspection (*DHARMa* package 0.4.5). The coefficient estimation outputs were automatically back-transformed (exponential) and tabulated using *sjPlot* 2.8.4 and *sjmisc* 2.8.5. (Supplementary File 1). All graphs and analyses were performed in the R Platform version 3.6.0 [24].

3. Results

A total of 33,091 eggs were counted in the paddles of ovitraps installed in the three sites of the Atlantic Forest remnant, of which about 18% were already hatched (6,152 eggs), and 26,939 were intact and not hatched. The paddles were subjected to immersion events for egg hatching, larvae were reared until the emergence of adults. Of the total number of non-hatched eggs, 20,461 larvae were obtained, representing a hatching rate of about 76%. However, the proportion of medically important adults from the collected eggs was 25% (n = 5,192), for which four species of epidemiological importance were identified: *Aedes albopictus* (n = 1,277), *Ae. terrens* (n = 793), *Haemagogus janthinomys* (n = 89) and *Hg. leucocelaenus* (n = 3,033).

3.1. Sexual proportion x site and season

Considering the total number of adults that emerged in the laboratory (n = 5,192), the number of females (50.3%) and males (49.7%) was similar, regardless of the collection site, sampling month, and species. However, the sex ratio (male:female) varied greatly depending on the sampling sites and seasons, without, however, depicting a clear pattern for the species (Figure 2).

The GLMM estimates found no difference in the variation of the average sex ratio as a function of these predictors for most species. However, this ratio significantly differed between FT and TM sites for *Hg. leucocelenus* (estimate, 1.40; CI, 1.07 – 1.84). As for random effects, the sample design based on a continuous time series contributed a small part of the variability in the average sex ratio recorded for *Ae. albopictus* (τ_{00} Season: Month = 0.25) and *Hg. leucocelaenus* (τ_{00} Season: Month = 0.21); however, there was no temporal dependence effect on the variability of these species (*Ae. albopictus*: DW test = 2.4717, p-value = 0.2259; *Hg. leucocelaenus*: DW = 2.1949, p-value = 0.621, Supplementary File 1).

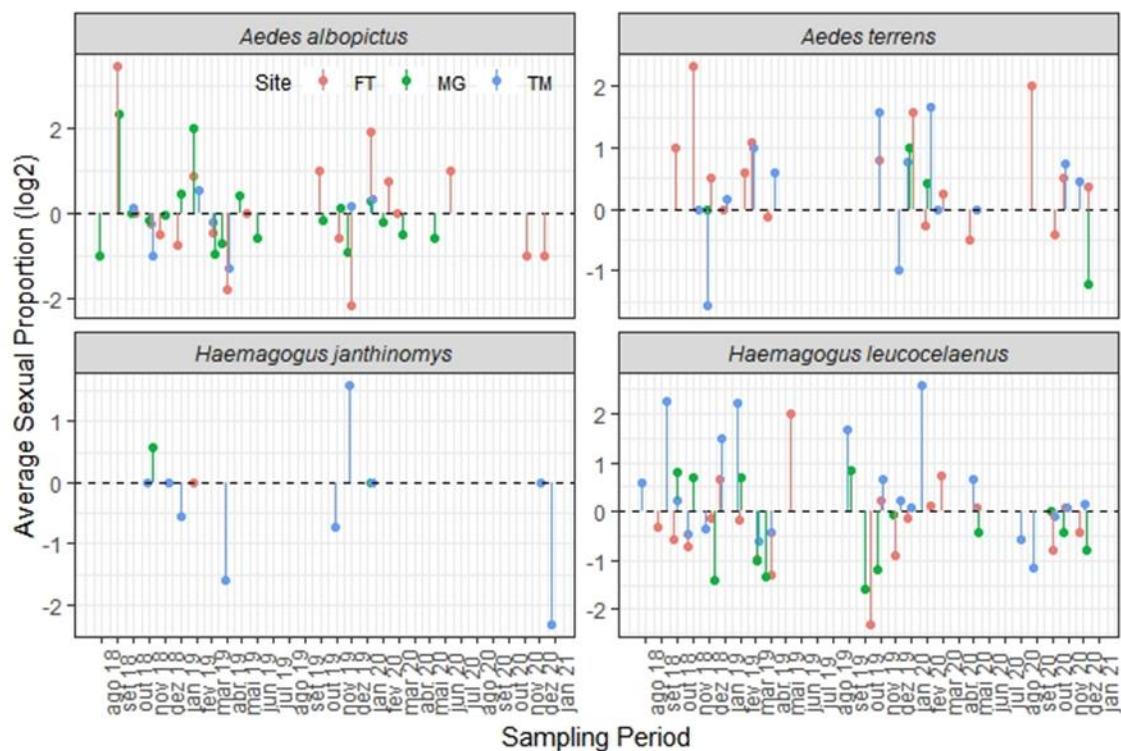


Figure 2. Sexual proportion of medically important mosquito species from August/2018 to January/2021 in three sampling sites at an Atlantic Forest fragment in Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro, Brazil. Values were logarithmic-transformed (\log_2) for visual purposes only. Black dashed line represents the male:female proportion equal to 1.

Table 1. Male and female mosquitoes and sex ratio per mosquito species, season, and site sampled by ovitraps installed at an Atlantic Forest remnant, Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro, Brazil.

Species	N	Site			Season	
		FT	MG	TM	Dry	Rainy
<i>Aedes albopictus</i>	Female	260	325	91	130	546
	Male	259	253	89	126	475
	Sex ratio	1.00	0.78	0.98	0.97	0.87
<i>Aedes terrens</i>	Female	185	16	133	46	288
	Male	229	19	211	52	407
	Sex ratio	1.24	1.19	1.59	1.13	1.41
<i>Haemagogus janthinomys</i>	Female	5	3	43	6	45
	Male	3	5	30	2	36
	Sex ratio	0.60	1.67	0.70	0.33	0.80
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	Female	589	233	728	309	1241
	Male	479	212	792	273	1210
	Sex ratio	0.81	0.91	1.09*	0.88	0.98

Sex ratio: male:female proportion considering the sum of individuals per site or season. *Statistically significant difference from the basal level of the “Site” predictor, the FT site (see Supplementary File 1). In general, the proportion of males and females did not differ between sites and seasons for all mosquito species.

3.2. Egg immersion event x mosquito species x sex

The number of immersions required for hatching eggs adhered to the paddles differed between mosquito species. For *Ae. albopictus*, the first immersion event was the one that resulted in the most successful hatching of eggs, larval development, and reaching

the adult stage; the 6th, 7th, and 8th events produced negligible amounts of mosquitoes. In turn, most of the eggs of typically wild species were in diapause or quiescence and needed more than one sequential immersion event for their outbreak. Apparently, eggs collected during the dry season broke out both in the first immersions and subsequent events (Figure 3).

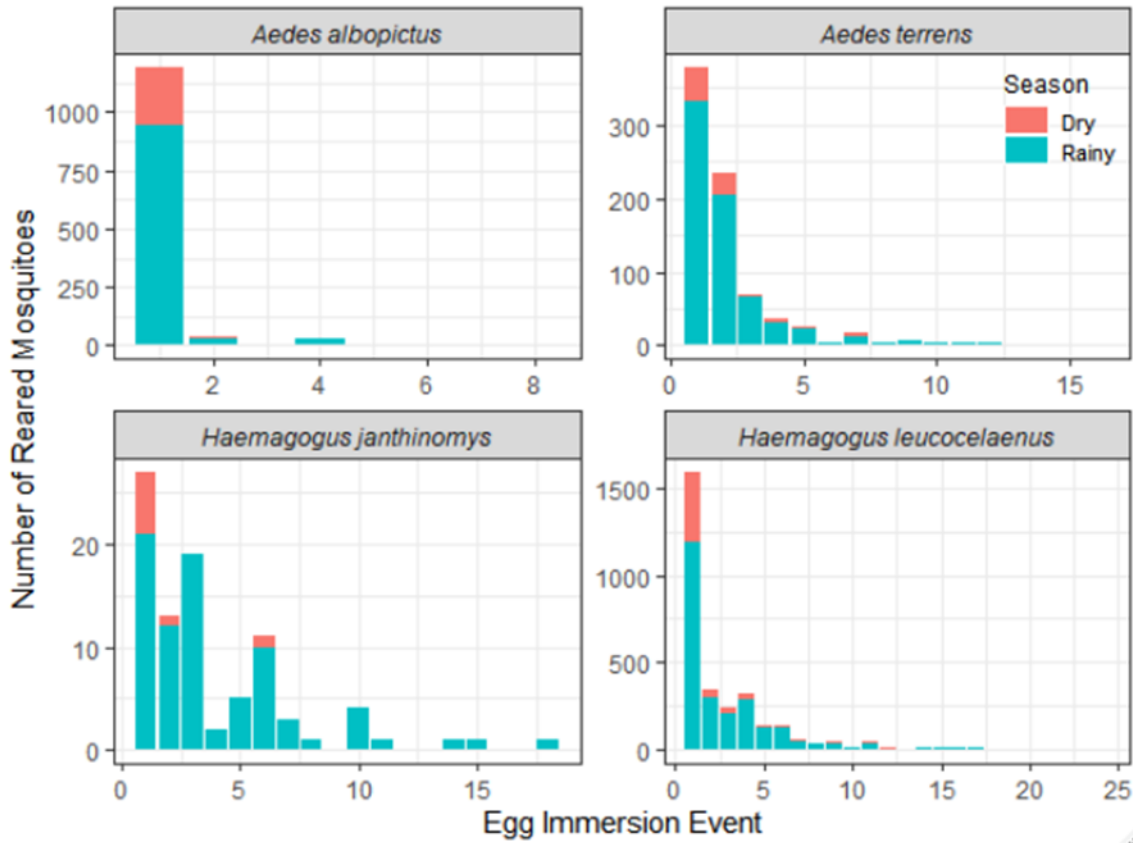


Figure 3. Abundance of adult vector mosquitoes per egg immersion event during the dry (red) and rainy (blue) seasons in Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro, Brazil.

187
188
189
190
191

192
193
194

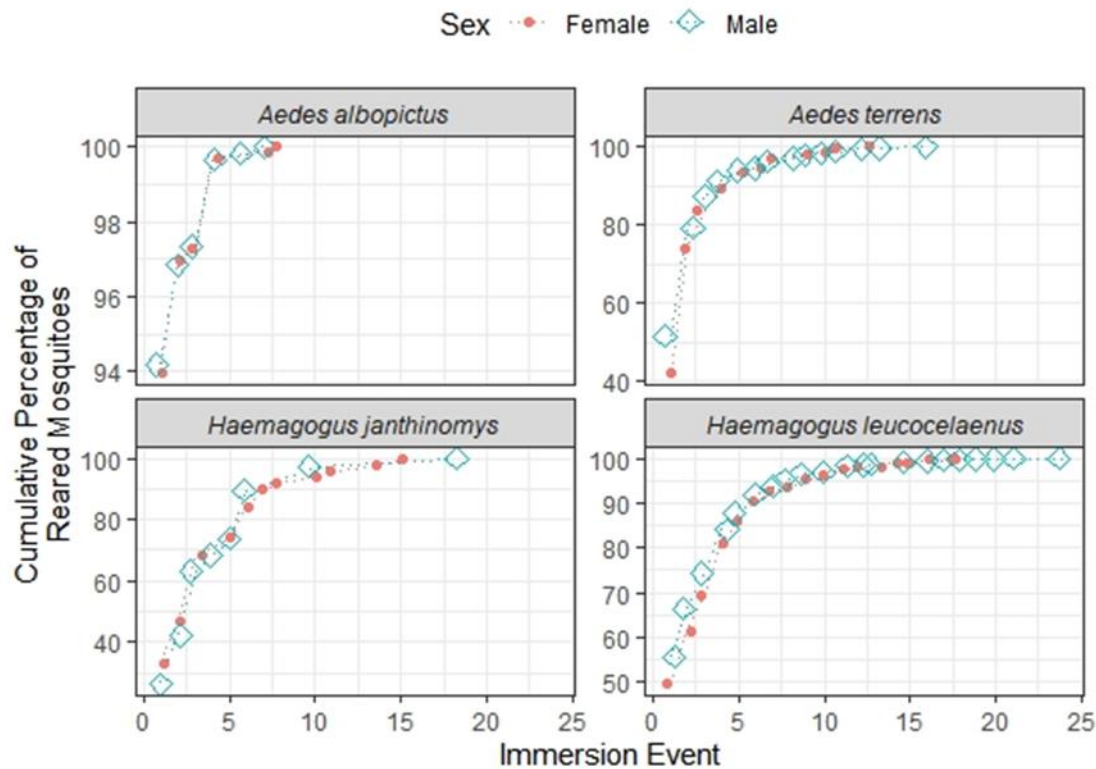


Figure 4. Cumulative percentages of the number of eggs hatched by sex throughout the immersion events for the mosquito species *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. terrens*, and *Ae. albopictus*.

Regarding the comparison between male and female mosquito hatching along the immersion events, two general tendencies were observed: (1) male mosquitoes of typically sylvatic species (and less prone to adaptation) usually took longer to emerge, and (2) and they required more immersion events, which was more evident for males of *Hg. leucocelaenus* and *Ae. terrens* (Figure 4).

3.3. Co-occurrence of mosquito species

Paddles were negative for 884 of the total number of installed ovitraps. Of the 448 positive paddles for Aedini eggs, 70% gave rise to adult mosquitoes of the same species (313 paddles). Considering the events of species co-occurrence in the same trap (Figure 5A), the most frequently observed combination was the co-occurrence of *Ae. terrens* and *Hg. leucocelaenus* ($n=57$), followed by *Ae. albopictus* and *Hg. leucocelaenus* ($n=32$), *Ae. albopictus*, *Ae. terrens*, and *Hg. leucocelaenus* ($n=12$), and *Hg. janthinomys* and *Hg. leucocelaenus* ($n=10$). However, the frequency of these interactions differed between seasons, as did the number of positive paddles and egg density per season. In the rainy season, 349 paddles had successful egg hatching (Figure 5B) compared to only 99 in the dry season (Figure 5C). Contrary to expectations, co-occurrence events were less frequent in the dry season. We firstly supposed there would be less availability of natural breeding sites in the dry season, and thus the competition for breeding sites would be greater compared to the rainy season. On the other hand, in the dry period, populations of wild mosquitoes occurred at low densities, and the record of co-occurrence depended on greater sampling effort during this period.

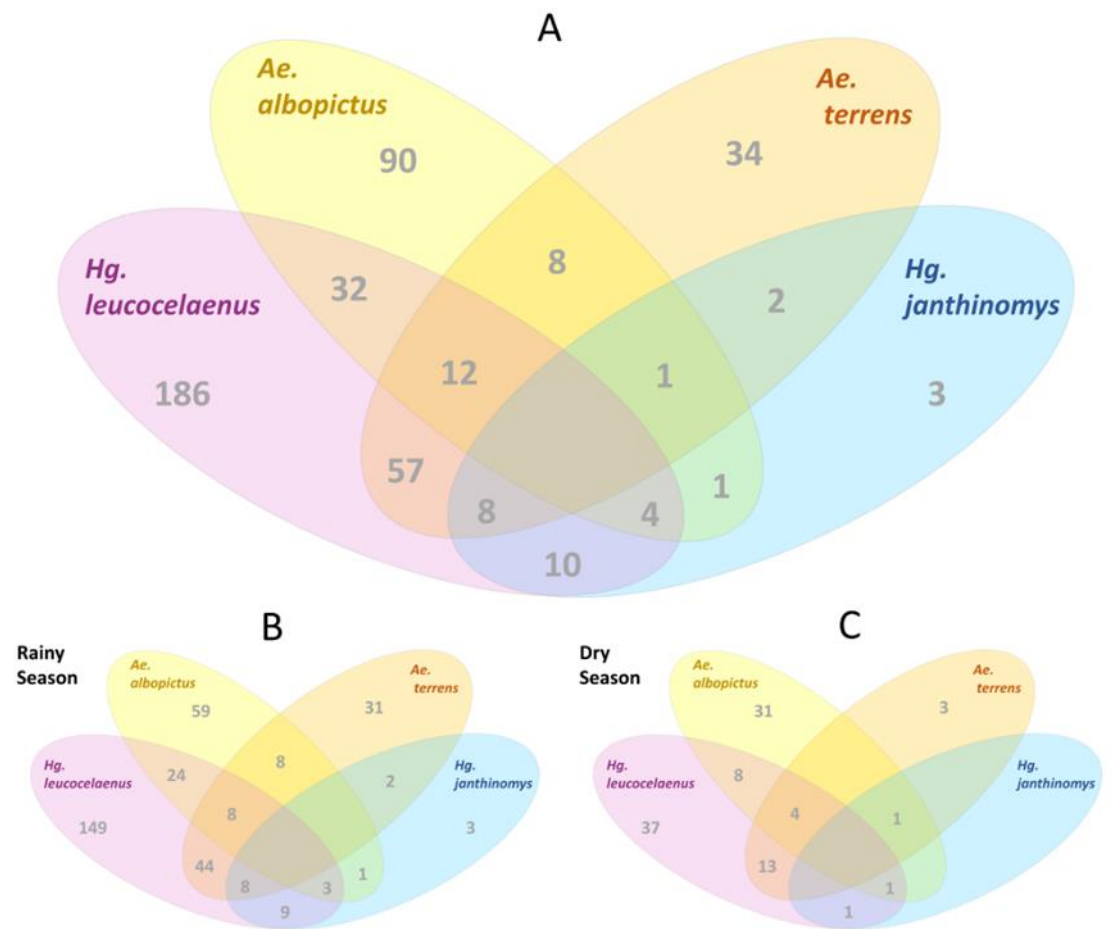


Figure 5. Co-occurrence of mosquito species in ovitraps placed in an Atlantic Forest fragment (A) during rainy (B) and dry seasons (C) in Casimiro de Abreu, Rio de Janeiro, Brazil.

4. Discussion

Studies on the distribution patterns and activities of mosquito populations in remnants of the Atlantic Forest have paramount importance and are influenced by anthropogenic activities and preserved fragments of secondary growth. Events such as fragmentation of forest areas, rapid expansion of urban settings, poor sanitary conditions aligned with climate change, and the pollution of natural environments directly influence the proliferation and spread of mosquito vectors and arbovirus transmission [25,26]. Vector mosquitoes from the genera *Aedes* and *Haemagogus* are commonly found in Atlantic Forest fragments and have been described in a variety of natural parks and environmental protection areas in the state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil [27–29].

Mosquito sex-ratio studies have led to some interesting findings; in 1966, Hickey and Craig mentioned that the male parent determines the sex ratio in the progeny and, given normal segregation, equal numbers of males and females should occur [30]. We found that the number of females (50.3%) and males (49.7%) was similar, considering the total number of adults reared in the laboratory (n=5,192). Lounibos and Escher (2008) observed that *Ae. albopictus* from Florida, USA, showed a significant bias in the number of male specimens [31]. Their results are in line with the ones of the present study, as we found greater amplitudes of variation for *Ae. albopictus*, with the sex ratio also biased toward males. This finding was also observed by Unlu et al. (2014) in North America, who noted that a male-skewed sex ratio could indicate a recent emergence and the possible proximity

of other breeding sites. *Haemagogus leucocelaenus* also had higher males when compared to females [32].

A bias in the number of male specimens was also observed for *Hg. leucocelaenus*; however, no evidence was found in the literature to support or refute this observation, emphasizing the importance of further studies with this approach in the field of medical entomology. In our study, this difference in sex ratio was observed in mosquito eggs collected from forest fragments, therefore, from mosquitoes naturally occurring in these forest fragments. A male-skewed ratio may be a positive event since male-biased reproductive sex ratios have previously been suggested as an attractive method to suppress or eliminate pest populations, obviously on a much larger scale [33].

Most of the eggs from sylvatic mosquito species were in diapause and required more than one sequential immersion event for their hatching. This is very commonly observed in *Haemagogus* species [34,35]. Considering the absolute values of eggs hatched, *Hg. leucocelaenus* eggs hatched until the 21st immersion. A similar result was observed by Silva et al. (2018), where eggs from this species showed installment hatching up to the 37th immersion. Besides, hatching rates for this species were 1.5 times higher in the rainy season than in the dry season [21].

Mosquito species from the studied forest remnant diverged in the number of immersions required for egg hatching. For *Ae. albopictus*, the first immersion event resulted in the most successful egg hatching. These results agree with other studies that also show that eggs from this species tend to hatch on first immersion regardless of season [34,35]. More immersion events might be required for hatching eggs sampled closer to the dry winter season as part of a strategy to ensure egg viability and further larval development [34].

A higher number of collected and hatched eggs from *Hg. leucocelaenus* has also been observed in other fragments of the Atlantic Forest, in which eggs were continuously collected throughout the study and also the most frequently captured species [36–38]. It is important to note that the collection methodology used in this study and the location where the mosquitoes were captured will invariably select species with wild habits, and that lay their eggs on the water surface.

Typically wild species are less prone to adaptation and require more immersion events; this was more evident for males, while the proportion of males and females varied greatly according to sampling sites and seasons, but without a clear pattern for the species. Contrary to expectations, events of co-occurrence of mosquito species were less frequent in the dry season.

Ecological relationships between *Hg. leucocelaenus*, *Hg. janthinomys*, *Ae. terreus*, and *Ae. albopictus* have been previously described. Forest vertical stratification, meteorological and seasonal effects, and coexistence have been extensively explored for these vector species [10,21,27,28]. *Haemagogus leucocelaenus* and *Hg. janthinomys* showed a strong correlation in the number of overlapping eggs for the same breeding sites and the same paddles [29]. Species of other genera, such as *Limatus*, *Culex*, *Wyeomyia*, and *Toxorhynchites*, oviposit in forest water ovitraps, and their coexistence deserves further investigation [11].

5. Conclusions

The constant change in the epidemiology of zoonotic viruses can be attributed to spreading of the virus to new areas, which happens through hosts and vectors [41]. Studies on vector mosquitoes oviposition in forest habitats are rare, especially those that assess the coexistence of sylvatic mosquito species, their breeding sites, habitat preferences, oviposition behavior and site selection, density-dependent competition. The present study increases the available information on the sex ratio of epidemiologically relevant mosquito species from the genera *Haemagogus* and *Aedes* in nature, along with co-occurrence of important vector species from these genera, such as the Yellow Fever virus vector *Hg. leucocelaenus*, and *Ae. albopictus* a secondary vector Dengue, Zika and Yellow Fever viruses [3,22,42]. Considering these viruses are endemic to Brazil and are a burden on the

human population, studies like this help shed some light on how these vectors are behaving in nature and can be used by mosquito surveillance programs, such as the “Plano de Contingência para Enfrentamento às Arboviroses” (Contingency Plan to Combat Arboviruses) [43].

Acknowledgments: We thank the association Mico-Leão-Dourado for the support in field logistics.

Financial Support: (JA - Jeronimo Alencar) was supported by the Research Support Foundation of the state of Rio de Janeiro (FAPERJ; grant number E-26/202.658/2018; E-26/010.101076/2018; E-26/200.956/2002/2022), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant number 303286/2021-0), (GRJ - Genimar Rebouças Julião) was funded by the MCTI/CNPq/CAPES/FAPERO - INCT EpiAmO-grant#465657/2014-1) and Fiocruz Rondônia Research Excellence Program – PROEP (VPGDI-008-FIO-21-2-21).

Author Contributions: Conceptualization: Shayenne Olsson Freitas Silva, Genimar Rebouças Julião, Jeronimo Alencar. Formal analysis: Shayenne Olsson Freitas Silva, Genimar Rebouças Julião. Methodology: Cecilia Ferreira de Mello, Rayane Dias, Jeronimo Alencar. Supervision: Jeronimo Alencar, Cecilia Ferreira de Mello. Writing – original draft: Shayenne Olsson Freitas Silva, Genimar Rebouças Julião, Cecilia Ferreira de Mello, Rayane Dias, Jeronimo Alencar. Writing – review & editing: Shayenne Olsson Freitas Silva, Genimar Rebouças Julião, Jeronimo Alencar.

References

- Alencar, J.; Ferreira, Z.M.; Lopes, C.M.E.; Serra-Freire, N.M.; Mello, R.P. De; Silva, J.D.S.; Guimarães, A.É. Biodiversity and times of activity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the biome of the atlantic forest in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Entomol.* **2011**, *48*, 223–231, doi:10.1603/ME09214.
- Alencar, J.; De Mello, C.F.; Guimarães, A.É.; Gil-Santana, H.R.; Dos Santos Silva, J.; Santos-Mallet, J.R.; Gleiser, R.M. Culicidae community composition and temporal dynamics in Guapiáçu ecological reserve, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0122268.
- Marcondes, C.; Alencar, J. Revisão de mosquitos *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. *Rev. Biomed.* **2010**, *21*, 221–238.
- Arnell, J.H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **1973**, *10*, 1–174.
- Forattini, O.P. *Entomologia médica. Culicini: Culex, Aedes e Psorophora | Mosquito Taxonomic Inventory*; São Paulo, 1965;
- Pinheiro, F.P.; Travassos Da Rosa, A.P.A.; Moraes, M.A.P.; Almeida Neto, J.C.; Camargo, S.; Filgueiras, J.P. An epidemic of yellow fever in Central Brazil, 1972–1973. I. Epidemiological studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1978**, *27*, 125–132, doi:10.4269/ajtmh.1978.27.125.
- Dégallier, N.; Rosa, A.T. da; Hervé, J.-P.; Vasconcelos, P.F.; Rodrigues, S.; Dias, L. A comparative study of yellow fever in Africa and South America. *Ciênc. cult. (São Paulo)* **1992**, *44*, 143–51.
- Culicidae, B.D.; Alencar, J.; Castro, F.C.; Monteiro, H.A.O.; Orlando, V.; Dégallier, N.; Marcondes, C.B.; Guimarães, A.E. New records of *Haemagogus* (*Haemagogus*) from Northern and Northeastern Brazil (Diptera: Culicidae, Aedini). **2008**, *68*, 65–68.
- Aragão, N.C.; Müller, G.A.; Balbino, V.Q.; Costa Junior, C.R.L.; Figueirêdo Júnior, C.S.; Alencar, J.; Marcondes, C.B. A list of mosquito species of the Brazilian State of Pernambuco, including the first report of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), yellow fever vector and 14 other species (Diptera: Culicidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2010**, *43*, 458–459, doi:10.1590/s0037-86822010000400024.
- Alencar, J.; Morone, F.; De Mello, C.F.; Dégallier, N.; Lucio, P.S.; Da Serra-Freire, N.M.; Guimarães, A.É. Flight Height Preference for Oviposition of Mosquito (Diptera: Culicidae) Vectors of Sylvatic Yellow Fever Virus Near the Hydroelectric Reservoir of Simplício, Minas Gerais, Brazil. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 791–795, doi:10.1603/ME12120.
- Alencar, J.; Mello, C.F. de; Barbosa, L.S.; Gil-Santana, H.R.; Maia, D. de A.; Marcondes, C.B.; Silva, J. dos S. Diversity of yellow fever mosquito vectors in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2016**, *49*, 351–356, doi:10.1590/0037-8682-0438-2015.
- Vinogradova, E.B. Diapause in Aquatic Insects, with Emphasis on Mosquitoes. In *Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2007; pp. 83–113.
- Durden, M. & *Medical and Veterinary Entomology*; 2009;
- Gillet, J.D. *Variation in the hatching-response of aedes eggs (diptera: Culicidae)*; Cambridge University Press, 1955;
- Diniz, D.F.A.; de Albuquerque, C.M.R.; Oliva, L.O.; de Melo-Santos, M.A.V.; Ayres, C.F.J. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 310, doi:10.1186/s13071-017-2235-0.
- Farnesi, L.C.; Menna-Barreto, R.F.S.; Martins, A.J.; Valle, D.; Rezende, G.L. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J. Insect Physiol.* **2015**, *83*, 43–52, doi:10.1016/j.jinsphys.2015.10.006.
- Faull, K.J.; Williams, C.R. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. *J. Vector Ecol.* **2015**, *40*, 292–300, doi:10.1111/jvec.12167.
- Serpa, L.L.N.; Monteiro, S.D.C.B.; Voltolini, J.C. Efeito da água de criação larval na oviposição de *Aedes aegypti* em laboratório. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41*, 515–517, doi:10.1590/S0037-86822008000500017.
- INPE Dados Meteorológicos Available online: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inmet?r=estacoes/estacoesAutomaticas> (accessed on Jan 19, 2021).
- Dietz, J.M.; Hankerson, S.J.; Alexandre, B.R.; Henry, M.D.; Martins, A.F.; Ferraz, L.P.; Ruiz-Miranda, C.R. Yellow fever in Brazil threatens successful recovery of endangered golden lion tamarins. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12926, doi:10.1038/s41598-019-49199-6.

21. Alencar, J.; de Mello, C.F.; Rodríguez-Planes, L.; dos Santos Silva, J.; Gil-Santana, H.R.; Bastos, A.Q.; Albuquerque, H.G.; Rodrigues, W.C.; Guimarães, A.É. Ecosystem diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a remnant of Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, Brazil. *Austral Entomol.* **2021**, *60*, 244–256, doi:10.1111/aen.12508. 357
358
22. Crawley, M.J. *Statistics*; Wiley, 2005; ISBN 9780470022979. 359
360
23. Brooks, Mollie, E.; Kristensen, K.; Benthem, Koen, J., V.; Magnusson, A.; Berg, Casper, W.; Nielsen, A.; Skaug, Hans, J.; Mächler, M.; Bolker, Benjamin, M. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *R J.* **2017**, *9*, 378, doi:10.32614/RJ-2017-066. 361
362
363
24. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2019. 364
25. Alho, C.J.R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. *Estud. Avançados* **2012**, *26*, 151–166, doi:10.1590/S0103-40142012000100011. 365
366
26. Docile, T.N.; Figueiró, R.; Portela, C.; Nessimian, J.L. Macroinvertebrate diversity loss in urban streams from tropical forests. *Environ. Monit. Assess.* **2016**, *188*, doi:10.1007/s10661-016-5237-z. 367
368
27. Silva, S.O.F.; de Mello, C.F.; Figueiró, R.; Docile, T.; Serdeiro, M.; Fumian, F.F.; Alencar, J. Oviposition behavior of wild yellow fever vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic Forest fragment, Rio de Janeiro state, Brazil. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–7, doi:10.1038/s41598-021-85752-y. 369
370
371
28. Alencar, J.; Ferreira de Mello, C.; Silva, S.O.F.; Guimarães, A.É.; Müller, G.A. Effects of seasonality on the oviposition activity of potential vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the São João River Basin Environmental Protection Area of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Eur. Zool. J.* **2022**, *89*, 1018–1025, doi:10.1080/24750263.2022.2108513. 372
373
374
29. Freitas Silva, S.; de Mello, C.; Machado, S.; Leite, P.; Alencar, J. Interaction of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) and Other Mosquito Vectors in a Forested Area, Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 94, doi:10.3390/tropicalmed7060094. 375
376
30. Hickey, W.A.; Craig, G.B. Genetic Distortion Of Sex Ratio in A Mosquito, *Aedes Aegypti*. *Genetics* **1966**, *53*, 1177–1196, doi:10.1093/genetics/53.6.1177. 377
378
31. Lounibos, L.P.; Escher, R.L. Sex Ratios of Mosquitoes from Long-Term Censuses of Florida Tree Holes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2008**, *24*, 11–15, doi:10.2987/5656.1. 379
380
32. Unlu, I.; Farajollahi, A.; Rochlin, I.; Crepeau, T.N.; Strickman, D.; Gaugler, R. Differences in male-female ratios of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) following ultra-low volume adulticide applications. *Acta Trop.* **2014**, *137*, 201–205, doi:10.1016/j.actatropica.2014.05.009. 381
382
383
33. Galizi, R.; Doyle, L.A.; Menichelli, M.; Bernardini, F.; Deredec, A.; Burt, A.; Stoddard, B.L.; Windbichler, N.; Crisanti, A. A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3977, doi:10.1038/ncomms4977. 384
385
34. Alencar, J.; Gleiser, R.M.; Morone, F.; de Mello, C.F.; dos Silva, J.S.; Serra-Freire, N.M.; Guimarães, A.É. A comparative study of the effect of multiple immersions on Aedini (Diptera: Culicidae) mosquito eggs with emphasis on sylvan vectors of yellow fever virus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2014**, *109*, 114–117, doi:10.1590/0074-0276130168. 386
387
388
35. Silva, S.O.F.; de Mello, C.F.; Gleiser, R.M.; Oliveira, A.A.; Maia, D. de A.; Alencar, J. Evaluation of Multiple Immersion Effects on Eggs From *Haemagogus leucocelaenus*, *Haemagogus janthinomys*, and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Under Experimental Conditions. *J. Med. Entomol.* **2018**, *55*, 1093–1097, doi:10.1093/jme/tjy080. 389
390
391
36. Alencar, J.; Marcondes, C.B.; Serra-Freire, N.M.; Lorosa, E.S.; Pacheco, J.B.; Guimarães, A.É. Feeding patterns of *Haemagogus capricornii* and *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in two Brazilian states (Rio de Janeiro and Goiás). *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 873–876, doi:10.1603/0022-2585(2008)45[873:FPOHCA]2.0.CO;2. 392
393
394
37. Alencar, J.; De Mello, C.F.; Serra-Freire, N.M.; Guimarães, A.É.; Gil-Santana, H.R.; Gleiser, R.M. Biodiversity and temporal distribution of immature culicidae in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro State. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0159240. 395
396
38. Couto-Lima, D.; Andreazzi, C.S.; Leite, P.J.; Bersot, M.I.L.; Alencar, J.; Lourenço-De-oliveira, R. Seasonal population dynamics of the primary yellow fever vector *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & shannon) (diptera: Culicidae) is mainly influenced by temperature in the atlantic forest, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2020**, *115*, 1–13, doi:10.1590/0074-02760200218. 397
398
399
400
401