

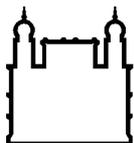
MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DOS SOROTIPOS 1 E 4 DO VÍRUS
DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* POR MEIO DA
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)

MANUELLA DE MELLO BARBOSA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MANUELLA DE MELLO BARBOSA

Diagnóstico diferencial dos sorotipos 1 e 4 do vírus dengue em mosquitos *Aedes aegypti* por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientador(es): Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

Prof^a. Dr^a. Gabriela de Azambuja Garcia

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2022

Barbosa, Manuella de Mello.

Diagnóstico diferencial dos sorotipos 1 e 4 do vírus dengue em mosquitos *Aedes aegypti* por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) / Manuella de Mello Barbosa. - Rio de Janeiro, 2022.

130 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

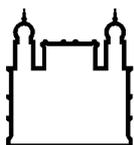
Orientador: Rafael Maciel de Freitas.

Co-orientadora: Gabriela de Azambuja Garcia.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Aedes aegypti*. 2. Arbovírus. 3. Dengue. 4. Sorotipo. 5. Espectroscopia NIR. 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 Biologia Parasitária

MANUELLA DE MELLO BARBOSA

Diagnóstico diferencial dos sorotipos 1 e 4 do vírus dengue em mosquitos *Aedes aegypti* por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)

ORIENTADOR(ES): Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

Prof^a. Dr^a. Gabriela de Azambuja Garcia

Aprovada em: 15/12/2022

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Clélia Christina Mello da Silva Almeida da Costa (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz)

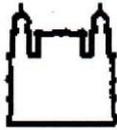
Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Bahia Nascimento (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN)

Prof. Dr. Carluccio Rocha dos Santos (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Luana Cristina Farnesi Ferreira (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz)

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2022.

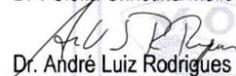


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Manuella de Mello Barbosa**, sob orientação do Dr. Rafael Maciel de Freitas e coorientada pela Dr^a. Gabriela de Azambuja Garcia. Ao décimo quinto dia do mês de dezembro de dois mil e vinte e dois, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **"Diagnóstico diferencial dos sorotipos 1 e 4 do vírus dengue em mosquitos *Aedes aegypti* por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Ecologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Ana Cristina Bahia Nascimento – UFRJ/RJ, Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo – UFRN/RN, e como suplentes: Dr^a. Luana Cristina Farnesi Ferreira - IOC/FIOCRUZ e Dr. Carlucio Rocha dos Santos - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa, Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2022.


Dr^a. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa (Presidente da Banca)


Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):

Com saudade e amor, dedico esta
dissertação à minha tia, Regina de
Fátima Barbosa de Rezende.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à pessoa a quem dedico este trabalho, minha tia, Regina de Fátima Barbosa de Rezende, vítima da COVID-19 em 2021. Sei que grande parte da minha força de vontade para concluir esta etapa da minha vida veio da senhora. Obrigada por tudo! Sei que estaria orgulhosa de mim. Amo você para sempre.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro no período de 2 anos e também à Fiocruz (VDEIC) por fornecer a prorrogação da bolsa, pelo período de mais 6 meses. Sem esse auxílio financeiro nada disso seria possível.

Agradeço à Pós-Graduação da Biologia Parasitária por toda ajuda e suporte, principalmente por possibilitarem a prorrogação da minha defesa, sendo compreensíveis com os problemas que enfrentei que acabaram por afetar os prazos do Mestrado. Em especial agradeço ao coordenador André Luiz Rodrigues Roque e à secretária Rita Gomes.

Agradeço a todos que fazem parte do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (Lathema)/IOC, jamais chegaria até aqui sem a ajuda de vocês. Admiro demais cada um e desejo sucesso em seus caminhos. Em especial gostaria de agradecer ao Alexandre, Anielly, Dinair, Gilliard, Ignez, Jéssica, Marcelo Celestino, Marcelo Quintela, Márcio, Martha, Mauro, Maycon e Milan. Vocês foram essenciais nesse trabalho.

Agradeço aos laboratórios parceiros: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Laficave)/IOC, pelo fornecimento de equipamentos necessários para o desenvolvimento do meu trabalho e por toda parceria de sempre; Laboratório de Flavivírus (Labfla)/IOC, pela doação das cepas do vírus dengue, pelo fornecimento dos reagentes necessários para a RT-qPCR, e também pela ajuda nesta técnica. Em especial agradeço demais a Doutora Ana Bispo, chefe do laboratório e às meninas Angélica, Carolina e Cinthia; Laboratório de Bioquímica de Insetos e Parasitos (Labip)/UFRJ, também pela doação de cepas do vírus dengue. Em especial à Doutora Ana Cristina Bahia pela parceria e à Leila pela ajuda nas informações.

Agradeço aos colaboradores da Universidade de Queensland (Austrália): Doutora Maggy Sikulu-Lord, Brendon Goh e Tharanga Kanka, pesquisadores fundamentais para a conclusão do meu trabalho com NIR. Muito obrigada por toda colaboração e parceria, pelas

análises dos meus dados e pela prontidão em esclarecer minhas dúvidas. Muita admiração por todos vocês.

Agradeço aos meus orientadores, Doutora Gabriela e Doutor Rafael. Dois pesquisadores que têm toda a minha admiração. Vocês são exemplos na área de vocês, não só para mim, mas para muitas outras pessoas. Muito obrigada por toda ajuda, puxão de orelha, conselhos, reuniões, experimentos... Espero continuar crescendo profissionalmente e, independente da área em que eu esteja, levarei comigo o exemplo de profissionais que vocês são, dedicados e apaixonados pelo que fazem.

Agradeço aos meus amigos, por todos os momentos de descontração que foram fundamentais para eu pudesse levar este Mestrado de forma mais leve e por ouvirem meus desabafos, que foram muitos. Em especial agradeço à Larissa, Jéssica, Maria Clara, Isaac, Luiz, Vinícius, Vitor, Kamilla e Bruno. Eu amo vocês.

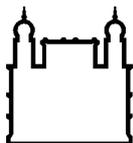
Agradeço à minha ex futura psicóloga, Camila. Você foi crucial para que eu pudesse aprender a controlar, mesmo que minimamente, a minha ansiedade. Levarei suas palavras, reflexões e ensinamentos para a vida e espero voltar às sessões assim que possível.

Agradeço profundamente à minha família (Carlos Luiz, Adriana, Thamíris, Victor Hugo e João Paulo), por ser meu suporte durante toda a minha vida. Por me acolherem sempre quando as responsabilidades e ansiedades pesavam demais. Sei que sempre fazem o que podem por mim. Eu amo muito todos vocês, e espero sempre poder dar orgulho a todos. Em especial agradeço à minha mãe, Adriana, por ser colo nas crises de ansiedade e à minha irmã, Thamíris, por sempre me aconselhar e por não me deixar desamparada nas vezes em que me senti sozinha e perdida.

E por último, mas não menos importante, à Deus, por ser meu melhor amigo e saber de tudo que se passou dentro de mim, pensamentos e sentimentos. Sei que sempre estive olhando por mim, e me amparando nos momentos mais difíceis dessa jornada. Obrigada por me fornecer força e coragem, que não me deixaram desistir.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

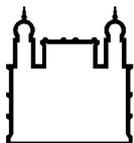
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DOS SOROTIPOS 1 E 4 DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* POR MEIO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIRS)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Manuella de Mello Barbosa

O vírus dengue (DENV) é um dos mais importantes arbovírus transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* aos humanos. Compreende quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a -4), com uma alta diversidade de genótipos e cepas, o que traz uma grande problemática para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. A rápida disseminação do DENV pelo mundo causa grandes impactos na saúde pública. Um eficiente mapeamento da transmissão do vírus, de forma rápida ou em tempo real, é importante para orientar a priorização espacial e temporal de atividades de controle vetorial, a fim de mitigar a transmissão da dengue. Para tal, é necessário que se estabeleça uma vigilância eficaz e oportuna. Porém, as técnicas disponíveis para o diagnóstico de patógenos possuem um alto custo e muitos programas de vigilância de arbovírus localizados em países de baixa e média renda possuem recursos escassos. A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) é uma técnica de análise química, rápida, não-invasiva e que não necessita de reagentes para sua operação que vem sendo utilizada como ferramenta de pesquisa em doenças transmitidas por vetores. O presente trabalho avaliou a possibilidade de detecção e diferenciação dos sorotipos 1 e 4 do DENV por meio da NIRS em mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas criados em laboratório. Os mosquitos foram separados em três grupos: infectados com DENV-1, infectados com DENV-4 e não infectados. Os espectros individuais de cada amostra foram coletados em 10 e 14 dias pós-infecção. Foram desenvolvidos modelos de predição mediante a técnica computacional de Redes Neurais Artificiais para conjuntos de treinamento, validação e teste. A infecção por DENV nas amostras foi previamente comprovada via RT-qPCR. Foram avaliados os percentuais de especificidade, sensibilidade e acurácia dos modelos de predição desenvolvidos. Os resultados mostraram que a NIRS é capaz de detectar DENV – sem distinção por sorotipo – em *Ae. aegypti* com acurácia de 81,7%. Contudo, o diagnóstico diferencial dos sorotipos mostrou baixa acurácia. A NIRS foi capaz de separar mosquitos infectados por DENV-1 daqueles infectados por DENV-4 com acurácia de 74,4%. Dada a natureza dos resultados, a técnica NIRS pode ser usada à frente como um método de triagem, apontando quais amostras estariam positivas para DENV, por exemplo. Posteriormente, esse número reduzido de amostras seria submetido a RT-PCR para confirmação e possivelmente identificação do sorotipo, gerando economia de tempo e recurso, além do aprimoramento das ações da vigilância do DENV no Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS SEROTYPES 1 AND 4 IN *Aedes aegypti* MOSQUITOES USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY (NIRS)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Manuella de Mello Barbosa

Dengue virus (DENV) is one of the most important arboviruses transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito to humans. It comprises four antigenically distinct serotypes (DENV-1 to -4), with a high diversity of genotypes and strains, which poses a great problem for the development of an effective vaccine. The rapid DENV spread around the world causes major impacts on public health. Its rapid spread around the world causes major impacts on public health. An efficient mapping of virus transmission, quickly or in real time, is important to provide guidance for prioritize the spatial and temporal vector control activities to mitigate dengue transmission. For that, it is necessary to establish an effective and timely surveillance. However, the techniques available for the diagnosis of pathogens are expensive and many arbovirus-surveillance programs are in low- and middle-income countries with scarce resources. Near-infrared spectroscopy (NIRS) is a fast, non-invasive, chemical analysis technique that does not require reagents for its operation that has been used as a research tool in vector-borne diseases. The present work evaluated the likelihood of detection and differentiation of DENV serotypes 1 and 4 by means of NIRS in female *Ae. aegypti* mosquitoes reared in the laboratory. Mosquitoes were separated into three groups: DENV-1-infected, DENV-4-infected, and uninfected. Individual spectra of each sample were collected on 10 and 14 days post-infection. Prediction models were developed through the computational technique of Artificial Neural Networks for training, validation and test sets. DENV infection of the samples was previously confirmed via RT-qPCR. The percentages of specificity, sensitivity and accuracy of the prediction models developed were evaluated. The results showed that NIRS is able to detect DENV – without distinction by serotype – in *Ae. aegypti* with an accuracy of 81.7%. However, the differential detection of serotypes provided poor accuracy. The NIRS separated mosquitoes DENV-1-infected from those DENV-4- infected with an accuracy of 74.4%. Given the nature of the results, the NIRS technique can be used ahead as a screening method, pointing out which samples would be positive for DENV, for example. Subsequently, this reduced number of samples would be submitted to RT-PCR for confirmation and perhaps identification of the serotype, saving time and resources, in addition to improving DENV surveillance actions in Brazil.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1 Dengue no mundo	21
1.1.1 <i>Dengue no Brasil</i>	24
1.1.2 <i>O vírus dengue</i>	27
1.1.3 <i>Os sorotipos de DENV</i>	29
1.2 <i>Aedes aegypti</i> , o vetor	31
1.2.2. <i>Ciclo de transmissão: patógeno, vetor e hospedeiro</i>	37
1.3 Vigilância entomológica	40
1.4 Controle do vetor	41
1.5 Vigilância Integrada.....	43
1.5.1 <i>Vigilância virológica e entomoviológica</i>	45
1.6 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) como método padrão de diagnóstico parasitológico em mosquitos vetores.....	45
1.7 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (Near-infrared Spectroscopy - NIRS) ...	47
1.7.1 <i>Aplicações na área entomológica e entomoviológica</i>	51
1.8 Justificativa	54
2. Objetivos gerais e específicos.....	56
2.1 Objetivo geral	56
2.2 Objetivos específicos	56
3. Materiais e Métodos	57
3.1 Coleta e criação de mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	57
3.2 Infecção experimental por DENV-1 e -4.....	60
3.3 Coleta de espectros por NIRS	63
3.4 Confirmação da infecção por RT-qPCR.....	68
3.5 Análise dos dados por Redes Neurais Artificiais.....	68
3.6 Considerações éticas	72
4. Resultados.....	73
4.1 N amostral dos grupos nas infecções	73
4.2 N de espectros coletados por NIRS	74
4.3 Competência Vetorial: confirmação de infecção por DENV-1 e -4 por RT-qPCR.....	75
4.4 Infecção 1: exclusão dos espectros NIR das análises	78

4.5 Conjuntos de Treinamento x Validação x Teste por NIRS	79
4.5.1 A NIRS é capaz de diagnosticar diferencialmente Controle e DENV, sem distinção por sorotipo?	79
4.5.2 A NIRS é capaz de diagnosticar diferencialmente Controle, DENV-1 e DENV-4?	80
4.5.3 A acurácia da diferenciação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 para o Controle (comparações pareadas) varia entre os sorotipos?	82
4.5.4 A NIRS é capaz de diferenciar os sorotipos DENV-1 e DENV-4?	85
4.5.5 Como o modelo preditivo varia de acordo com região do corpo (cabeça/tórax ou abdômen), dias pós-infecção (10 ou 14 dias) e carga viral; como as amostras classificadas erroneamente se agrupam de acordo com essas categorias?	87
5. Discussão	92
8. Apêndices	125
APÊNDICE A – Análise exploratória dos espectros NIR	125
APÊNDICE B – Análise dos espectros NIR médios	127
APÊNDICE C – Análise dos espectros NIR por modelos de predição ANN	129

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição geográfica dos casos de dengue notificados em todo o mundo no ano de 2020	22
Figura 2: Gráfico com os casos de dengue da região das Américas desde o ano de 1980 até o ano atual, de 2022.....	23
Figura 3: Distribuição da taxa de incidência de dengue por município no Brasil, referente às semanas epidemiológicas 1 a 43 (02/01/2022 a 29/10/2022) de 2022	25
Figura 4: Casos reportados de dengue e mortes causadas pela dengue no Brasil em 30 anos, no período de 1986 a 2015	26
Figura 5: Morfologia do vírus RNA.....	28
Figura 6: Esquema da estrutura do genoma do DENV	29
Figura 7: Distribuição da frequência relativa dos sorotipos de DENV por Estado do Brasil até a semana epidemiológica 26 do ano de 2022	31
Figura 8: Representação do macho e da fêmea do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	33
Figura 9: Fases do ciclo de vida do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	36
Figura 10: Barreiras anatômicas naturais presentes no corpo do mosquito <i>Ae. aegypti</i> à infecção/replicação do vírus no mesmo e as etapas sequenciais para que a fêmea do mosquito seja competente para transmitir o vírus após o repasto sanguíneo em um humano virêmico .	38
Figura 11: Espectro Eletromagnético indicando os intervalos/regiões das frequências de ondas eletromagnéticas existentes	49
Figura 12: Representação de modos vibracionais gerados pelas ligações químicas de átomos presentes em moléculas	50
Figura 13: Espectros NIR médios na região de 350 a 2500 nm da região da cabeça/tórax de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> infectados por ZIKV (linha vermelha) e não infectados (linha azul) ..	52
Figura 14: Gráfico com os espectros brutos - referentes à absorvância e ao comprimento de onda - de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> infectados com ZIKV-, DENV-, co-infectados com ZIKV e DENV, e mosquitos da mesma espécie não infectados.....	53
Figura 15: Mapa da localização da área de distribuição e coleta de ovitrampas pelo bairro da Urca, no Rio de Janeiro	57
Figura 16: Distribuição das ovitrampas em campo.....	58
Figura 17: Etapas de criação dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> em laboratório.....	59
Figura 18: Etapas do experimento de infecção com DENV	62
Figura 19: Processo pré-coleta de espectros NIR.....	63

Figura 20: Coleta dos espectros NIR.....	65
Figura 21: Espectros NIR médios de mosquitos não infectados [Controle (linha vermelha)], infectados com DENV-1 (linha azul) e infectados com DENV-4 (linha verde), do segundo experimento de infecção	67
Figura 22: Esquematização da estrutura de uma Rede Neural Artificial simples.....	70
Figura 23: Exemplificação do uso do software JMP para a criação dos modelos de predição com o uso de espectros NIR por Redes Neurais Artificiais	71
Figura 24: Eixo y = N de amostras; eixo x = Grupo de Infecção. Número total de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> fêmeas ingurgitadas (amostras) separadas em cada experimento de infecção (Infec. 1 e Infec. 2), de acordo com seu grupo: controle, DENV-1 ou DENV-4.....	73
Figura 25: Carga viral de amostras de <i>Ae. aegypti</i> positivas para infecção por DENV: em 10 (verde) e 14 (laranja) dpi no primeiro experimento de infecção (Infec 1) e em 10 (azul) e 14 (rosa) dpi no segundo experimento de infecção (Infec 2)	77
Figura 26: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR	88
Figura 27: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR, de acordo com a região do corpo do mosquito: abdômen ou cabeça/tórax	89
Figura 28: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR, de acordo com o dpi: 10 ou 14 dias	90
Figura 29: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR, de acordo com a carga viral: baixa (CT de 25-37) ou alta (CT de 18-25) que é indicada na parte superior da figura.....	91

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Número de amostras utilizadas, na primeira (Infec. 1) e segunda infecção (Infec. 2), para coleta de espectros NIR em 10 e 14 dpi. De cada amostra foram coletados 2 espectros, 1 da região da cabeça/tórax e 1 da região do abdômen. 75
- Tabela 2:** Taxa de infecção dos grupos de mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas infectadas por DENV-1 e -4 na infecção 1 (Infec. 1) e na infecção 2 (Infec. 2), em 10 e 14 dpi. A taxa de infecção foi calculada baseada nas amostras comprovadamente positivas para infecção por meio da RT-qPCR..... 76
- Tabela 3:** Na primeira coluna estão os grupos de infecção, Controle e DENV (DENV-1 + DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia. 80
- Tabela 4:** Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle, DENV-1 e DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle, DENV-1 e DENV-4), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia. 82
- Tabela 5:** Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle e DENV-1), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV-1), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia. 83
- Tabela 6:** Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle e DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV-4), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia. 84

Tabela 7: Na primeira coluna estão os grupos de infecção (DENV-1 e DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (DENV-1 e DENV-4), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia. 85

Tabela 8: Comparativo das acurácias (%) encontradas em cada análise dos modelos de predição, por meio de espectros NIR, para os três conjuntos: treinamento, validação e teste. 86

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

Ae. albopictus – *Aedes albopictus*

An. arabiensis – *Anopheles arabiensis*

An. coluzzii – *Anopheles coluzzii*

An. gambiae – *Anopheles gambiae*

ANN – Redes Neurais Artificiais

ATR-FTIR – Transformada de Fourier de refletância total atenuada

C – Carbono

CHIKV – Vírus chikungunya

cm – Centímetros

CT – “Cycle Threshold”

DENV – Vírus dengue

DENV-1 – Sorotipo 1 do vírus dengue

DENV-2 – Sorotipo 2 do vírus dengue

DENV-3 – Sorotipo 3 do vírus dengue

DENV-4 – Sorotipo 4 do vírus dengue

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Dpi – Dia pós-infecção

E – Especificidade

FFU – Unidades de foco fluorescente

Fig – Figura

FIR – Infravermelho distante

FHD – Febre hemorrágica da dengue

GA-LDA – Algoritmo genético com análise discriminante linear

H – Hidrogênio

IB – Índice de Breteau

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IP – Índice Predial

kb – Kilobase

Labfla – Laboratório de Flavivírus

Lathema – Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários

LIRAA – Levantamento de Índice Rápido para o *Aedes aegypti*

MEB – Barreira de escape do intestino médio

MIB – Barreira de infecção do intestino médio

MIR – Infravermelho médio

MIRS – Espectroscopia no infravermelho médio

ml – Mililitros

N – Nitrogênio

NIR – Infravermelho próximo

NIRS – Espectroscopia no infravermelho próximo

nm – Nanômetros

NS – Proteína não estrutural

O – Oxigênio

PBS – Solução tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFU – Unidade formadoras de placa

PIE – Período de incubação extrínseco

PNCD – Plano Nacional de Controle da Dengue

RNA – Ácido ribonucleico

ROC – Característica de Operação do Receptor

RT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

S – Enxofre

SPA-LDA – Algoritmo de projeção sucessiva com análise discriminante linear

Tab – Tabela

TanH – Tangente hiperbólica

UBV – Ultra baixo volume

UERJ – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

VI – Vigilância Integrada

ZIKV – Vírus Zika

1. Introdução

1.1 Dengue no mundo

Dentre as doenças virais transmitidas por vetores com maior grau de impacto e, conseqüentemente, de importância na saúde pública do mundo, está a dengue. O Sudeste da Ásia, de 1950 até meados de 1990, era a região do mundo mais afetada pela doença, possivelmente devido ao crescimento econômico e urbano da região. Nas décadas de 1970 e 1980, houve uma grande expansão geográfica do vírus e do mosquito vetor, levando a uma transmissão generalizada da doença em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Países da América do Sul e Central começaram a ter muitos casos de dengue, contribuindo com mais da metade das notificações da doença no mundo, ganhando grande destaque neste cenário epidemiológico (Barreto & Teixeira 2008; Guzman & Harris 2015; Bhatt *et al.* 2016; Guzman *et al.* 2016).

Nas últimas décadas, a incidência de casos da dengue cresceu de forma drástica, dados atuais mostram que metade da população global apresenta risco de contrair a doença (OPAS 2022). A dengue é causada por um arbovírus, termo que se refere à expressão em inglês *arthropod borne virus*, e caracteriza vírus que são transmitidos aos hospedeiros por meio de artrópodos, e por este motivo é denominada como uma arbovirose. Juntamente com outras arboviroses, como Zika e chikungunya, afeta 129 países, com prevalência por regiões do mundo com clima tropical e subtropical, com destaque para áreas urbanas e suburbanas, onde encontra-se o vetor, transmissor de seu agente etiológico (Tauil 2002; OPAS 2022). Mesmo com o crescente número de casos, muitos deles são classificados de maneira equivocada ou, ainda, há uma subnotificação do número real de casos da doença. Estimativas recentes indicam que ocorram 390 milhões de infecções por dengue por ano, dos quais 96 milhões se manifestam clinicamente, com qualquer gravidade da doença (OPAS 2022).

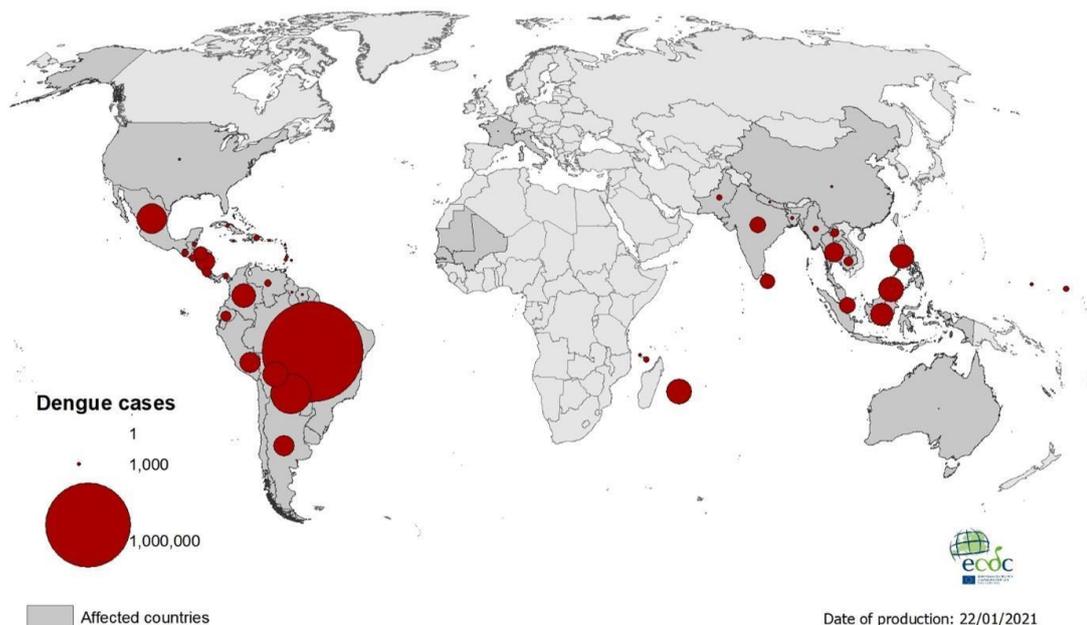


Figura 1: Distribuição geográfica dos casos de dengue notificados em todo o mundo no ano de 2020: presente na África, Américas, Ásia, Caribe e Pacífico; neste mesmo ano, França e Itália relataram casos autóctones desta arbovirose. Os 5 países com mais casos neste ano incluem: Brasil, Paraguai, México, Vietnã e Malásia. Fonte: ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (2022).

Segundo o Ministério da Saúde, a dengue apresenta um quadro clínico amplo, cujo espectro inclui infecções não aparentes, com casos assintomáticos a casos sintomáticos leves ou graves, este último com hemorragia e choque, podendo evoluir para a morte (Brasil 2002; Tauil 2002). A dengue clássica, também conhecida como febre da dengue, varia muito em seus sinais. Sintomas como febre (39°C a 40°C), artralgia, exantema, náuseas e vômitos são comuns, e tendem a durar de 5 a 7 dias. Com o desaparecimento da febre, os sintomas tendem a regredir, podendo apenas persistir a fadiga. Já no quadro mais grave da doença, a febre hemorrágica da dengue (FHD), os pacientes inicialmente apresentam um quadro com os mesmos sintomas que os da dengue clássica, porém rapidamente há uma evolução no mesmo, que faz com que os pacientes apresentem manifestações hemorrágicas e/ou derrames cavitários e/ou instabilidade hemodinâmica e/ou choque (Brasil 2002). Em sua forma grave, a dengue se caracteriza como uma das principais causas de morte em crianças, prioritariamente, em lugares da Ásia e da América Latina (Bezerra *et al.* 2021; OPAS, 2022).

Ainda nos dias de hoje, não existe nenhum tratamento específico. A infecção de uma pessoa por um dos sorotipos do vírus da dengue confere uma imunidade cruzada de curto prazo para os sorotipos restantes e de longo prazo contra infecção pelo mesmo sorotipo. Dessa forma,

uma vacina ideal deve conferir proteção de longa duração para os 4 sorotipos do vírus. A detecção precoce da infecção e o acesso aos cuidados médicos adequados, faz com que a taxa de mortalidade vinculada à dengue possa ser reduzida abaixo de 1% (OPAS 2022). Todavia, o alto nível endêmico da dengue e seu potencial para epidemias explosivas se tornam características desafiadoras para as estratégias de vigilância e controle, além de desafiar o conhecimento sobre a prevenção da doença (Teixeira *et al.* 1999, 2005).

A dengue gera considerável impacto na economia em países endêmicos devido a necessidade de assistência médica, aplicação de medidas de controle do vetor e também a redução do turismo naquela região. É provável que a dengue continue sendo por um longo tempo um sério e importante problema de saúde pública no mundo, visto que a facilidade da mobilidade humana cresce cada vez mais e pela dificuldade que existe na produção de uma vacina eficaz contra a doença (Holmes & Twiddy 2003), já mencionado anteriormente. Um estudo publicado este ano por Chen e colaboradores (2022), mostrou a influência das medidas de lockdown - quarentena - em função da pandemia de COVID-19, na redução do número de casos de dengue em regiões endêmicas do sudeste da Ásia e da América Latina. Segundo os dados obtidos, os pesquisadores acreditam que a interrupção na mobilidade humana, como o fechamento de escolas e a diminuição da presença de pessoas em locais não residenciais, contribuiu para a interrupção do ciclo de transmissão do vírus dengue (DENV). Entretanto, sabe-se que houve uma alta taxa de subnotificação dos casos envolvendo infecção por dengue neste período pandêmico, o que contribuiu fortemente para o cenário com poucos casos confirmados da arbovirose. Ademais, a realização das medidas de controle de vetores também foi dificultada e, assim, a transmissão do vírus se manteve (Chen *et al.* 2022).

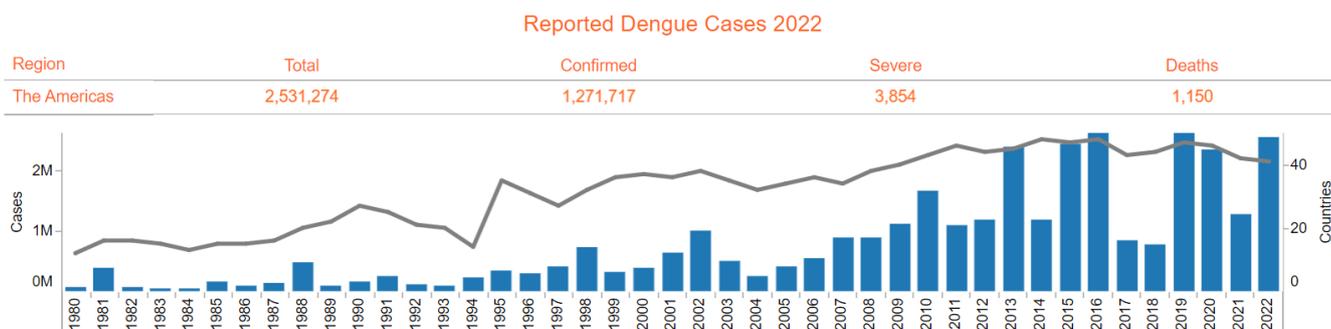


Figura 2: Gráfico com os casos de dengue da região das Américas desde o ano de 1980 até o ano atual, de 2022. Fonte: PAHO (2022).

1.1.1 Dengue no Brasil

As epidemias de dengue apresentam padrões sazonais, com a transmissão geralmente atingindo o pico durante e após estações chuvosas, como o verão, com maior incidência de casos nos primeiros cinco meses do ano (Braga & Valle 2007). Vários são os fatores que contribuem para esse aumento, como a alta densidade populacional do vetor. Além disso, há a diminuição do período de incubação extrínseco (PIE) do patógeno e o aumento da exposição do hospedeiro ao vetor e também ao patógeno. Tudo isso graças à alta temperatura, precipitação e umidade neste período do ano. Com as temperaturas globais cada vez mais altas em diferentes regiões do mundo, áreas antes não habitadas pelo *Aedes aegypti*, podem passar a ser. Essas mudanças na dinâmica populacional do vetor podem contribuir na intensificação dos riscos de transmissão da dengue (PAHO 2018; Iwamura *et al.* 2020). Além disso, os países das Américas enfrentam o fato de que as condições sociais, econômicas e ambientais contribuem de forma simultânea para que a dengue seja um problema de saúde em suas populações (Bezerra *et al.* 2021).

Nos dias de hoje, o Brasil vive um cenário hiperendêmico, com a cocirculação dos 4 sorotipos do vírus, com ocorrência de casos graves e fatais. Além disso, existe a preocupação da cocirculação da dengue com outras arboviroses. Um estudo recente apontou a possibilidade de um novo surto global de Zika, devido a novas mutações, que aumentam a transmissibilidade e a patogenicidade do vírus. Infelizmente, no país, ainda há muitos casos de dengue que são subnotificados, devido ao preenchimento inadequado da ficha de notificação, pela dificuldade de interpretação dos resultados de diagnóstico feito por exames indiretos (que predominam sobre os exames diretos), que podem levar a reações cruzadas, tornando esses resultados inconclusivos ou insuficientes para a confirmação ou descarte do caso. Além disso, a existência de pacientes assintomáticos - que mesmo nesta condição podem transmitir o vírus - e de muitos pacientes sintomáticos que não procuram o atendimento de saúde contribuem para esse cenário de subnotificação da doença (Duong *et al.* 2015; Silva *et al.* 2016; Nunes *et al.* 2019; BBC 2022; Brasil 2022; Regla-Nava *et al.* 2022). Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2022 o Centro-Oeste é a região que apresenta a maior taxa de incidência de dengue, seguida das regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Norte (Figura 3) (Brasil 2022).

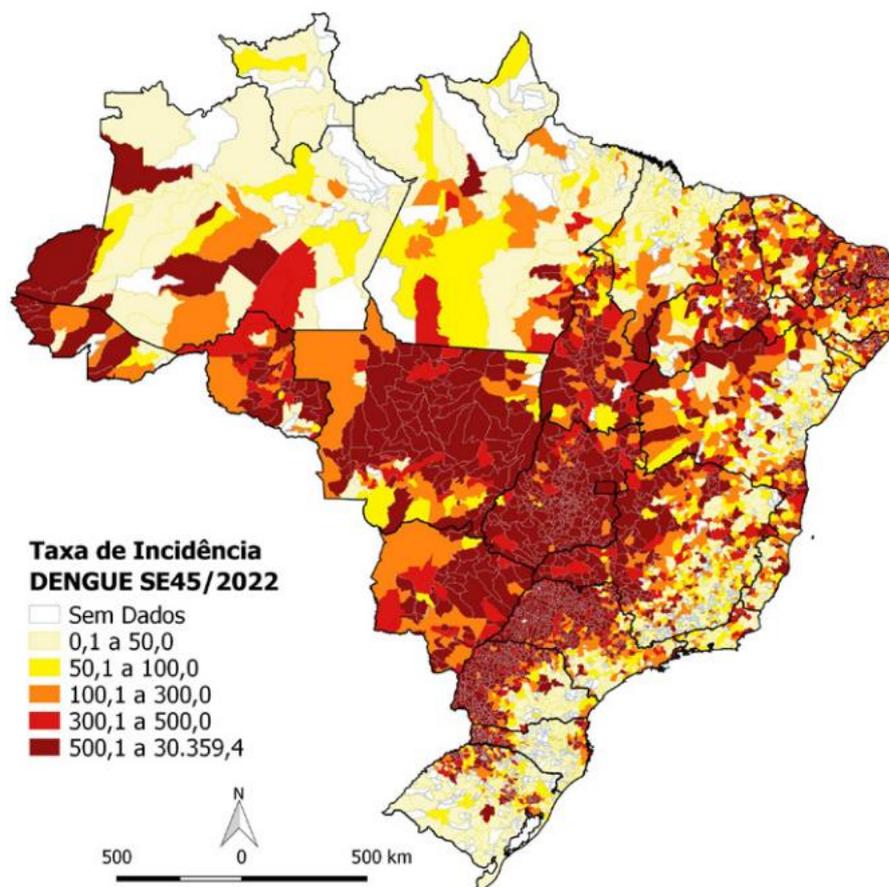


Figura 3: Distribuição da taxa de incidência de casos confirmados de dengue por município no Brasil, referente às semanas epidemiológicas 1 a 45 (02/01/2022 a 12/11/2022) de 2022. Fonte: Sinan Online/Ministério da Saúde Brasil (2022).

As primeiras referências na literatura médica sobre a dengue no Brasil datam no ano de 1916, em São Paulo, e em 1923, na cidade de Niterói (Rio de Janeiro). Entretanto, a primeira ocorrência do vírus no país documentada clínica e laboratorialmente, foi no fim de 1981 e início de 1982, no Estado de Boa Vista (Roraima), com surtos causados pelos vírus DENV-1 e DENV-4. Os casos foram controlados rapidamente. Porém, em 1986, houve uma epidemia por conta da introdução do DENV-1 no Rio de Janeiro, que depois se espalhou para outros Estados, como algumas capitais do Nordeste (Fig. 4). Neste ano, casos de morte por dengue foram confirmados e, a partir daí, a doença adquiriu importância epidemiológica, se tornando endêmica no país, com epidemias intercaladas, devido a introdução de novos sorotipos, em áreas anteriormente não atingidas (Osanaí 1984; Teixeira *et al.* 1999; Braga & Valle 2007; Nunes *et al.* 2019).

Entre os anos de 1986 e 1990, as epidemias estavam restritas aos Estados das regiões Sudeste e Nordeste. Em 1990, no Rio de Janeiro houve a introdução de um novo sorotipo, o

DENV-2, que fez com que o cenário se agravasse no Estado. Neste ano houve os primeiros casos de FHD. Em 1994, com a rápida dispersão do vetor por todo país, a circulação viral aumentou significativamente, provocando também uma ascensão da doença. Os sorotipos DENV-1 e DENV-2 passaram a cocircular, causando epidemias em todo o país. No fim do ano 2000, no Rio de Janeiro, mais um sorotipo, recém-introduzido, havia sido detectado, o DENV-3, que se espalhou ligeiramente para outros Estados do país, como Roraima. A maior e mais grave epidemia de dengue no Brasil, até o momento, foi causada por este sorotipo, no ano de 2002. Muitas internações e 150 mortes confirmadas. Nesse ano, o número de óbitos por FHD ultrapassou o número de óbitos por malária no país. Em 2007, o DENV-2 ressurgiu gerando uma grande epidemia em 2008, com um aumento significativo de casos de FHD. Em 2010, o risco de reintrodução do DENV-4 era iminente, por conta da circulação deste sorotipo em países vizinhos como Venezuela e Colômbia. Em julho deste ano, então, os primeiros casos de DENV-4 foram identificados nos Estados de Roraima e Amazonas. Em março de 2011, os primeiros casos desse sorotipo foram notificados no Rio de Janeiro, introduzido pelo município de Niterói (Fig. 4). Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma contínua (Teixeira *et al.* 1999; Braga & Valle 2007; Nunes *et al.* 2019; Bezerra *et al.* 2021).

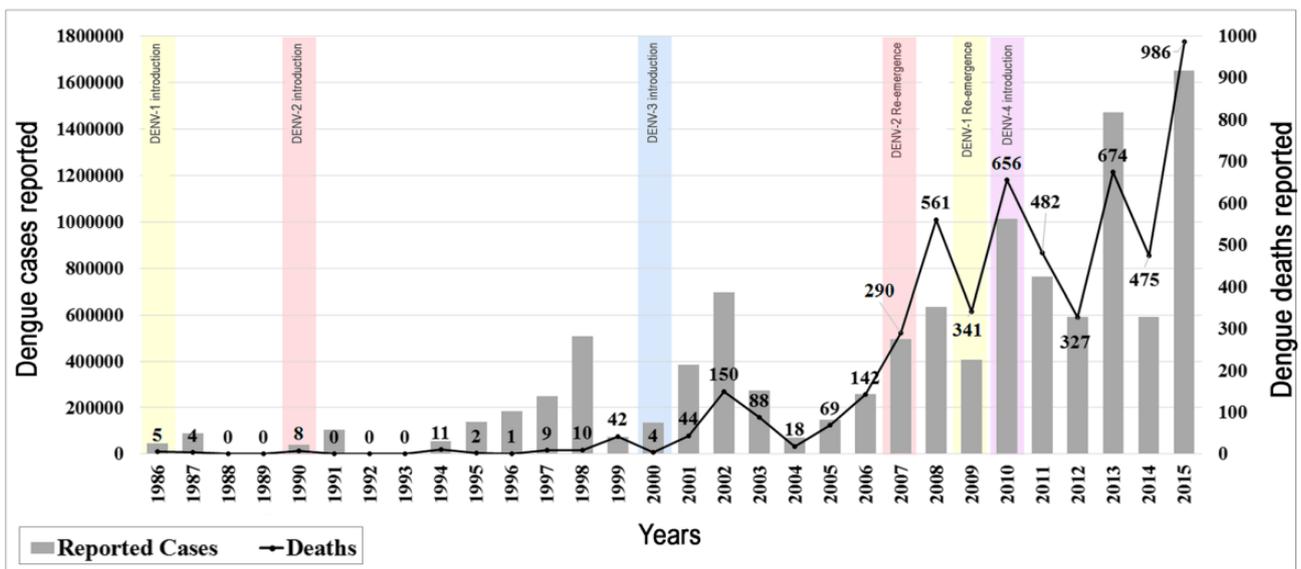


Figura 4: Casos reportados de dengue e mortes causadas pela dengue no Brasil em 30 anos, no período de 1986 a 2015. As barras cinzas mostram o número de casos de dengue notificados; os números de mortes são mostrados

nas linhas; as barras coloridas mostram a introdução e reemergência dos 4 sorotipos da dengue. Fonte: Nunes *et al.* (2019).

1.1.2 O vírus dengue

O DENV é um vírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, assim como o vírus Zika (ZIKV) e o vírus da febre amarela (Gubler 2002; Leur *et al.* 2021). O isolamento do vírus foi feito por Kimura em 1943 e Hotta em 1944. Um ano depois, em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram as cepas Havaí (DENV-1) e Nova Guiné (DENV-2) onde foram observadas características antigênicas diferentes, considerando que eram sorotipos do mesmo vírus. Em 1956, durante a epidemia de dengue hemorrágica no Sudeste da Ásia, foram isolados os DENV-3 e DENV-4 (Teixeira *et al.* 1999).

O DENV em altas temperaturas, como 50°C, é inativado, e sua infectividade cai em 50% a cada 10 minutos. Essa, por sua vez, é mais estável em pH básico, de 7 a 9, e pode ser mantida por até 5 anos em temperatura de -70°C (Valle *et al.* 2015). O vírion maduro - partícula viral infecciosa - possui 3 proteínas estruturais: a proteína C do capsídeo (associada ao genoma formam o nucleocapsídeo), primeira a ser sintetizada, envolve o RNA e apresenta simetria icosaédrica, a proteína M da membrana, formada a partir da proteína precursora prM, e a proteína E do envelope (Fig. 5). A morfologia do vírus dengue é caracterizada pela sua forma esférica, sendo um vírus envelopado com diâmetro de 40 a 50 nanômetros (Holmes & Twiddy 2003; Valle *et al.* 2015).

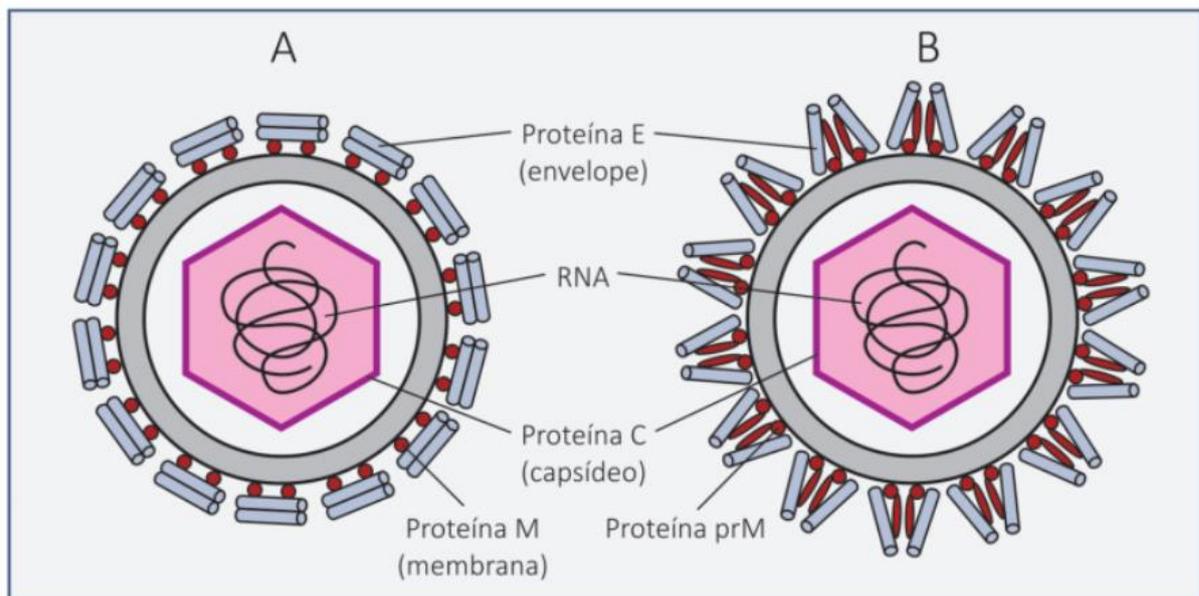


Figura 5: Morfologia do vírus RNA; A. Partícula viral madura lisa; B. Partícula viral imatura com projeções. Fonte: Valle *et al.* 2015 (adaptado de Pimenta *et al.* 2009).

O material genético do DENV é composto por RNA fita simples de polaridade positiva, com genoma de aproximadamente 11 kb e uma fase aberta de leitura, com propriedades antigênicas, que faz com que existam 4 sorotipos específicos do vírus, como mencionado anteriormente. Dessa forma, uma única poliproteína é codificada e posteriormente clivada em proteínas estruturais, já citadas, e também em proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Fig. 6) (Chambers *et al.* 1990; Valle *et al.* 2015). Sabe-se que a proteína NS1 tem grande importância em estudos com o DENV, pois é uma proteína altamente conservada secretada em altas concentrações durante a replicação do vírus, sendo considerada, por este motivo, um biomarcador (Wasick *et al.* 2017).

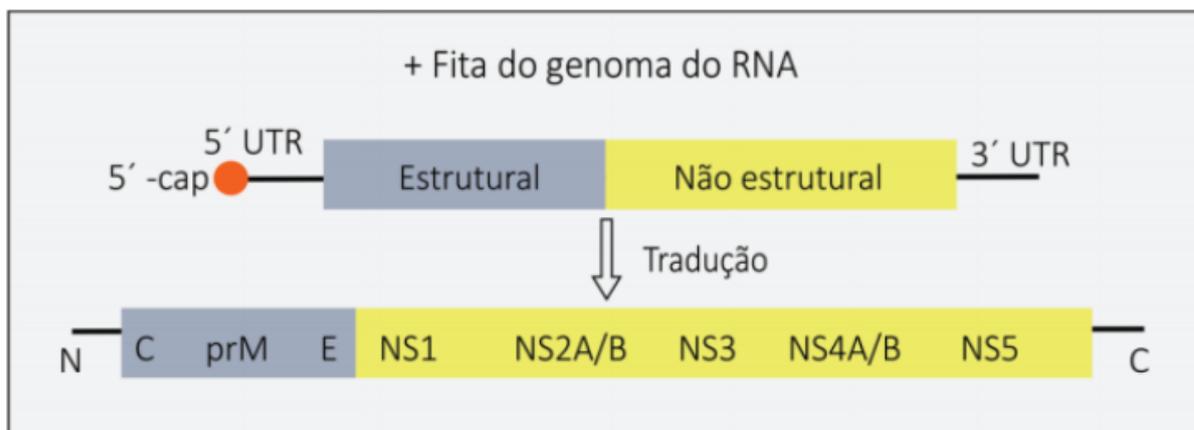


Figura 6: Esquema da estrutura do genoma do DENV: a região cinza codifica as proteínas estruturais (C, prM, M e E) e a região amarela codifica as proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).
Fonte: Valle *et al.* 2015 (adaptado de Pimenta *et al.* 2009).

Devido à falta de um mecanismo de correção da RNA polimerase viral durante a replicação, à rápida taxa de replicação, ao tamanho da população e à pressão da resposta imunológica do hospedeiro, assim como outros vírus RNA, o DENV apresenta alto grau de variabilidade genética. Uma amostra de um vírus pode ser considerada uma mistura de variantes, onde certos genótipos dominam, e essas variações podem vir a modular o curso de uma infecção, a capacidade de replicação em células de vetores e hospedeiros, a sobrevivência do vírus na natureza e também a sua virulência e transmissão entre os hospedeiros (Holmes & Twiddy 2003; Valle *et al.* 2015).

1.1.3 Os sorotipos de DENV

As infecções por DENV são causadas por 4 sorotipos, antigenicamente distintos, sendo que todos circulam atualmente no Brasil: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Bezerra *et al.* 2021). Quando um hospedeiro suscetível se infecta pela primeira vez com um desses sorotipos da dengue, seu organismo é capaz de desenvolver uma resposta imune a este sorotipo em específico. Entretanto, caso esse mesmo hospedeiro venha a entrar em contato com um outro sorotipo da doença, por meio de uma nova infecção, ele pode manifestar uma forma mais grave da doença em relação à primeira vez. Isso porque cada sorotipo gera uma única resposta imune à infecção. Esses 4 sorotipos compartilham 65% de seu material genético, e por isso são considerados geneticamente semelhantes (Holmes 1998).

Os diferentes sorotipos do DENV podem levar a perfis clínicos e epidemiológicos diversos, porém isto ainda não é definido de forma precisa. É importante entender que para

definir a virulência de um sorotipo é necessário considerar tanto a cepa viral envolvida na infecção, quanto o histórico clínico/epidemiológico do hospedeiro, para compreensão de sua suscetibilidade ao patógeno em questão. Segundo estudos, acredita-se que o DENV-2 e o DENV-3 sejam os sorotipos responsáveis por causar as formas mais graves da dengue em relação aos sorotipos DENV-1 e DENV-4, responsáveis pelas formas mais leves da doença. O DENV-1 é tido como o sorotipo com o caráter mais dispersivo dos 4, o que acaba por gerar grandes epidemias em um curto prazo de tempo (Rico-Hesse *et al.* 1997; Vaughn *et al.* 2000; Messer *et al.* 2003; Passos *et al.* 2004; Balmaseda *et al.* 2006). Segundo o Boletim Epidemiológico, até a semana epidemiológica 44 do ano de 2022, foram confirmados, por meio de exames diretos, 84,2% (N = 21.350) casos de infecção por DENV-1 e 15,8% (N = 4.018) de casos de infecção por DENV-2 no Brasil. Até o momento, foi identificado apenas um caso de infecção por DENV-3 no Estado do Rio Grande do Norte e nenhum caso por DENV-4 no país (Fig. 7). Entretanto, esses dados são baseados apenas em 15,1% (N = 25.369) da quantidade de amostras totais (N = 168.231) positivas para DENV (Brasil 2022). Sendo assim, é capaz de que os outros dois sorotipos restantes estejam circulantes também pelas Unidades Federadas do país.

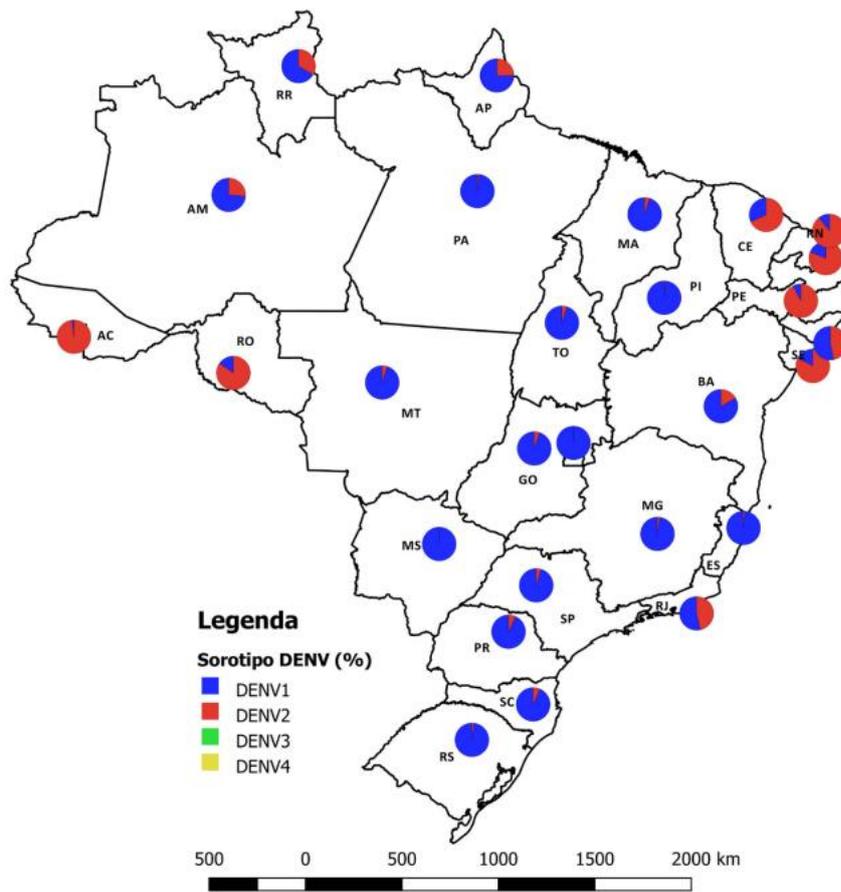


Figura 7: Distribuição da frequência relativa dos sorotipos de DENV por Estado do Brasil até a semana epidemiológica 44 do ano de 2022. Fonte: Sistema GAL-Nacional, Ministério da Saúde Brasil (2022).

Apesar de haver um debate sobre a existência de mais um sorotipo do vírus dengue, o DENV-5, ainda não há um consenso sobre sua inclusão. Isso porque sua descoberta foi baseada em um caso isolado, devido a um surto de dengue na Malásia no ano de 2007, não havendo mais nenhum novo caso humano envolvendo este sorotipo, podendo estar associado apenas na circulação entre primatas não humanos. Sendo assim, continua-se assumindo que existam apenas 4 sorotipos circulantes do vírus dengue, pelo mundo (Mustafa *et al.* 2015).

1.2 *Aedes aegypti*, o vetor

O mosquito *Ae. aegypti*, pertencente à ordem Diptera e à família Culicidae, foi descrito pela primeira vez no Egito, África, por Linnaeus no ano de 1762. Inicialmente a espécie ficou conhecida como *Culex aegypti* - *Culex* que em latim significa “mosquito” e *aegypti* que em latim significa “egípcio” - fazendo referência ao seu local de origem. Só após a descrição do

gênero *Aedes*, no ano de 1818 por Meigen, o seu nome definitivo ficou como *Ae. aegypti*, visto que foi verificado que a espécie *aegypti*, descrita anos antes, apresentava características morfológicas e biológicas semelhantes às de espécies do gênero *Aedes* e não às do gênero *Culex* (Christophers 1960).

Acredita-se que essa espécie tenha sido introduzida no Brasil durante o período colonial, de maneira passiva, por meio dos navios negreiros que traziam escravos do continente americano, entre os séculos XVI e XIX (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Devido às ações antrópicas que destruíram habitats naturais, houve uma seleção em parte da população silvestre desses mosquitos, fazendo com que se adaptassem a locais com aglomerados de pessoas (Crovello & Hacker 1972), isto é, áreas mais urbanas. Atualmente é considerado um artrópode de caráter cosmopolita, visto sua característica de acompanhar o homem durante suas migrações pelo mundo. Não por acaso, essa espécie de mosquito tende a ocorrer em regiões tropicais e subtropicais do mundo, que apresentam um clima quente e úmido que contribui para sua proliferação (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994), o que explica o caráter de distribuição da dengue nessas mesmas regiões (OPAS, 2022). É comumente encontrado nas áreas de peridomicílio e intradomicílio, locais de maior concentração humana, devido ao seu caráter antropofílico. Por sua vez, em ambientes semi-silvestres sua presença é mais escassa, justamente por ser um local onde a densidade populacional humana é baixa (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

O *Ae. aegypti* é um mosquito que possui coloração escura, com listras e manchas brancas distribuídas pelo corpo, com duas faixas longitudinais submedianas mais finas e paralelas e linhas curvas laterais formando um desenho em forma de lira (Gadelha & Toda 1985; Taveira *et al.* 2001). A distinção a olho nu da fêmea para o macho é possível pela observação do formato das antenas e pelo tamanho dos palpos. Enquanto a fêmea apresenta antenas pilosas e palpos curtos, o macho possui antenas plumosas e palpos longos, tanto quanto a sua probóscide. Ademais, de maneira geral, as fêmeas são maiores que os machos (Fig. 8) (Goeldi 1905; Christophers 1960).

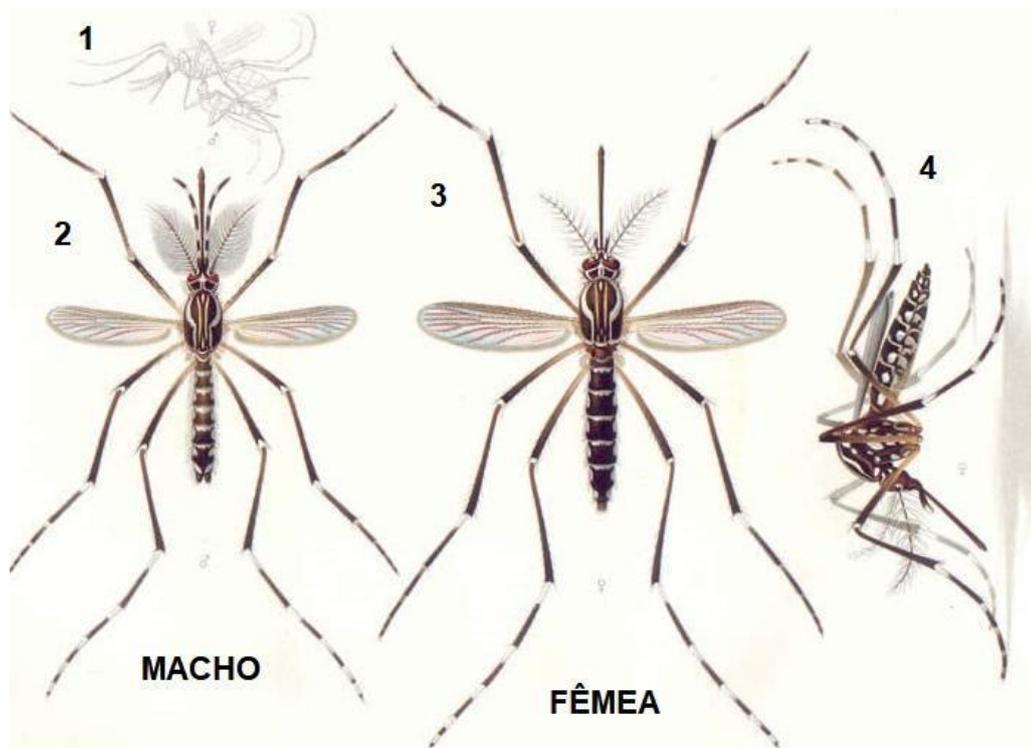


Figura 8: Representação do macho e da fêmea do mosquito *Ae. aegypti* copulando durante o voo; 2. O macho com antenas plumosas e palpos longos que acompanham sua probóscide; 3. A fêmea com antenas pilosas e palpos curtos; 4. A fêmea em repouso. Fonte: Adaptado de Goeldi (1905).

Em seu ciclo de vida, o mosquito *Ae. aegypti*, assim como todos os dípteros, passam por uma metamorfose completa, por isso se enquadram no grupo de insetos holometábolos. Essa característica faz com que as fases imaturas de seu ciclo sejam completamente diferentes da sua fase madura, tanto em aspectos morfológicos quanto em aspectos ecológicos. O ciclo, em condições favoráveis para o desenvolvimento da espécie, dura geralmente em torno de 7 a 10 dias, onde 4 fases são necessárias: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 9) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Os ovos possuem formato elíptico e inicialmente apresentam uma coloração pálida, escurecendo após alguns minutos, devido ao processo de melanização, adquirindo coloração negra brilhante. São bem pequenos, sendo difícil de serem observados a olho nu. São depositados pela fêmea, preferencialmente, em criadouros artificiais, recipientes propícios para acumular água. Água com pouca matéria orgânica e parada. Dessa maneira, tanto reservatórios de armazenamento de água para uso doméstico, quanto recipientes abandonados pelo homem em seus quintais, jardins e ruas, que possam acumular água da chuva, servem como potenciais criadouros para essa espécie. A fêmea tende a distribuir cada postura em diversos recipientes, acredita-se que como um comportamento selecionado para diminuir a competição larval intra e

interespecífica (Tauil 2001; Funasa 2001). Uma característica importante, que confere uma vantagem para a disseminação da espécie, é o processo de diapausa. Os ovos do *Ae. aegypti* são resistentes à dessecação, podendo continuar viáveis por até um ano sem contato com a água. Dessa maneira, os ovos conseguem sobreviver em ambientes secos, à espera de um período chuvoso e quente naquele local, propício para eclosão. Em condições favoráveis de umidade e temperatura (acima de 25°C), o desenvolvimento do embrião do mosquito é concluído em 2-3 dias após a postura (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Farnesi *et al.* 2009).

Do ovo eclode a larva. As larvas possuem quatro ínstaes: L1, L2, L3 e L4. A duração da fase larval é dependente da temperatura, da disponibilidade de alimento e da densidade de larvas no criadouro. O corpo da larva é dividido em cabeça, tórax e abdome com cerdas sensoriais, importantes para a flutuação. Filtradoras e detritívoras, consomem qualquer matéria orgânica presente em seu criadouro, podendo até, em caso de falta de recursos, recorrer ao canibalismo. Embora sejam aquáticas, as larvas necessitam de um sifão respiratório para respirar o oxigênio do ar, onde em posição vertical, permanecem na superfície da água. Para o desenvolvimento das próximas fases do ciclo, armazenam proteínas e glicogênio em seu corpo gorduroso (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Funasa 2001).

No fim do ínstar L4, a larva se transforma em pupa. Em condições favoráveis, o período entre a eclosão e a pupação é de 5 dias. Entretanto, em criadouros com baixa temperatura e escassez de alimento, o desenvolvimento pode ser retardado. A pupa tem seu corpo dividido em cefalotórax e abdome, fazendo com que quando observadas lateralmente tenham formato de vírgula. Nessa fase, o mosquito não se alimenta, podendo ficar imóvel na superfície da água por muito tempo (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Possuem um par de trompetas respiratórias, que atravessam a água e permitem a respiração do oxigênio do ar. Esta fase pupal dura, geralmente, de 2 a 3 dias (Funasa 2001).

Por fim, a fase adulta, a mais conhecida pelas pessoas. O corpo do mosquito adulto é dividido em cabeça (com olhos, antenas e palpos), tórax (com 3 pares de pernas e 2 pares de asas para a locomoção) e abdômen, onde encontram-se os aparelhos reprodutor, digestivo e excretor (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Essa fase do *Ae. aegypti* representa a sua fase reprodutiva, sendo uma fase importante para a proliferação e dispersão da espécie, como para a maioria dos insetos alados. Todavia, acredita-se que a dispersão passiva, por meio dos ovos e das larvas seja mais expressiva que a dispersão ativa pelo mosquito adulto. Os voos não costumam exceder 100 m. Porém, essa distância relacionada à presença ou à ausência de

barreiras físicas e geográficas no local, por exemplo, pode fazer com que a dispersão do mosquito *Ae. aegypti* adulto varie, sendo comumente maior em áreas com ausência de barreiras (excedendo os 100 m). Após a emergência da fase pupal, o adulto pousa sobre as paredes do criadouro, permanecendo ali por horas, até que ocorra o endurecimento de seu exoesqueleto e de suas asas e, no caso dos machos, a rotação da genitália em 180°. No período de 24 horas, ambos sexos já podem acasalar. O acasalamento geralmente se dá durante o voo, mas pode ocorrer sobre uma superfície, vertical ou horizontal. Uma única cópula é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida. Quando não está copulando, procurando fontes de alimento ou em dispersão, o *Ae. aegypti* busca locais escuros e quietos para repousar, como quartos e banheiros de casas e/ou áreas do peridomicílio. Na natureza, vivem em média de 30 a 35 dias (Funasa 2001; Maciel-de-Freitas & Lourenço-de-Oliveira 2009).

Apesar do ciclo de reprodução do mosquito comumente durar de 7 a 10 dias, como já mencionado, seu desenvolvimento está diretamente ligado ao clima. Alta precipitação pluviométrica simultaneamente com alta da temperatura são as condições climáticas ideais para a reprodução do *Ae. aegypti*. Estas características, comumente presentes na estação do verão no Brasil, favorecem a proliferação do vetor, sendo neste período do ano de suma importância que as medidas de prevenção ganhem atenção e sejam reforçadas. Em contrapartida, períodos do ano de menor precipitação e temperaturas mais amenas, fazem com que haja um retardo no desenvolvimento desses mosquitos, onde a densidade se mantém em níveis baixos ou até então que a presença dos mesmos nos ambientes seja quase nula (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

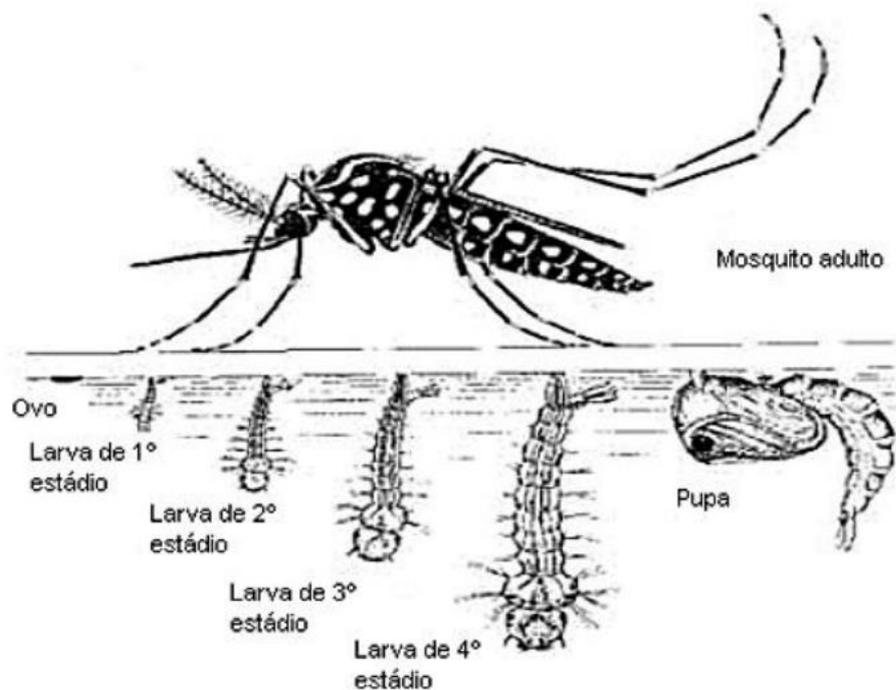


Figura 9: Fases do ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*: ovo, 4 estágios larvais, pupa e enfim o adulto. Fonte: Brasil (2008).

Tanto o macho quanto a fêmea do mosquito *Ae. aegypti* possuem hábitos diurnos para suas atividades (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Tauil 2001), como a alimentação, principalmente ao amanhecer e ao entardecer. Enquanto o macho se alimenta somente da seiva de plantas, a fêmea se alimenta da seiva e também de sangue, com acentuada preferência pelo sangue humano (Schreck *et al.* 1990; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Tauil 2001). Os comportamentos de hematofagia e antropofagia da fêmea do *Ae. aegypti* são muito importantes para a maturação de seus ovos. Embora possam ocasionalmente se alimentar com sangue antes da cópula, em seus ciclos reprodutivos, após cada oviposição, ficam famintas e respondem aos estímulos atrativos de um hospedeiro (Natal 2002), como o dióxido de carbono, liberado na respiração e o ácido lático e amônio, presentes no suor humano (Cabrini & Andrade 2006). Além disso, estímulos como a detecção de calor e umidade são fundamentais para a predileção do hospedeiro pela fêmea (Cabrini 2005).

Tradicionalmente, o *Ae. aegypti* era conhecido como “mosquito da febre amarela”, devido a sua importância como vetor da doença em seu ciclo urbano. Por este motivo, no Brasil, campanhas foram realizadas para que o mosquito fosse eliminado do país, a fim de erradicar a doença. E este propósito foi alcançado no ano de 1955. Entretanto, devido ao descuido com as medidas para erradicação do vetor de países vizinhos como as Guianas e a Venezuela, dentre

outros países sul-americanos, como também os Estados Unidos da América, Cuba e vários países centro-americanos, houve uma reinvasão da espécie no Brasil. Essa reinvasão ocorreu na cidade de Belém do Pará, no ano de 1967, no Rio de Janeiro, no ano de 1977 e em Roraima no início da década de 1980 (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Hoje, o mosquito é encontrado em todos os Estados brasileiros (Brasil 2022), e tem como nome popular “mosquito da dengue”, devido a sua íntima relação com o ciclo de transmissão deste arbovírus.

1.2.2. Ciclo de transmissão: patógeno, vetor e hospedeiro

O mosquito *Ae. aegypti* é considerado o vetor primário do DENV no Brasil (Gubler 1998). Seu caráter doméstico e antropofílico propicia o aumento das chances de contato com hospedeiros suscetíveis, sendo estas características de grande relevância para a dinâmica de transmissão do DENV (Lima-Camara *et al.* 2006). Para que o ciclo de transmissão deste arbovírus ocorra, dois atributos são importantes de serem entendidos: a competência e a capacidade do vetor. A capacidade vetorial nada mais é que a habilidade de uma população do vetor em transmitir determinado patógeno a um hospedeiro em condições naturais. Essa habilidade é determinada por um conjunto de fatores biológicos (genéticos e comportamentais), como a própria competência do vetor. Essa, por sua vez, está relacionada à susceptibilidade do vetor em se infectar pelo patógeno (infecção), ao PIE do patógeno - tempo, em dias, necessário para que o vírus chegue à glândula salivar do mosquito após uma alimentação infecciosa de sangue - (replicação) e a taxa de transmissão do agente etiológico (transmissão). Por isso, a competência vetorial tem relação direta com as barreiras anatômicas encontradas no organismo do vetor: barreira de infecção do intestino médio (MIB), barreira de escape do intestino médio (MEB) e barreira da glândula salivar (Fig. 10). O tempo de sobrevivência do vetor, a duração do PIE do vírus e a taxa de picadas estão intimamente relacionados, sendo de extrema importância para o ciclo de transmissão de uma arbovirose (Forattini 1992; Bennett 2002; Liu *et al.* 2017). Entretanto, tais fatores genéticos e comportamentais podem ser afetados de forma direta por fatores extrínsecos, como a densidade populacional desse vetor, a temperatura do ambiente, precipitação e a imunidade do hospedeiro (Kramer & Ebel 2003). Esses fatores em conjunto definem a associação entre o vetor, o patógeno e o hospedeiro vertebrado e, em última instância, irão regular o curso de uma epidemia (Beerntsen *et al.* 2000).

Com o contínuo aumento da densidade populacional que se vê em centros urbanos de áreas tropicais e subtropicais do mundo, propicia-se um ambiente de ecologia ideal para que o ciclo de transmissão de doenças virais, como a dengue, continue ocorrendo por meio do vetor

(Gubler 2011). Esse ciclo de transmissão ocorre quando uma fêmea de *Ae. aegypti* suscetível contrai o patógeno por meio do repasto sanguíneo que realizou em um humano virêmico. A replicação inicial do vírus acontece nas células epiteliais do intestino médio. Após, o vírus entra na cavidade do corpo do mosquito, conhecida como hemocele, por onde ocorre a disseminação para outros tecidos, inclusive para as glândulas salivares. O ciclo se completa quando o mosquito é capaz de eliminar o vírus pela sua saliva e a partir daí infectar o seu hospedeiro (Fig. 10) (Kramer & Ciota 2015). No caso do DENV, depois que a fêmea ingere o sangue contaminado deste hospedeiro, é necessário um PIE de 10 a 14 dias, para que o vírus se replique no corpo do mosquito e possa atingir a sua glândula salivar, para assim estar apto, por meio de um novo repasto sanguíneo, a infectar um novo hospedeiro suscetível (Watts *et al.* 1987; Woodring *et al.* 1996; Campanelli 2007; Salazar *et al.* 2007; Chan & Johansson 2012; Tjaden *et al.* 2013; Chaves *et al.* 2021).

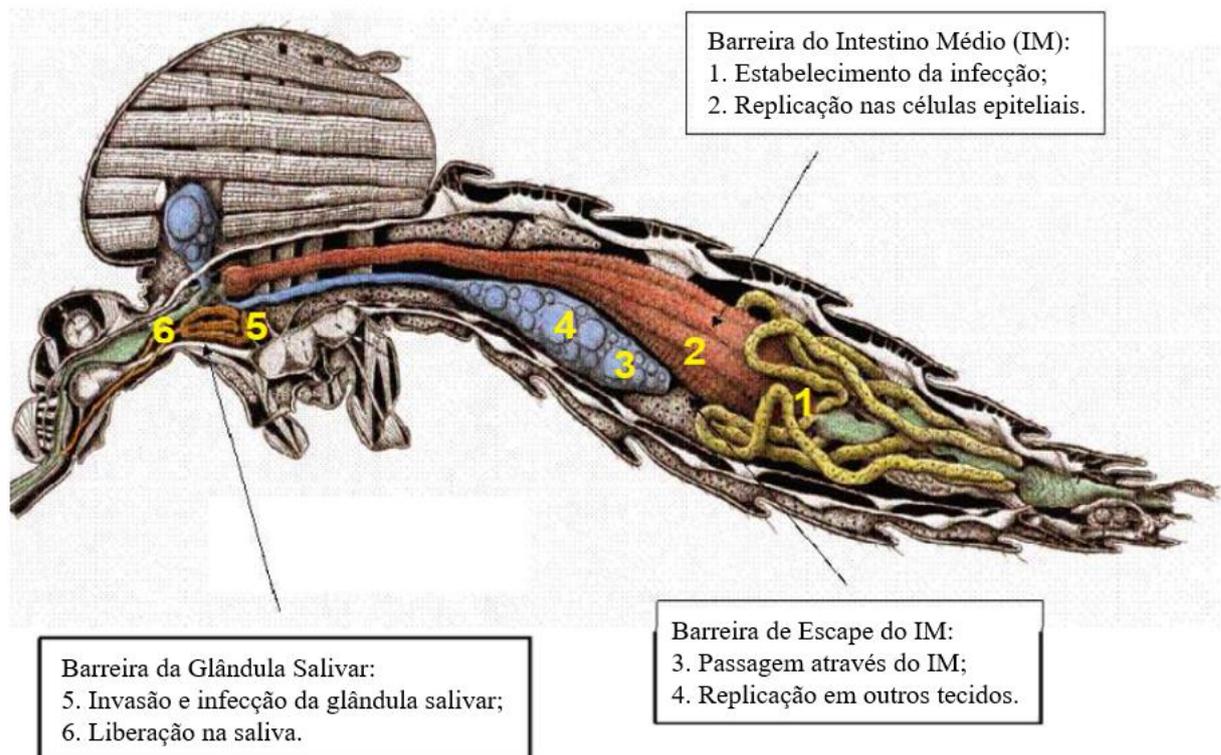


Figura 10: Barreiras anatômicas naturais presentes no corpo do mosquito *Ae. aegypti* à infecção/replicação do vírus no mesmo (IM = Intestino médio) e as etapas sequenciais para que a fêmea do mosquito seja competente para transmitir o vírus após o repasto sanguíneo em um humano virêmico: (1) Ingestão de sangue infectado com o agente etiológico em questão; (2) Infecção e multiplicação viral nas células da região do mesêntero; (3) Liberação de partículas virais das células epiteliais mesenteronais; (4) Amplificação secundária: o vírus infecta e amplifica nas células do corpo gorduroso; (5) Infecção e multiplicação nas células epiteliais da glândula salivar e em outros

tecidos; (6) Liberação do vírus da glândula salivar pela saliva, que é transmitido na próxima alimentação de sangue (Kramer & Ebel 2003). Fonte: Adaptado de Jobling & Lewis (1987).

Em geral, a fêmea do mosquito faz uma postura de ovos a cada repasto sanguíneo, período conhecido como ciclo gonotrófico. Entretanto, para a espécie *Ae. aegypti* ocorre o fenômeno chamado discordância gonotrófica, onde uma fêmea pode se alimentar mais de uma vez, na mesma ou em diferentes pessoas, para realizar uma única postura de ovos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Em temperatura satisfatória, esse intervalo entre a alimentação e a postura é de 3 dias. Quando a fêmea é perturbada, pela movimentação do hospedeiro, por exemplo, e não chega a estar totalmente ingurgitada - com abdômen cheio de sangue - ela tende a se alimentar mais de uma vez. Esse novo repasto sanguíneo pode ser realizado no mesmo ou em um outro indivíduo, o que por sua vez pode resultar em maior disseminação do vírus entre hospedeiros (Day *et al.* 1994; Funasa 2001). Essa é a principal e mais comum maneira de transmissão do DENV. Mais rara é a transmissão transovariana ou vertical, observada quando uma fêmea de *Ae. aegypti* infectada é capaz de transmitir o vírus a sua prole, não havendo a necessidade da presença de um hospedeiro para que esse ciclo ocorra (Anderson & Rico-Hesse 2006; Valle *et al.* 2015).

A interação DENV-*Ae. aegypti* ocasiona mudanças químicas no corpo do vetor, com alterações na regulação e expressão de genes envolvidos em processos metabólicos e fisiológicos. Essas alterações, podem resultar, por exemplo, em aumento na atividade locomotora, redução da motivação e aumento da avidez para se alimentar de sangue, redução da sobrevivência e redução da fecundidade, e acabam por influenciar no comportamento, reprodução e sobrevivência desse mosquito (Lima-Camara *et al.* 2011; Maciel-de-Freitas *et al.* 2011; Maciel-de-Freitas *et al.* 2013; Tallon *et al.* 2020; Feitosa-Suntheimer *et al.* 2022). Dessa maneira, acredita-se que essas alterações desencadeadas pela infecção com o arbovírus afetem a capacidade vetorial e assim influenciem na dinâmica de transmissão do patógeno (Maciel-de-Freitas *et al.* 2011; Tallon *et al.* 2020).

Evitar que o ciclo de transmissão de arboviroses aconteça não é uma tarefa fácil. A própria capacidade de resistência dos ovos de *Ae. aegypti* à dessecação - processo de diapausa mencionada anteriormente – apresenta-se como um grande desafio para sua erradicação (Funasa 2001). Apesar de haver muita pesquisa nessa área, ainda não existe uma vacina que seja eficaz contra os 4 sorotipos do DENV, além de não haver tratamento específico para a doença (Tauil 2002; OPAS 2022). A transmissão se agrava na maioria dos casos devido a

situações como a proliferação de criadouros de larvas que são gerados pelo homem, por falta de cuidado com objetos em seus jardins, casas e apartamentos, lixo despejado em locais impróprios que podem servir como habitat para a deposição de ovos do mosquito. Além disso, as medidas de controle do vetor apresentam limitações que acabam por promover uma eficácia reduzida (Achee *et al.* 2015).

1.3 Vigilância entomológica

Nos dias atuais, vê-se um cenário de circulação de diversos vírus transmitidos pelo mesmo vetor urbano, o *Ae. aegypti*. Um grande desafio se estabelece na medida em que arboviroses com características clínicas iniciais podem ser confundidas e tendem a ocorrer juntas no mesmo espaço e na mesma época do ano. Além do alto nível endêmico da dengue e seu potencial para epidemias explosivas. Sendo assim, nunca foi tão importante a vigilância precoce e informada das arboviroses urbanas. No Brasil, nos dias atuais, a dengue é objeto dos maiores programas de saúde pública, que focam no controle do vetor (Teixeira *et al.* 1999, 2005; Bezerra *et al.* 2021), já que com a diminuição da densidade populacional do mosquito há menos chance de contato com humanos hospedeiros para transmissão do vírus (OPAS 2022).

Desde a epidemia de dengue de 1986, no Rio de Janeiro, que provocou a disseminação do DENV para regiões vizinhas, as ações de vigilância e controle do vetor se tornaram imprescindíveis no Brasil (Braga & Valle 2007; Zara *et al.* 2016). A vigilância entomológica desde então se mostrou de grande importância para ajudar a prever e detectar a ocorrência de focos de transmissão de arboviroses, como a dengue, possibilitando que haja uma otimização da implementação de medidas de controle. Porém, é necessário que esta ação ocorra de forma contínua, sempre observando e avaliando as características biológicas e ecológicas do vetor, o nível de interação deste com hospedeiros humanos e também animais reservatórios, e as condições ambientais/climáticas, para assim poder entender se há ou não mudanças no perfil do ciclo de transmissão da doença. É por meio da vigilância que as autoridades de saúde pública podem ser alertadas sobre potenciais áreas de risco para surtos. A partir disso, as medidas de prevenção e controle podem ser traçadas e implementadas (Gomes 2002). Em um cenário onde a vigilância entomológica não acontece de forma adequada, com a circulação já estabelecida de um vírus em uma região, as medidas de combate ao vetor e a vigilância epidemiológica da doença já não têm mais o efeito e resultado que se esperam (Teixeira *et al.* 1999).

Tradicionalmente, no Brasil, a vigilância entomológica para o mosquito *Ae. aegypti* se baseia em inspeções regulares em criadouros domésticos à procura de larvas e pupas do mosquito. A partir dessas inspeções, medidas de infestação como os índices Predial (IP) e Breteau (IB) são fornecidas e por meio desses dados busca-se intensificar as estratégias de controle nas áreas onde esses índices foram altos. Basicamente o IP calcula a porcentagem de imóveis positivos para larvas do mosquito em relação ao número total de imóveis analisados e o IB calcula o número de criadouros positivos para larvas por 100 casas analisadas. Leandro e colaboradores viram, entretanto, que índices baseados em amostragem de adultos, com o auxílio de armadilhas - Adultraps - obtiveram uma maior predição do que os índices baseados em amostragem de larvas, visto que a fase adulta do mosquito é a que ele atua como vetor, e possibilita a transmissão do vírus. Dessa maneira, índices qualitativos (positivo ou não) e também quantitativos (quantidade de mosquitos adultos encontrados) podem ser gerados e com a implementação dessas armadilhas para adultos em um ambiente que seja endêmico para dengue, por exemplo, há, provavelmente, o fornecimento de informações bem mais relevantes sobre a dinâmica de espaço e tempo do *Ae. aegypti* (Ferreira & Neto 2007; Leandro *et al.* 2022).

1.4 Controle do vetor

Dentre as ações que podem ser feitas após a realização de uma vigilância eficiente - que aponte os “*hot-spots*” de transmissão da dengue - estão as estratégias de controle vetorial, que são implementadas com o objetivo de diminuir a densidade do mosquito *Ae. aegypti* nessas determinadas áreas (Dzul-Manzanilla *et al.* 2021; Leandro *et al.* 2022). Todas essas estratégias possuem pontos positivos e negativos e por isso devem ser muito bem avaliadas antes de serem colocadas em prática pela gestão de saúde. O controle mecânico é uma das estratégias mais antigas realizada no Brasil, desde o século XX, devido ao intenso combate ao *Ae. aegypti* feito de maneira sistemática com o intuito de reduzir/zerar o número de casos de febre amarela urbana, que estavam em alta (Zara *et al.* 2016). Ele pode ser caracterizado como a ação de remover ou alterar a posição ou estrutura de recipientes, como vasos, garrafas e potes, encontrados nas áreas de intra e peridomicílio, que sejam potenciais criadouros de mosquitos, devido à sua condição de acumular água. Esse controle geralmente é realizado por profissionais da área, que realizam visitas rotineiras, e por meio dessas orientam, motivam e educam os moradores de forma adequada, a fim de prevenir que naquele local haja focos para o desenvolvimento do vetor. O controle mecânico é simples e eficiente quando feito

adequadamente, embora requer disciplina a médio-longo prazo para que se perpetuem seus benefícios relacionados à diminuição de sítios de oviposição do *Ae. aegypti* (Funasa 2001; Taveira *et al.* 2001).

O controle químico, como o próprio nome já diz, necessita do uso de produtos químicos para reduzir a população do vetor. Podem ser neurotóxicos, análogos de hormônio juvenil e inibidores de síntese de quitina. Recomenda-se seu uso de forma racional e seguro para o meio ambiente e para a população. É de fundamental importância que sirva de complemento às ações de vigilância e manejo ambiental, pois as chances de haver a seleção de vetores resistentes aos produtos utilizados são altas e reais (Zara *et al.* 2016). Inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides têm sido empregados em diversos locais do mundo para o controle de mosquitos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Funasa 2001; Braga & Valle 2007). O uso de larvicidas - químicos ou biológicos - é realizado no tratamento focal em depósitos que são positivos para as formas imaturas do vetor e que não podem ser eliminados pelo controle mecânico. Os adulticidas - de ação residual - são usados no tratamento perifocal, aplicados nas paredes externas dos criadouros que se encontram em pontos estratégicos - áreas recém infestadas -, como medida complementar ao tratamento focal. O tratamento de aspersão aeroespacial de inseticidas em ultra baixo volume (UBV) também tem como intuito eliminar a forma alada do *Ae. aegypti*, mas deve ser aplicado para bloqueio da transmissão e para controle de surtos ou epidemias, apenas (Zara *et al.* 2016).

A resistência de populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas em uso é uma discussão importante que vêm ocorrendo. O Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) ao longo dos anos promove a substituição dos inseticidas. Monitorar a susceptibilidade do vetor a inseticidas em diferentes áreas do país é fundamental, pois assim, amplia-se o conhecimento sobre os mecanismos de resistência do mesmo e sobre quais medidas precisam ser tomadas em relação ao controle (Maciel-de-Freitas *et al.* 2014; Zara *et al.* 2016). Atualmente, em relação ao controle químico, o que vêm sendo aplicado é Clotianidina 50% mais Deltametrina 6.5%, para o tratamento residual em borracharias e ferros velhos, por exemplo, que atendem como pontos estratégicos e para aplicação espacial (UBV), Imidacloprida 3% mais Praetrina 0,75% (Brasil 2022).

Outro tipo de controle é o controle biológico de vetores que se baseia na utilização de predadores ou patógenos com potencial para reduzir a população do vetor. Dentre os controles aqui já mencionados, este entra como o mais “*eco-friendly*”. Organismos capazes de parasitar

ou predação de mosquitos, em qualquer uma de suas fases evolutivas, vêm sendo estudados há tempo. Entre os predadores de larvas de mosquitos, por exemplo, estão os peixes, rotíferos, celenterados, platelmintos, moluscos, anelídeos, crustáceos, aracnídeos e até mesmo outros insetos. Mas a lista não termina aí. Vírus, *Rickettsia*, bactérias, protozoários e fungos também são potenciais organismos controladores de mosquitos. Devido à resistência de algumas espécies de mosquitos observada por conta do uso do controle químico com inseticidas, o controle biológico ganhou grande destaque (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Zara *et al.* 2016).

Existem outras estratégias de controle, como a utilização de mosquitos transgênicos, mosquitos irradiados e o emprego da bactéria *Wolbachia*. Esta última estratégia de grande sucesso nos dias atuais, consiste na liberação de *Ae. aegypti* com o endossimbionte *Wolbachia* na natureza para que se reproduzam com os mosquitos da mesma espécie já ali presentes, estabelecendo uma nova população destes mosquitos, todos com a bactéria. A *Wolbachia* no mosquito faz com que os vírus da dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana não se desenvolvam dentro dele, contribuindo para diminuição da transmissão destas arboviroses. Ao decorrer do tempo, a quantidade de mosquitos que carregam a *Wolbachia* tende a crescer, até que se estabilize e não haja a necessidade de novas liberações, fazendo com que seja um método autossustentável (Zara *et al.* 2016; WMP 2022).

Contudo, o uso dessas estratégias mencionadas até aqui, de forma isolada ou então sem o estudo adequado da situação que se encontram as diferentes regiões afetadas por essas doenças, acaba sendo insuficiente para impactar na redução do número de casos. Com exceção da febre amarela - que possui vacina eficaz - o controle de doenças virais transmitidas pelo *Ae. aegypti* se baseiam em estratégias, que muitas vezes, se mostram limitadas. Muito se estuda sobre novas técnicas e métodos biológicos, genéticos e químicos, além de vacinas, medicamentos antivirais, anticorpos terapêuticos e biomarcadores para essas doenças, visando a melhora do cenário (Wilder-Smith 2020). Atualmente o que se mostra de mais promissor no controle de vetores são estratégias que ocorram de maneira integrada.

1.5 Vigilância Integrada

A Vigilância Integrada (VI) é uma estratégia racional e multifacetada que tem como princípio a integração do social e da gestão ambiental com as vigilâncias epidemiológica e

entomoviroológica. A vigilância epidemiológica envolve ações sistemáticas e ativas, que incluem a coleta, a análise e a interpretação de fatores determinantes e condicionantes na ocorrência de uma doença, a fim de prevenir ou controlar a mesma. A vigilância entomoviroológica, por sua vez, envolve a captura do vetor para obtenção de dados como a densidade populacional do mosquito e também para a detecção de infecção natural por arbovírus, por meio de técnicas moleculares sensíveis. Por meio dessa ação que busca unir as variadas estratégias existentes, acredita-se que se alcance o controle da dengue de maneira econômica e ecológica, utilizando os esforços da comunidade local em conjunto com os setores público e privado. Esse tipo de vigilância já é bem visado e discutido para o controle de malária, entretanto sabe-se que é preciso que haja o devido investimento financeiro na mesma. Entretanto, é importante que o governo dos países acometidos por essas arboviroses busquem se estruturar de alguma forma, para assim conseguirem orientar e promover essa abordagem (Maciel-de-Freitas *et al.* 2012; Mutero *et al.* 2012; Mustafa *et al.* 2015; Leandro *et al.* 2022).

Leandro e colaboradores realizaram um estudo recente que comprova a eficácia de uma vigilância realizada de forma integrada no Brasil. Para isso, desenvolveram um sistema de vigilância integrada em toda a cidade de Foz do Iguaçu, com o objetivo de combinar dados entomológicos, epidemiológicos e também entomoviroológicos, coletados por 4 anos. Segundo a pesquisa, os índices entomológicos usados atualmente – com base na densidade larvar – mostraram uma relação ruim com a transmissão da dengue ou então nenhuma relação. Já a captura de adultos em armadilhas do tipo Adultrap obteve uma efetividade maior em relação à previsão de surtos de dengue, prevendo-os em 4 semanas após a elaboração de índices de infestação baseados na contagem e identificação de mosquitos adultos. Para a análise dos resultados fizeram a adoção de recursos tecnológicos que são de fácil acesso, permitindo assim que o modelo desenvolvido possa ser replicado em outras áreas afetadas por arboviroses (Leandro *et al.* 2022). Outro exemplo, que visa a melhoria da coleta de dados por meio de ações integradas, é a própria confecção dos Boletins Epidemiológicos no Brasil. O Ministério da Saúde vem promovendo ações de forma conjunta entre a vigilância epidemiológica, a atenção primária e a rede especializada, buscando priorizar a coleta de amostras de pacientes ainda na fase aguda da dengue. Assim, há o aumento de exames direcionados aos métodos de diagnóstico atuais, e por consequência, o aumento do percentual de identificação dos sorotipos de DENV circulantes no país (Brasil 2022).

1.5.1 Vigilância virológica e entomoviológica

A detecção da chegada de um vírus em determinado local não é uma tarefa fácil. Envolve o trabalho conjunto de profissionais de saúde e pesquisadores atentos às mudanças no perfil das doenças. No Brasil, ainda nos dias de hoje, há o predomínio do uso de métodos indiretos, como os testes sorológicos, em relação aos métodos diretos, que envolvem biologia molecular e isolamento viral, para o diagnóstico de infecção por arbovírus em humanos. Visto o cenário de endemias que se enfrenta no país, de múltiplas arboviroses que circulam de forma simultânea, a possibilidade de reações cruzadas se torna algo real e mais comum do que se imagina, levando a uma maior dificuldade na interpretação dos resultados. Dessa maneira, muitos casos ficam como inconclusivos ou insuficientes para a confirmação e/ou descarte do diagnóstico, gerando um grande atraso no levantamento de dados epidemiológicos (Nunes *et al.* 2019; Brasil 2022).

A vigilância entomoviológica, que une a vigilância virológica com o inseto vetor, nada mais é que a detecção do arbovírus no mosquito, sendo uma ferramenta teoricamente eficaz para prever possíveis surtos e o local onde ocorrerão. Para isso, essa vigilância deve ocorrer de forma rotineira, a fim de direcionar as intervenções de controle para as áreas tidas como críticas, com o encontro de *Ae. aegypti* naturalmente infectadas, possibilitando que haja um controle do crescimento de casos humanos (Leandro *et al.* 2022)

1.6 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) como método padrão de diagnóstico parasitológico em mosquitos vetores

Uma das vantagens mais notáveis na área da biologia molecular foi a capacidade de isolar e identificar rapidamente novos patógenos. Dessa forma, sem dúvida, esta área se tornou uma grande aliada para lidar de forma mais efetiva com o cenário preocupante e ameaçador que as infecções emergentes proporcionam no mundo (Holmes 1998). O desenvolvimento do método de reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis na década de 1980 foi um outro grande avanço da área, sendo hoje considerada a técnica padrão para diversos diagnósticos laboratoriais no mundo (Mullis 1990; Hawkins & Guest 2017).

A semelhança no quadro de sinais e sintomas iniciais que as arboviroses apresentam gera uma grande dificuldade de se estabelecer um diagnóstico clínico diferencial das mesmas com base apenas nesses fatores. Por conta disso, torna-se indispensável a realização de um diagnóstico laboratorial, que proporcione uma alta sensibilidade e especificidade, gerando um resultado confiável. Até mesmo porque muitas dessas doenças podem progredir para casos com complicações após a infecção com o vírus, como o DENV e o ZIKV, que podem evoluir para febre hemorrágica, e microcefalia e síndrome de Guillain-Barré, respectivamente. Sendo assim, a diferenciação entre os arbovírus e o diagnóstico correto são de extrema importância para que haja o acompanhamento médico adequado do paciente a fim de evitar as complicações citadas, bem como para auxiliar na tomada de medidas preventivas para a não proliferação da doença por meio da notificação de casos em determinada localidade (Licínio & Ayres 2021).

Atualmente, o diagnóstico laboratorial para as arboviroses pode ser feito de forma indireta por meio da análise de anticorpos no sangue do paciente contaminado, pelo ensaio de imun absorção enzimática (Elisa) ou de forma direta, por meio da análise do patógeno no sangue e/ou outros fluidos corporais pela técnica de transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Licínio & Ayres 2021). A primeira técnica, apesar de ser mais comum no cotidiano dos laboratórios, tende a gerar muitos resultados errôneos devido às reações cruzadas que podem ocorrer entre os arbovírus (Romeiro *et al.* 2016). Por isso, a técnica mais utilizada para o diagnóstico de dengue, assim como de outras arboviroses, é a RT-PCR, capaz de identificar o patógeno na amostra escolhida nos estágios iniciais da doença (Hu *et al.* 2015). Várias amostras biológicas podem ser usadas para testar o diagnóstico de infecção, como urina, sêmen, líquido amniótico, saliva, sangue total, soro e plasma (Licínio & Ayres 2021).

A RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), proporciona, de forma simultânea, a detecção e a quantificação do material genético a ser testado, de maneira sensível e específica. Isso faz com que o processo ocorra de forma mais rápida em comparação a uma PCR tradicional, e também diminui as chances de uma contaminação cruzada, como no Elisa (Arya *et al.* 2005). A especificidade da PCR está relacionada de forma direta à escolha da região a ser amplificada. É importante que o segmento de DNA/RNA alvo caracterize o organismo em particular ou grupo de espécies selecionadas. O sucesso da reação se dá justamente pelo conhecimento da sequência nucleotídica que se quer amplificar (Sousa *et al.* 2020).

Além da técnica RT-qPCR ser utilizada em humanos, seu uso na vigilância virológica do vetor tem se intensificado nos últimos anos, permitindo a detecção de mosquitos infectados

com o DENV e a diferenciação de seus sorotipos (Costa *et al.* 2009; Maciel-de-Freitas *et al.* 2011; Leandro *et al.* 2020; Wijesingue *et al.* 2021). Um estudo de Ayllón e colaboradores (2017), por meio da PCR conseguiu detectar a presença do ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti* coletados no Rio de Janeiro, antes mesmo do primeiro caso autóctone da doença ser diagnosticado na cidade (Calvet *et al.* 2016; Ayllón *et al.* 2017). Porém, a mesma requer um corpo técnico qualificado e sua implementação em larga escala pressupõe alto custo na compra de insumos para processar um grande número de amostras, necessários para programas de vigilância entomoviológica (Gu & Novak 2004). Em países desenvolvidos, a RT-qPCR é comumente utilizada em exames de rotina para diagnóstico de dengue, mas no Brasil não. Justamente devido ao seu alto custo, geralmente é realizada apenas em laboratórios de referência. No Brasil e também em outros países emergentes que enfrentam a alta incidência de casos de dengue, o número alto de pacientes infectados representa despesas econômicas muito altas para o país (Sousa *et al.* 2020). Ademais, para ser um indicador sensível que possa se tornar um sinal de alerta para ações de vigilância, é necessário rapidez na entrega do resultado final. Tendo isso posto, a RT-qPCR não parece ser a melhor técnica para este fim, em comparação com a técnica a ser descrita a seguir, que será utilizada neste projeto.

1.7 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (Near-infrared Spectroscopy - NIRS)

A radiação infravermelha foi descoberta pelo músico e astrônomo William Herschel, no ano de 1800. Por meio de um experimento, Herschel percebeu que havia dispersão de ondas eletromagnéticas para além da faixa visível do espectro da luz, mais especificamente para além da região de cor vermelha visível. Esta radiação pode ser observada por termômetros de bulbo enegrecido e prismas de vidro, onde constatou-se que a temperatura continuava a aumentar. A essa região, Herschel chamou de “raios caloríficos”. Depois de algum tempo, esta região passou a ser denominada de infravermelho (Pasquini 2003).

A região do infravermelho é dividida em 3 regiões: infravermelho próximo (NIR), médio (MIR) e distante (FIR). Apesar de ter sido detectada após a radiação NIR, a espectroscopia no infravermelho médio (MIRS) foi bem mais aceita pelos espectroscopistas, e por isso ganhou mais força para que fossem realizados constantes avanços teóricos e instrumentais na mesma. A espectroscopia NIR, por sua vez, foi negligenciada por muito

tempo. Os pesquisadores não conseguiam encontrar informações atrativas adicionais naquela região espectral, devido a difícil interpretação, na qual os espectros eram constituídos por várias bandas de absorção fortemente sobrepostas, amplas e fracas (Pasquini 2003, 2018; Goh *et al.* 2021). Foram necessários anos para que a técnica fosse de fato aprimorada e utilizada. Somente na década de 1960 que ocorreram grandes desenvolvimentos com a tecnologia NIRS, permitindo sua aplicação em diversos campos (Prieto *et al.* 2017). Trabalhos pioneiros na análise da região espectral NIR foram desenvolvidos desde o ano de 1938, quando foi descrita a determinação de água em gelatina, onde sua absorção se mostrou mais forte na região NIR. A partir dos trabalhos de Karl Norris, com a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), que aplicou a técnica para análise rápida do teor de umidade, proteína e gordura de uma ampla gama de produtos agrícolas e alimentícios, vários estudos foram surgindo com a utilização da técnica (Pasquini 2003, 2018; Santos *et al.* 2013). No Brasil, a primeira contribuição da espectroscopia NIR relatada ocorreu no ano de 1991 em uma instituição de pesquisa, em um estudo que expôs a presença do esteviosídeo, um adoçante natural, nas folhas de uma planta nativa da América do Sul (Pasquini 2003).

A espectroscopia NIR é um método de análise química que se baseia em luz, especificamente no comprimento de onda de 750 a 2.500 nm (frequências de 14.000 a 4.000 cm^{-1}) (Burns & Ciurczak 2007; Prieto *et al.* 2017; Goh *et al.* 2021). A radiação infravermelha gera um espectro que reflete a composição química da amostra, segundo as características de seus grupos funcionais (Burns & Ciurczak 2007). Os espectros NIR incluem bandas largas que aparecem devido a absorção de comprimentos de onda que estão sobrepostos. As absorções medidas por espectroscopia NIR correspondem principalmente a sobretons e combinações de modos vibracionais envolvendo ligações químicas C – H, O – H, N – H e S – H. Moléculas que têm em sua composição estes átomos relativamente pesados, vibram em frequências que absorvem luz na região NIR (Huang *et al.* 2008; Pasquini 2018). Felizmente, muitos materiais orgânicos, presentes em diversas amostras biológicas, como água, amido, proteína, óleo, gordura, e celulose, podem ser identificados, fazendo com que esta ferramenta seja eficiente para investigações relacionadas à composição de amostras biológicas (Pasquini 2003).

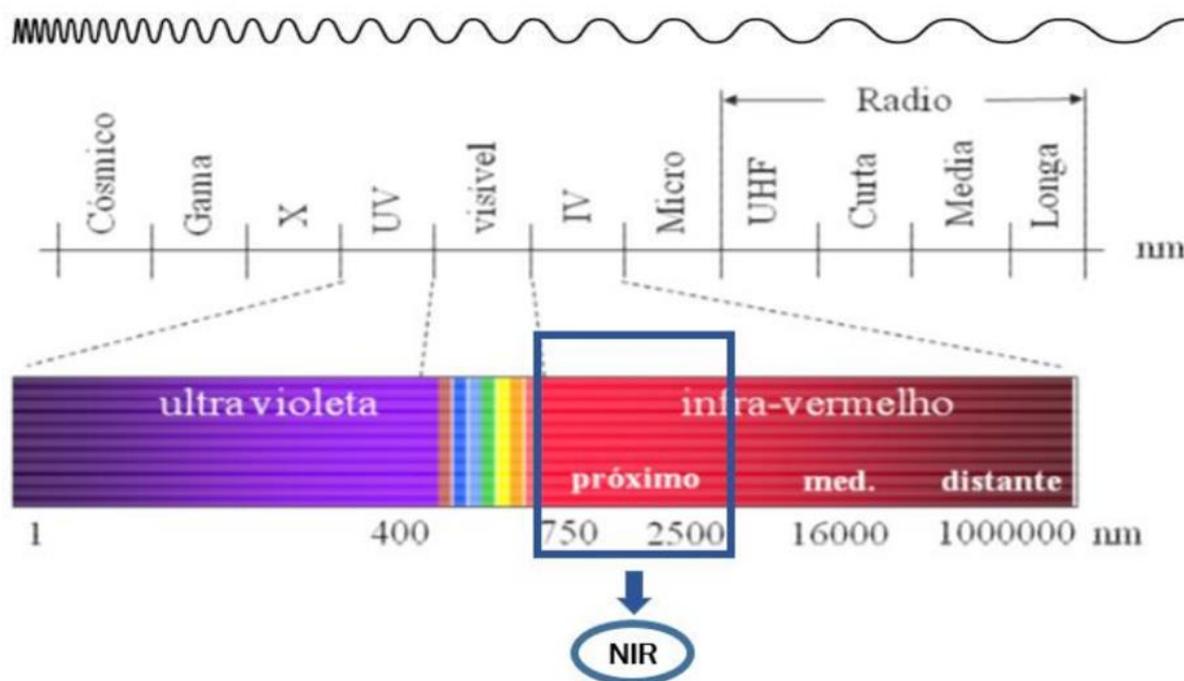


Figura 11: Espectro Eletromagnético indicando os intervalos/regiões das frequências de ondas eletromagnéticas existentes, como pode-se notar a região da radiação infravermelha logo após a região da cor vermelha visível na luz dispersa. Da esquerda para a direita há um aumento do comprimento de onda e uma diminuição da frequência. Fonte: Adaptado de Santos (2017).

Os espectros gerados por conta da absorção da radiação eletromagnética por ligações entre as moléculas nos comprimentos de onda na faixa NIR são únicos daquela determinada amostra. Por esse motivo, os espectros funcionam como uma espécie de “impressão digital” (Prieto *et al.* 2017). Sendo assim, a identificação de uma amostra por meio da NIRS é possível pela detecção do modo vibracional das moléculas referente a sobretons e bandas de combinação a partir da interação com a radiação eletromagnética. Esses modos estão associados, na maioria dos casos, a vibrações altamente anarmônicas, que podem ser por deformação axial (estiramento simétrico e assimétrico) ou por deformação angular (tesoura, torção, balanço, abano) (Fig. 12). A maior parte das moléculas, em sua temperatura ambiente, está em seu nível fundamental de energia vibracional. Átomos ou seus grupos se deslocam um em relação ao outro em uma frequência por meio das ligações químicas. Essa frequência é determinada pela sua massa e pela força da ligação entre os átomos envolvidos. A amplitude da vibração é expressa em nanômetros, que aumentam caso alguma energia seja transferida para a molécula (Pasquini 2003; Forato *et al.* 2010; Santos 2020).

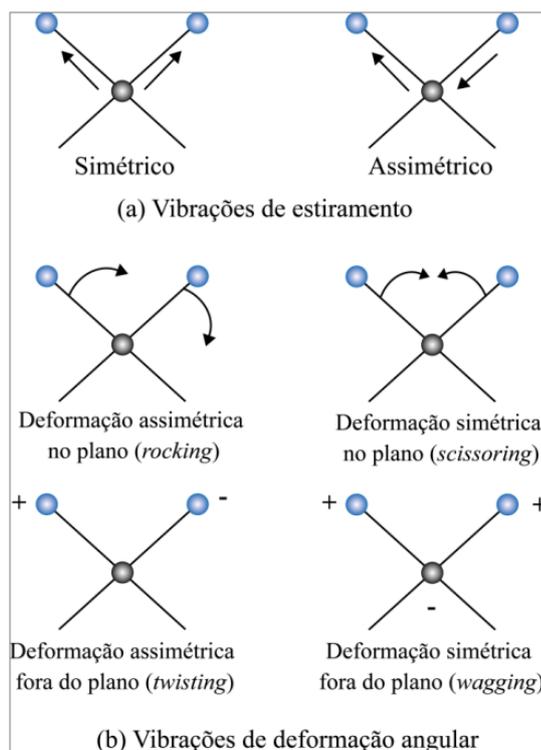


Figura 12: Representação de modos vibracionais gerados pelas ligações químicas de átomos presentes em moléculas: (a) Modo vibracional de estiramento; (b) Modo vibracional de deformação angular. Fonte: Adaptado de Skoog *et al.* (2009).

Quando os espectros são coletados, a radiação NIR interage com a amostra e a energia pode ser absorvida, transmitida ou refletida. Dessa maneira, diferentes modos de medição podem ser aplicados em espectroscopia NIR, de forma a atender diversos usos. Em suma, características da amostra escolhida que definirão a escolha do método de medição, como a amostra ser sólida ou líquida, sua translucidez e seu tamanho (Prieto *et al.* 2017).

A NIRS é considerada uma ferramenta rápida (1 minuto ou menos por amostra), não-invasiva, que não necessita de reagentes para sua operação além de ser “eco-friendly”, por não gerar resíduos laboratoriais (Pasquini 2003; Prieto *et al.* 2017), que vem crescendo, de forma popular, em muitas áreas em todo o mundo. Apesar da maioria das aplicações estar relacionada à avaliação da qualidade de alimentos, qualquer matriz pode ser analisada por meio desta técnica analítica (Johnson & Naiker 2019). Há décadas a espectroscopia NIR é usada em áreas como agricultura, produtos farmacêuticos e medicina (Burns & Ciurczak 2007; Roggo *et al.* 2007; Bale *et al.* 2016; Fernandes *et al.* 2018). A aplicabilidade da técnica é ampla e diversa, e tende a crescer cada vez mais.

1.7.1 Aplicações na área entomológica e entomoviológica

Segundo uma revisão feita por Johnson & Naiker, em 2019, o uso da NIRS na área da entomologia é visto como um método promissor, por se tratar de uma tecnologia que obtém um rápido progresso, conforme mais pesquisas vêm sendo realizadas, com a utilização de metodologias de análises de dados cada vez mais robustas (Johnson & Naiker 2019). A NIRS tem potencial de ser utilizada na vigilância e de aprimorar muitos aspectos dela. Muitos estudos no campo da entomologia já foram realizados e conseguiram demonstrar resultados favoráveis da técnica. Tem sido usada em entomologia médica para determinar a idade de Culicídeos (Reeves *et al.* 2010) e moscas domésticas (Perez-Mendoza *et al.* 2002), assim como na identificação taxonômica de espécies crípticas de vetores da malária na África (Mayagaya *et al.* 2009; Sikulu *et al.* 2010). Parâmetros como a idade de um mosquito vetor e sua sobrevivência são de fundamental importância para entender a sua relação com a capacidade vetorial. Uma técnica atual usada para determinar a idade de um mosquito é a dissecação paritária (determina se o mosquito já pôs ovos ou não), técnica esta demorada, tediosa e que necessita de treinamento, fazendo com que uma pequena proporção de amostras seja dissecada por vez (Goh *et al.* 2021). Em *Ae. aegypti*, a NIRS já foi usada para prever a idade (Liebman *et al.* 2015; Sikulu-Lord *et al.* 2016) e a presença do endossimbionte *Wolbachia* (Sikulu-Lord *et al.* 2016). Tátilla-Ferreira e colaboradores recentemente mostraram em sua pesquisa uma precisão de 100% da espectroscopia NIR em prever a presença do protozoário *Trypanosoma cruzi* em barbeiros da espécie *Triatoma infestans* – vetor da doença de Chagas – nas regiões do intestino médio ou do reto, em laboratório. Trabalhos futuros pretendem demonstrar a capacidade da técnica para a mesma finalidade, mas com barbeiros de campo (Tátilla-Ferreira *et al.* 2021).

Em respeito aos arbovírus, um estudo de 2018 mostrou que a detecção de ZIKV em *Ae. aegypti* pela NIRS foi 18 vezes mais rápida e 110 vezes mais barata que a RT-qPCR. Por meio da análise dos espectros de NIR distinguiram mosquitos infectados por ZIKV de mosquitos não infectados com 92,5% de precisão (Fig. 13). Além disso, maior precisão de diagnóstico foi obtida no 7º dia pós infecção (dpi), o que sugere ser o momento em que os efeitos da infecção pelo ZIKV na química do mosquito são mais expressos. As maiores acurácias de predição dos espectros foram de cabeças/tóraxes (97.3%) dos mosquitos em comparação com os espectros do abdômen (88.8%) (Fernandes *et al.* 2018). Pode-se sugerir que a infecção por ZIKV promove uma alteração química mais acentuada na cabeça/tórax do que no abdômen dos mosquitos (Martins *et al.* 2021). No entanto, as precisões dos espectros encontradas nos abdomens (de

84,8 a 92,6%) indicam que o modelo também é eficiente para a detecção do vírus nesses tecidos do inseto (Fernandes *et al.* 2018).

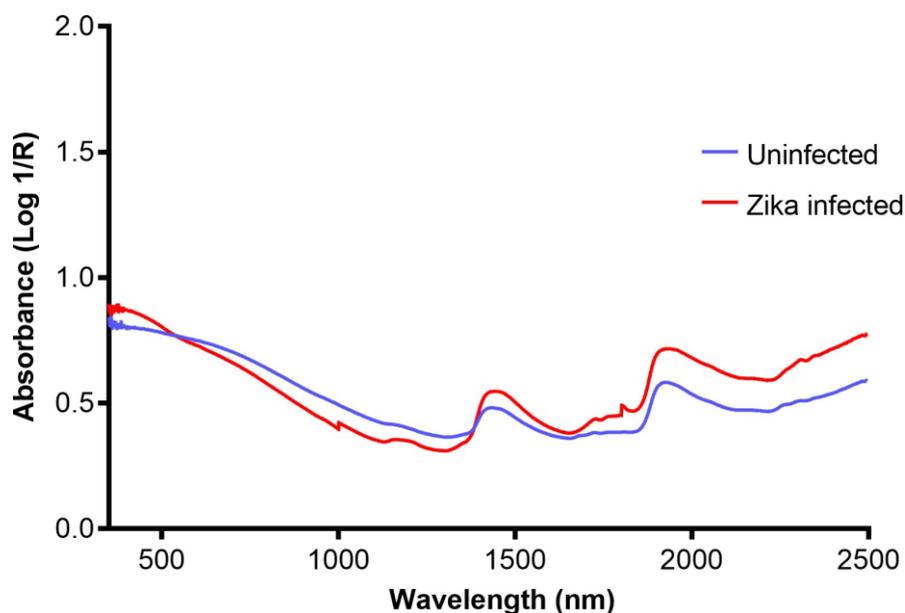


Figura 13: Espectros NIR médios na região de 350 a 2500 nm da região da cabeça/tórax de mosquitos *Ae. aegypti* infectados por ZIKV (linha vermelha) e não infectados (linha azul). Fonte: Fernandes *et al.* (2018).

Em outro estudo, do mesmo grupo, porém ainda não publicado, foi observada a capacidade da NIRS em diferenciar *Ae. aegypti* mono ou co-infectados com DENV e/ou ZIKV e não infectados (Fig. 14). O modelo de treinamento gerado foi capaz de diferenciar os mosquitos nos quatro grupos, com validação com 100% de acurácia (Garcia *et al.* 2022 submetido). Santos *et al.* (2021), também mostrou que a NIRS foi usada para detectar ZIKV e vírus chikungunya (CHIKV) em amostras deixadas em armadilhas BG Sentinela, simulando o que acontece em campo, no período de 7 dias com sensibilidade de 88,5% e 95,8%, respectivamente (Santos *et al.* 2021).

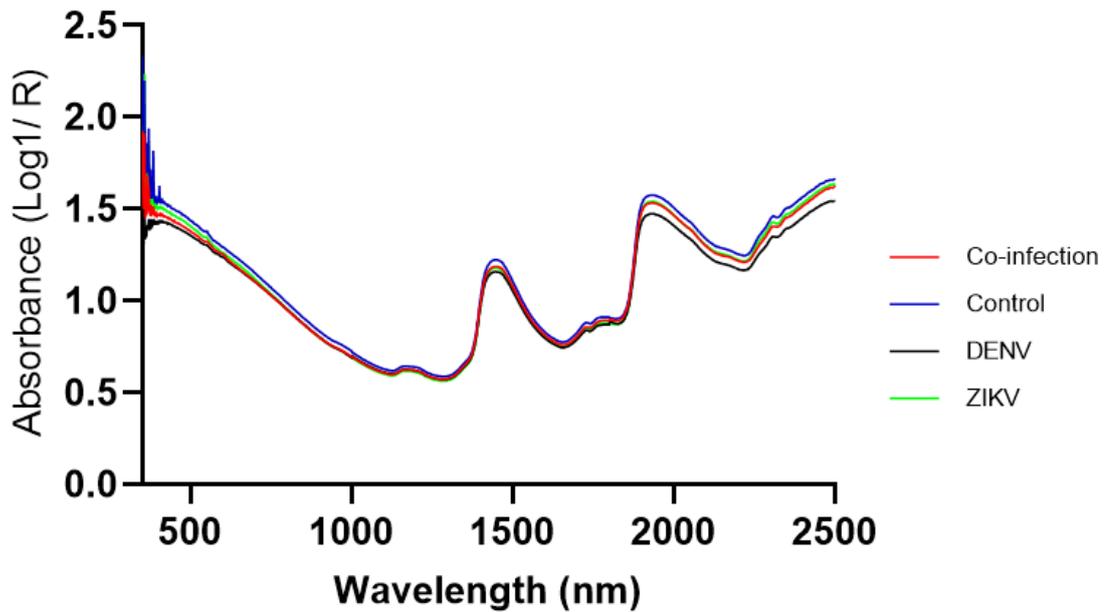


Figura 14: Gráfico que mostra os espectros brutos - referentes à absorvância e ao comprimento de onda - de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com ZIKV-, DENV-, co-infectados com ZIKV e DENV, e mosquitos da mesma espécie não infectados, coletados pelo espectrômetro Labspec 4i NIR. Fonte: Garcia *et al.* 2022 submetido.

Por meio da técnica NIRS decisões oportunas podem ser tomadas por conta da detecção rápida de doenças em potencial na natureza (Garcia *et al.* 2022 submetido). Porém, é sabido que para que este método se torne aplicável em campo algumas limitações precisam ser ultrapassadas. Há a necessidade do desenvolvimento de modelos de calibração robustos compatíveis com as condições reais de campo, o preparo das amostras para essa condição, além das múltiplas variáveis que existem em um ambiente natural, não controlado, que podem ter efeitos desconhecidos sobre as amostras. Por isso, a realização de mais estudos envolvendo a técnica é fundamental, para que essas desvantagens existentes possam ser entendidas e superadas. Goh e colaboradores, recentemente (2021), constataram essa necessidade de se testar a capacidade da NIRS em condições reais de campo, para que possa ser uma ferramenta de vigilância para vetores de malária e arbovírus, por exemplo. Segundo eles, é importante que a técnica seja aplicada em diversos cenários epidemiológicos para determinar sua precisão. Com visão otimista, reconhecem que ferramentas de diagnóstico como a NIRS, rápidas e econômicas, podem auxiliar de forma assertiva no combate à surtos atuais e futuros dessas doenças (Goh *et al.* 2021).

Prova disto é o estudo de Siria e colaboradores (2022), que mostra a possibilidade de um método de vigilância por meio de outra técnica espectroscópica, a MIRS (comprimento de ondas de 2.500 a 25.000 nm e frequências de 4.000 a 400 cm^{-1}). O modelo de aprendizagem

desenvolvido baseado na coleta de espectros da cutícula de mosquitos *Anopheles*, foi capaz de identificar de forma simultânea a espécie vetor da malária (*An. gambiae*, *An. arabiensis* e *An. coluzzii*) e sua faixa etária (1-4, 5-10 e 11-17 dias), utilizando populações de mosquitos de campo. Em um estudo anterior (2019), do mesmo grupo, houve a identificação desses fatores - espécie e estrutura etária - em vetores da malária africana por meio da mesma técnica, porém utilizando mosquitos criados sob condições controladas de laboratório. Um outro estudo anterior já havia conseguido o feito de identificar a classificação etária da espécie *An. gambiae*, por meio da NIRS, também utilizando mosquitos de laboratório. O uso de mosquitos coletados da natureza na pesquisa deste ano se mostra como um grande avanço para a técnica de infravermelho, indicando um caminho possível para o monitoramento da malária e também de arboviroses (Krajacich *et al.* 2017; González-Jiménez *et al.* 2019; Goh *et al.* 2021; Siria *et al.* 2022). Com o desenvolvimento de espectrômetros cada vez mais sensíveis e técnicas de análises quimiométricas mais robustas, a tendência é que o número de aplicações na área da entomologia (Johnson & Naiker 2019) e também da entomovirologia só continue a aumentar, proporcionando uma evolução nos diagnósticos rápidos das arboviroses, e consequentemente na ação da vigilância.

1.8 Justificativa

Sabe-se que a presença de vírus transmitidos por vetores constitui uma problemática para a Saúde Pública mundial, sendo mais comuns em países tropicais e subtropicais, como é o caso do Brasil. A dengue ainda nos dias de hoje apresenta altas taxas de incidência em diversos países da América, sendo a mais importante arbovirose que afeta o homem (OPAS 2022). Ter regiões que se encontram em situações precárias de saneamento e acesso a água, favorece a dispersão e o aumento da densidade das populações do mosquito vetor, o *Ae. aegypti*. Ademais sua complexidade aumenta devido a circulação simultânea dos 4 tipos de dengue, que promove o aumento do risco de casos graves e surtos. O combate ao vetor em seu formato atual, de certa maneira, não apresenta efetividade que iniba a circulação viral.

Dessa forma, é importante estabelecer estratégias que sejam de fato efetivas e que detectem rapidamente a infecção dos vetores pelos sorotipos de DENV, a fim de conhecer melhor a epidemiologia da dengue em qualquer região do mundo. Baseado nessa informação, poder-se-ia promover um mapeamento dos casos de interesse que seja rápido e eficaz,

permitindo a implementação de medidas de controle imediatamente após o diagnóstico da infecção nos mosquitos e orientada para onde houve o encontro deste mosquito naturalmente infectado. Os resultados obtidos em diversos estudos recentes que fizeram uso da técnica NIRS, apontam que ela pode ser uma ferramenta que se enquadre nesse perfil. Por meio dela há a possibilidade de detectar de forma precoce a circulação silenciosa do vírus na natureza, sendo de grande auxílio e utilidade para a vigilância entomoviológica de rotina, trazendo benefícios para a saúde pública, garantindo a implementação oportuna de medidas de prevenção e controle da dengue.

2. Objetivos gerais e específicos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a possibilidade de detecção e diferenciação dos sorotipos 1 e 4 do vírus dengue pelo método NIRS em mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas.

2.2 Objetivos específicos

a) Analisar se a técnica NIRS é eficiente para efetuar o diagnóstico diferencial dos sorotipos 1 e 4 do DENV;

b) Determinar a precisão da técnica NIRS nos espectros coletados de diferentes regiões do corpo dos mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas: cabeças/tóraxes e abdomens;

c) Determinar a precisão da técnica NIRS nos espectros coletados dos mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas em 2 diferentes PIE dos sorotipos do DENV: 10 e 14 dpi;

d) Determinar a precisão da técnica NIRS para classificação das fêmeas de *Ae. aegypti* de acordo com a carga viral.

3. Materiais e Métodos

3.1 Coleta e criação de mosquitos *Ae. aegypti*

Os ovos utilizados no estudo foram oriundos da população de mosquitos *Ae. aegypti* do bairro da Urca, na cidade do Rio de Janeiro ($22^{\circ}56'43''\text{S}$; $43^{\circ}09'42''\text{W}$) (Fig. 15). Para coleta desses mosquitos para posterior uso em ensaios no laboratório foram utilizadas ovitrampas, com 3 paletas por armadilha (Fig. 16a e 16b), a fim de maximizar o número de ovos coletados. Cada ovitrampa foi devidamente identificada (Fig. 16c). Estas foram distribuídas em áreas de peridomicílio de forma homogênea pelo local (Urca - RJ), a fim de representar a variabilidade genética da espécie na área. Após uma semana, as paletas das ovitrampas foram recolhidas e levadas para laboratório.

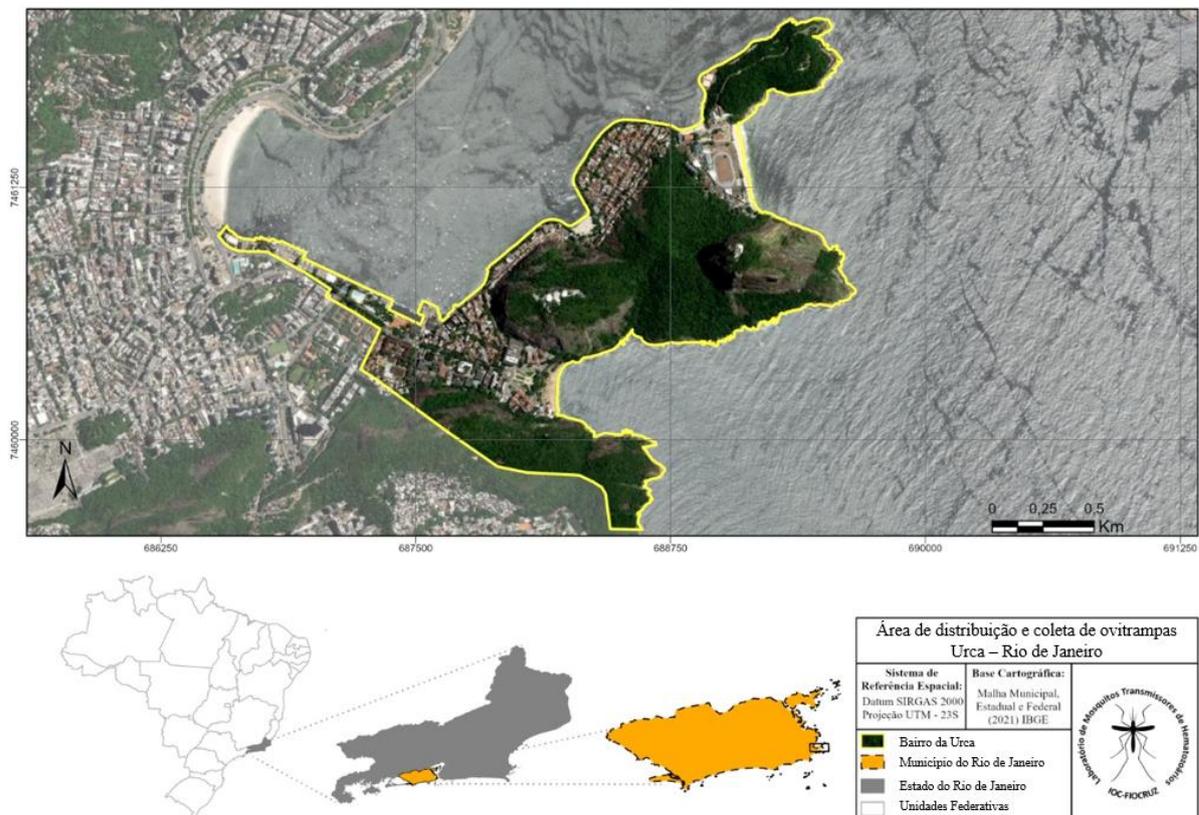


Figura 15: Mapa da localização da área de distribuição e coleta de ovitrampas pelo bairro da Urca, no Rio de Janeiro. Estado do Rio de Janeiro (em cinza); município do Rio de Janeiro (em laranja demarcado em linha preta tracejada); bairro da Urca [mapa principal com imagem de satélite; no município do RJ (em laranja), sua localização está identificada pelo quadrado demarcado em linha preta].

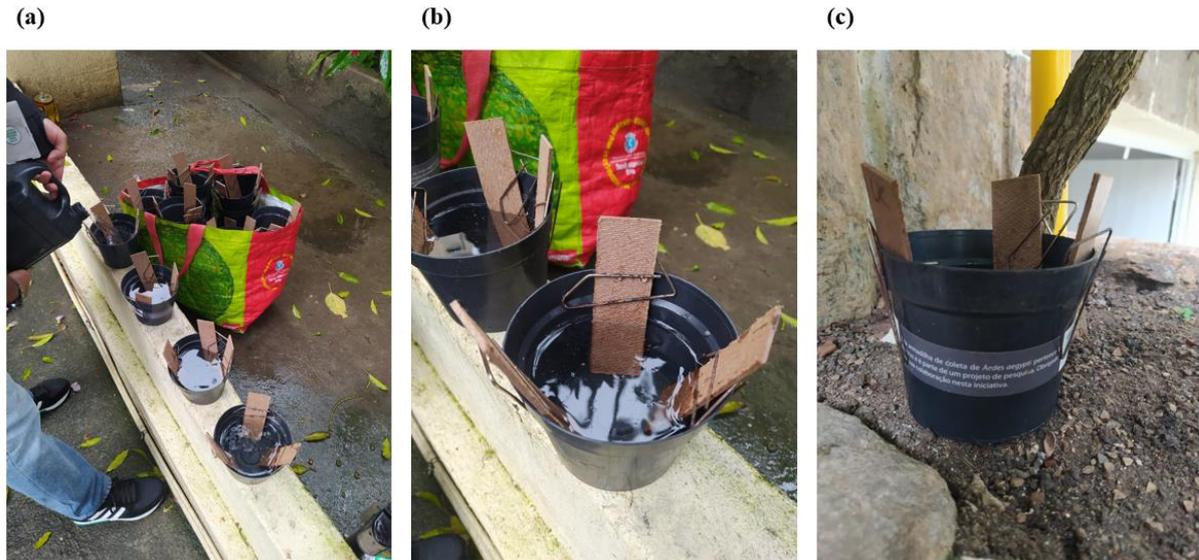


Figura 16: Distribuição das ovitrampas em campo: (a) Montagem das ovitrampas: paletas fixadas com pregadores no recipiente preto, com água até a sua metade; (b) Ovitrapas prontas para serem instaladas em área de peridomicílio, de forma homogênea, pelo bairro da Urca, RJ; (c) Ovitrapa devidamente identificada para que os moradores do bairro tenham ciência do que se trata e instalada em área de peridomicílio.

No insetário do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (Lathema), Pavilhão Carlos Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, os ovos obtidos das armadilhas foram eclodidos e as larvas criadas até atingirem a fase adulta. Na fase adulta foi feita a triagem da espécie do mosquito, visto que alguns ovos de *Ae. albopictus* podem ter sido coletados. Somente mosquitos da espécie *Ae. aegypti* foram triados e mantidos sob as seguintes condições: 27°C, 70% de umidade e 12:12 horas claro/escuro. Os ovos (geração F2), depositados em papel filtro (Fig. 17a), gerados a partir da geração F1 proveniente dos mosquitos adultos de campo (geração F0) foram contados, com auxílio da Lupa Estereoscópica Carl Zeiss, e postos para eclosão em bacias (45,5 cm x 28 cm x 7,7 cm). Em cada bacia foram colocados 3 litros de água filtrada (Fig. 17b) e 1 comprimido de levedo de cerveja (*Levedura de Cerveja Saccharomyces cerevisiae* Meyen - Probene). O comprimido de levedo serve como fonte alimentar nutritiva para as larvas que eclodiram dos ovos possam iniciar o seu desenvolvimento. Após cerca de 30 minutos, as larvas eclodem dos ovos (Fig. 17c). Elas, então, foram transferidas, com auxílio de pipeta de plástico, para novas bacias, com a mesma quantidade de água filtrada, com 500 larvas por bacia. A alimentação nesta etapa foi feita com a oferta de flocos triturados de TetraMin - 1 eppendorf de 2,0 ml cheio - (Tetra Melle) em dias alternados, para que as larvas pudessem completar seu desenvolvimento até a pupação, cerca de 7 dias após a eclosão. A troca de local é importante para delimitar um número máximo de larvas por bacia,

para que a quantidade de alimento ali presente seja suficiente e evite alta taxa de mortalidade, propiciando um padrão na criação e uma diminuição da competição entre as larvas. Todas as bacias utilizadas foram tampadas com uma rede de filó preto com elástico, para impedir que alguma fêmea adulta porventura escape de gaiolas (usadas para criação de mosquitos adultos) e realize a postura de seus ovos nestas bacias.

As pupas (Fig. 17c) foram transferidas para pequenos copos plásticos descartáveis (80ml) - cerca de 250 por copo - com água filtrada até 2/3 do copo. Estes recipientes com pupas em seu interior foram distribuídos para as gaiolas (40 cm × 40 cm × 30 cm) para emergência (Fig. 17d), onde em cada gaiola foram colocados cerca de 500 mosquitos. Os adultos que emergiram puderam acasalar por 5 a 6 dias e nesse período receberam como fonte alimentar 10% de solução açucarada *ad libitum* até 36 horas antes da infecção (Fernandes et al. 2018). Para isso, em cada gaiola foi colocada uma “mamadeira”: recipiente de vidro com um rolo fino de gaze e algodão dentro, para sugar a solução açucarada a 10% para que os mosquitos possam se alimentar a partir dali.

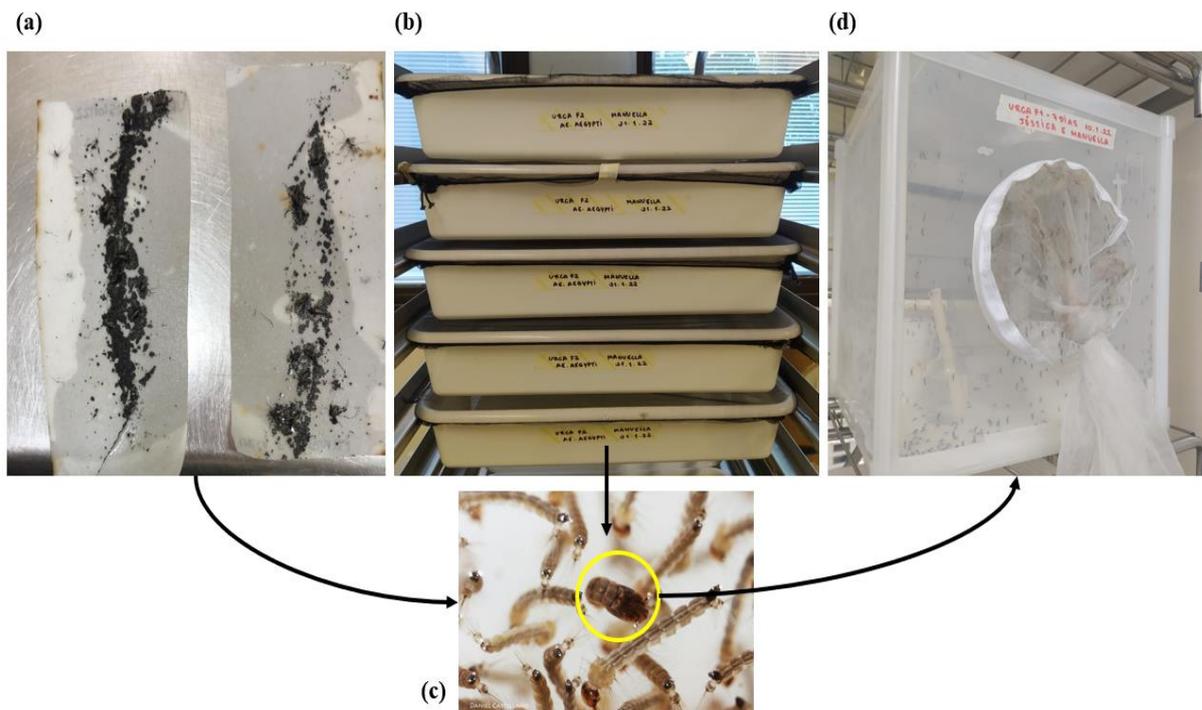


Figura 17: Etapas de criação dos mosquitos *Ae. aegypti* em laboratório: (a) Ovos (geração F2) de *Ae. aegypti* depositados em papel filtro; (b) bacias de plástico, devidamente identificadas e tampadas com rede de filó preto com elástico, onde foram colocadas as fitas de papel filtro com ovos; (c) larvas e pupa (circulada em amarelo), estágios posteriores de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*, em ordem; (d) as pupas foram separadas e colocadas em pequenos copinhos plásticos descartáveis dentro das gaiolas, para que os adultos pudessem emergir.

Dentro de cada gaiola havia uma “mamadeira” de solução açucarada a 10%. Fonte da Fig. 17c: foto de Daniel Castellano (ano desconhecido) retirada do site da BIOMAX MEP (2021).

3.2 Infecção experimental por DENV-1 e -4

Para o experimento de infecção viral, as fêmeas de *Ae. aegypti* foram separadas dos machos. Esta etapa foi feita por meio do Capturador Manual de Castro, pelo qual as fêmeas foram sugadas das gaiolas e transferidas para outras gaiolas (12 cm x 7 cm), com fundo móvel. Essas novas gaiolas são de plástico e construídas especialmente para a infecção dos mosquitos. Em cada uma delas foram colocadas 60-65 fêmeas de *Ae. aegypti* (Fig. 18a). A infecção das fêmeas de *Ae. aegypti* foi feita com a utilização de cepas virais brasileiras de DENV-1 e de DENV-4 armazenadas no estoque do Lathema: DENV1/*H. sapiens*/Brasil/MV09/2015 e DENV4/TVP/360. A alíquota da cepa do DENV-4 foi cedida pelo Laboratório de Flavivírus (Labfla) do IOC/Fiocruz, chefiado pela pesquisadora Ana Maria Bispo de Filippis, e é uma cepa de referência adaptada em laboratório (Kuczera *et al.* 2016). A cepa do DENV-1 foi isolada em soro humano coletado de pacientes sintomáticos da cidade de Contagem, em Minas Gerais, no ano de 2015 (Dutra 2017). Os isolados virais, então, foram mantidos e amplificados em culturas de células de *Ae. albopictus* C6/36 com meio de cultivo Leibovitz (L-15) com soro fetal bovino a 10%. Os títulos virais dos isolados selecionados foram quantificados via ensaio de imunofluorescência FFU (unidades de foco fluorescente) /ml e ensaio de plaqueamento PFU (unidades formadoras de placa) /ml, apresentando as cepas do DENV-1 e -4 titulação de 8×10^6 FFU/ml e 2×10^7 PFU/ml, respectivamente.

Foram realizados dois experimentos de infecção. Em cada ensaio, 1 ml de sobrenadante infectado com determinado sorotipo de DENV foi coletado da cultura, misturado com 1 ml de sangue humano (1:1), para infectar por via oral os mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas 5 a 7 dias após a emergência. Para isso, primeiramente foi feita a centrifugação do sangue, para separar o plasma dos outros componentes sólidos, na Centrífuga Rotofix 2800 por 5 vezes. A primeira centrifugação durou 10 minutos e as quatro restantes 5 minutos cada. Após cada centrifugação, o sangue foi lavado. Em cada lavagem, o plasma foi retirado com auxílio de uma pipeta de plástico e o volume retirado foi completado com a solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x. Essa etapa foi feita para que não houvesse risco de haver outra variável (que porventura estivesse no sangue) que pudesse interferir na alimentação e, conseqüentemente, na infecção

dos mosquitos. O sangue utilizado para os dois experimentos de infecção foi doado pelo Hospital Pedro Ernesto da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), mais detalhes no tópico 3.6.

A alimentação artificial ocorreu por meio de dois alimentadores artificiais PS6 Power Unit - Hemotek membrane feeding systems (Hemotek Ltd.) (Fig. 18b e 18c) por cerca de 30 minutos a 1 hora. Este alimentador simula a temperatura do corpo humano, aproximadamente 37°C, por meio de uma resistência que esquentava o sangue na temperatura desejada. Para cada experimento de infecção houve um grupo controle de mosquitos alimentados com o mesmo sangue, porém livre de vírus. Após o sangue (misturado com o vírus ou não) ser colocado nos bocais do alimentador artificial, para simular o tecido humano utilizou-se membranas de intestino de porco, que foram presas aos bocais por meio de um elástico próprio do Hemotek. Cada bocal, devidamente identificado, foi colocado em cima da gaiola de infecção da correspondência de seu grupo, na qual o fundo móvel foi empurrado para cima, para fazer com que os mosquitos ficassem mais próximos do sangue. Foram realizadas três rodadas de alimentação em cada Hemotek, onde na primeira e segunda rodadas foram utilizadas 12 gaiolas, e conseqüentemente 12 bocais, e na terceira rodada 4 gaiolas e 4 bocais. No total foram utilizadas 28 gaiolas de infecção.

Após a alimentação sanguínea das fêmeas dos três grupos (controle, DENV-1 e DENV-4), as gaiolas foram colocadas em um isopor com gelo, para que os mosquitos ficassem em estado de dormência e a triagem pudesse ser feita. Dentro de uma Cabine de Segurança Biológica Classe III Purified Micro Environments, as fêmeas foram retiradas da gaiola (uma gaiola de cada vez) e transferidas para uma placa de Petri de plástico descartável, que estava dentro de um isopor com gelo. Garantindo assim que as fêmeas não despertassem. As fêmeas visivelmente ingurgitadas foram separadas e colocadas dentro de gaiolas de papelão (10 cm x 9 cm) com auxílio de uma pinça (Fig. 18d e 18e). As gaiolas foram identificadas de acordo com seu grupo de infecção e em cada uma foram colocadas 30-35 fêmeas. As que não se alimentaram foram mortas amassadas em uma folha de papel e descartadas em saco de lixo de risco biológico. As gaiolas, então, foram armazenadas em caixas de plástico (35 cm x 25 cm x 17 cm), com 6 gaiolas por caixa, no máximo. Em cima de cada gaiola foi posto um pequeno chumaço de algodão (que coubesse dentro de uma tampa de plástico de garrafa) embebido em solução de sacarose a 10%, como fonte de carboidratos, envolvida com a tampinha de plástico, para que não evaporasse rapidamente. A troca do algodão foi feita em dias alternados. A fim de

manter uma boa umidade para os mosquitos foi colocado um pedaço de plástico por cima das gaiolas de modo que as cobrisse e, em cada caixa, um pano multiuso umedecido: uma extremidade do pano dentro da caixa e a outra extremidade dentro de um pote com água. Cada caixa foi identificada e armazenada dentro de uma estufa incubadora BOD (Fig. 18f), configurada sob as seguintes condições: $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 70% de umidade e 12:12 horas claro/escuro.

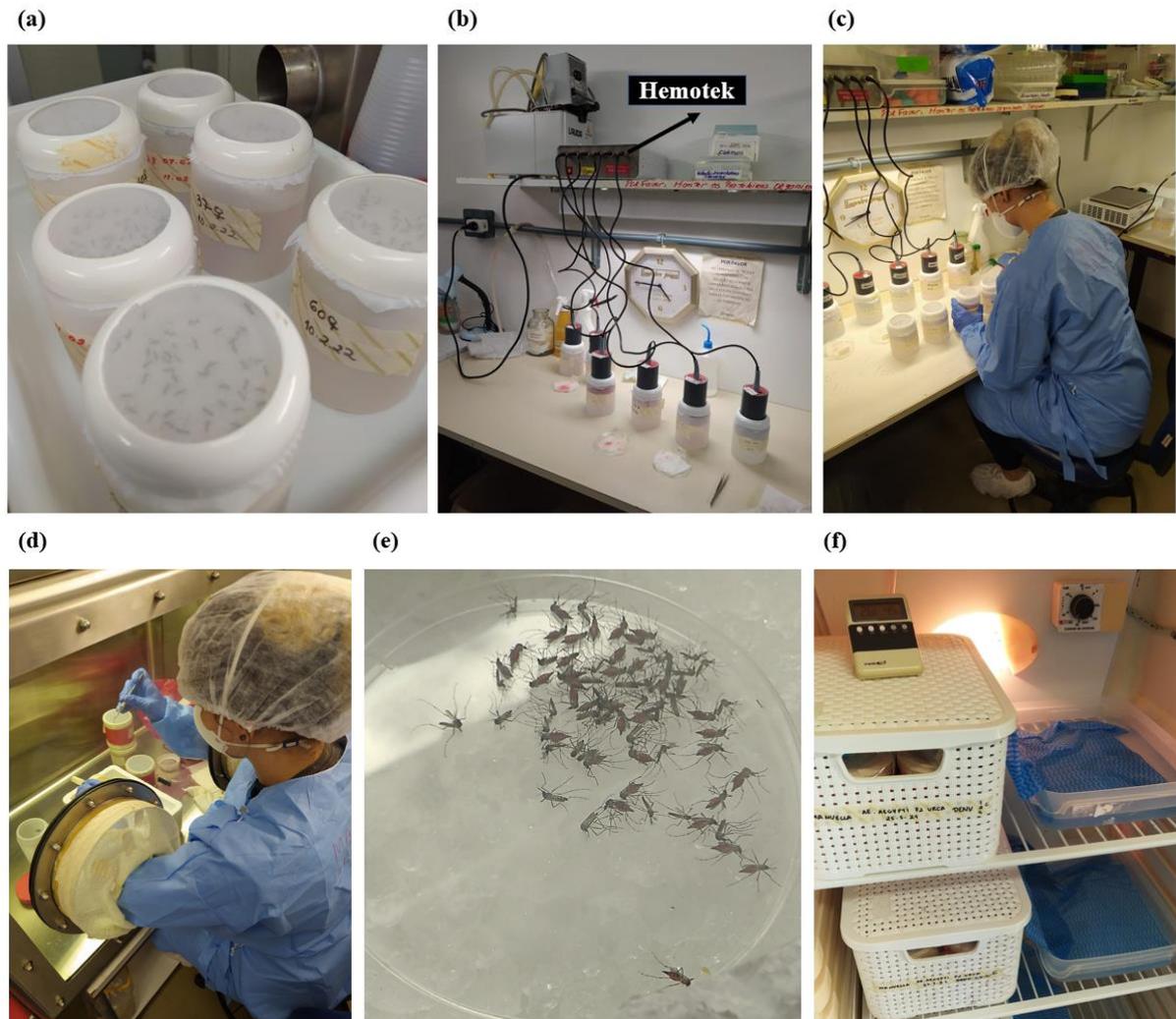


Figura 18: Etapas do experimento de infecção com DENV: (a) Gaiolas de plástico (12 cm x 7 cm) com fundo móvel levantado para facilitar a alimentação das fêmeas no experimento de infecção; (b) Alimentação artificial por meio do PS6 Power Unit - Hemotek membrane feeding systems, com seus bocais em cima das gaiolas, para que as fêmeas pudessem se alimentar por 30 minutos a 1 hora; (c) Conferindo se as fêmeas dentro das gaiolas estavam bem alimentadas; (d) Fazendo a triagem das fêmeas totalmente ingurgitadas dentro da Cabine de Segurança; (e) Fêmeas cheias de sangue em seus abdomens, em sua maioria, na placa de Petri, para serem triadas; (f) Gaiolas armazenadas em caixas devidamente identificadas, dentro da estufa incubadora BOD.

3.3 Coleta de espectros por NIRS

Nos dois experimentos de infecção, as fêmeas ingurgitadas, mantidas em gaiolas na estufa BOD foram coletadas para diagnóstico em 10 ou 14 dpi (Woodring *et al.* 1996; Campanelli 2007; Salazar *et al.* 2007; Chan & Johansson 2012; Tjaden *et al.* 2013; Chaves *et al.* 2021). Os mosquitos foram mortos pouco antes da análise pela NIRS, onde na região superior da gaiola em que estavam foi colocado um chumaço de algodão molhado com algumas gotas (5-10) de acetato de etila (éster simples muito volátil) e tampado/abafado com uma placa de Petri por cerca de 1-3 minutos, até que todos se encontrassem mortos. Depois da confirmação da morte das fêmeas, o filó da gaiola foi cortado com ajuda de um bisturi, e os mosquitos foram transferidos, por meio de um funil de papel, para tubos Falcon (um tubo para cada grupo). Em cada tubo havia uma bola de algodão e um pedaço de gaze no fundo molhados, também, com acetato de etila, para garantir que nenhum mosquito sobrevivesse (Fig. 19).

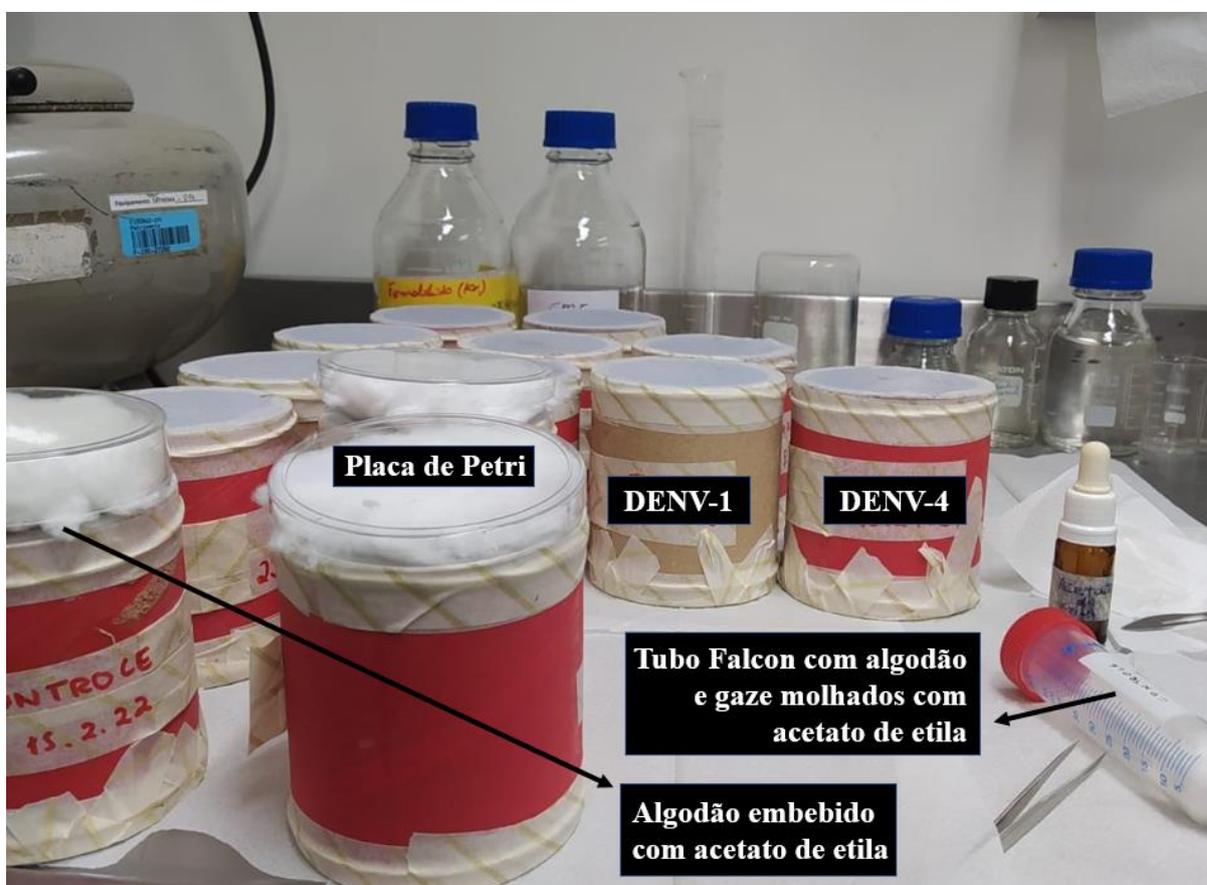


Figura 19: Processo pré-coleta de espectros NIR. Gaiolas devidamente identificadas com mosquitos de seus respectivos grupos (Controle, DENV-1 ou DENV-4) em seu interior. Para que os mosquitos fossem mortos para a coleta dos espectros NIR, foi colocado um chumaço de algodão, com algumas gotas de acetato de etila, na parte de cima das gaiolas. Como mostra a figura, esse algodão foi tampado/abafado com uma placa de Petri, para que o acetato não evaporasse. Depois de alguns minutos, com a confirmação da morte das fêmeas, o filó da gaiola era

cortado com auxílio de um bisturi, e os mosquitos transferidos, por meio de um funil de papel, para o tubo Falcon do seu respectivo grupo.

Os espectros foram coletados usando o espectrômetro LabSpec 4 i NIR (Malvern Panalytical) (Fig. 20a) com uma fonte de luz interna de 18,6 W e uma sonda de fibra óptica externa bifurcada com 3,2 mm de diâmetro, contendo 6 fibras ópticas de iluminação com 600 microns que circundam uma única fibra de coleta de 600 microns (Modelo 135325 Rev B, ASD Inc.). Este modelo de espectrômetro possui uma faixa de comprimento de onda de operação de 350-2500 nm. A coleta de espectros foi realizada usando o software RS³ (Malvern ASD Panalytical). A otimização e a calibração da referência branca foram realizadas no início da coleta dos espectros e novamente a cada 1 hora, escaneando um espaço vazio na placa espectral de 8 cm (Spectralon) (Fig. 20a). Os mosquitos, então, foram dispostos dorso-ventralmente no Spectralon, um substrato de refletância difusa (Fig. 20b e 20c). Os espectros dos mosquitos foram coletados a uma distância de aproximadamente 2 mm do centro da fonte de luz, apontando a sonda de fibra óptica para a região do corpo escolhida, cabeça/tórax ou abdômen, por aproximadamente 3 a 5 segundos. Foi feita a coleta de um espectro por parte do corpo para cada mosquito (Mayagaya *et al.* 2009; Santos *et al.* 2021; Goh *et al.* 2022).

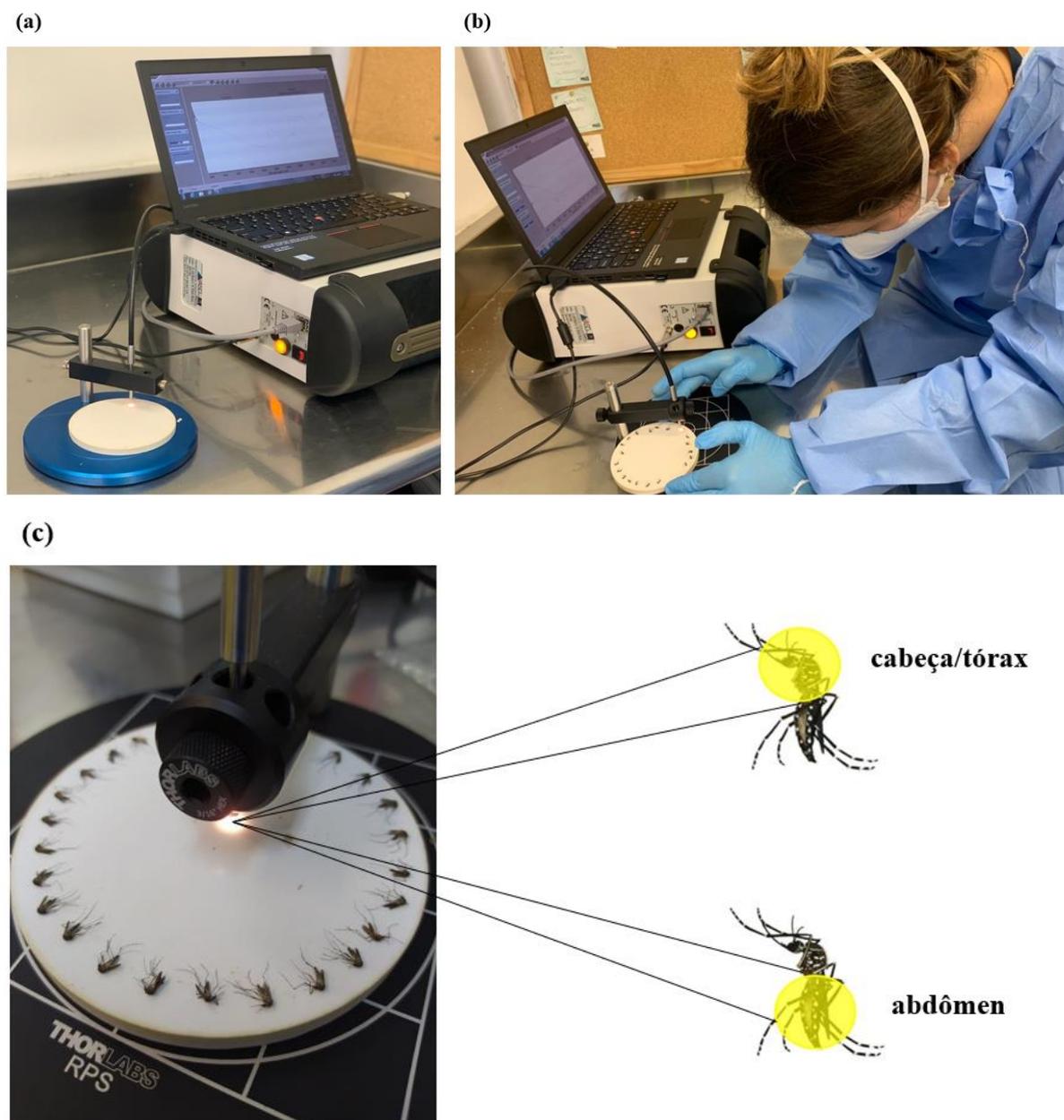
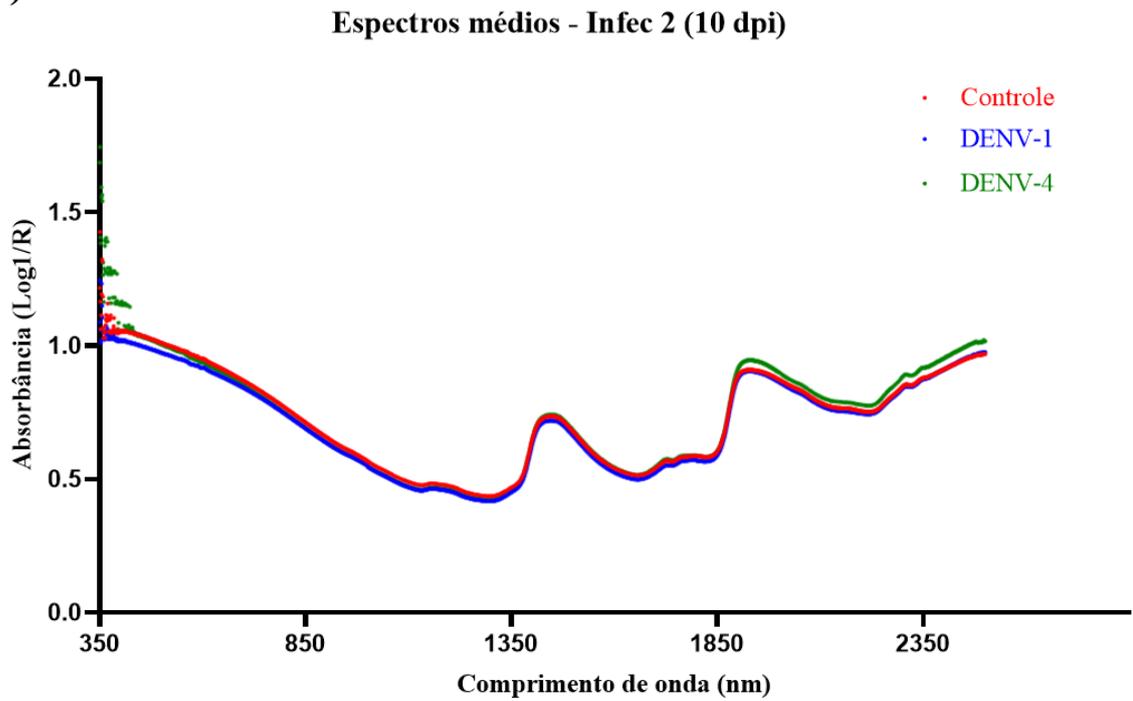


Figura 20: Coleta dos espectros NIR: (a) Espectrômetro LabSpec 4 i NIR (Malvern Panalytical) com a placa espectral (Spectralon) vazia para otimização e calibração da referência branca, por meio do software RS³ (Malvern ASD Panalytical) aberto no notebook, usado somente para a coleta de espectros NIR; (b) Posicionando a luz da sonda de fibra óptica para a região do corpo do mosquito escolhida, cabeça/tórax ou abdômen, para fazer a coleta do espectro NIR; (c) Mosquitos dispostos dorso-ventralmente no Spectralon (substrato de refletância difusa), para a coleta do espectro NIR das duas regiões do corpo do mosquito, com o centro da luz da sonda incidindo sobre a cabeça/tórax ou abdômen, como mostra o esquema da figura.

Após a coleta dos espectros, em 10 e 14 dpi, cada amostra foi individualmente colocada em um tubo eppendorf. Todos os tubos foram devidamente identificados e colocados em caixas de papel para serem armazenados em freezer -80°C. Os espectros médios de todos os grupos da

infecção 2 são mostrados nas Figuras 21a (10 dpi) e 21b (14 dpi). Estes espectros, como já mencionado, são somente das amostras do segundo experimento de infecção, devido a um problema encontrado nas amostras utilizadas no primeiro experimento de infecção (mais detalhes no tópico 4.4 dos Resultados).

(a)



(b)

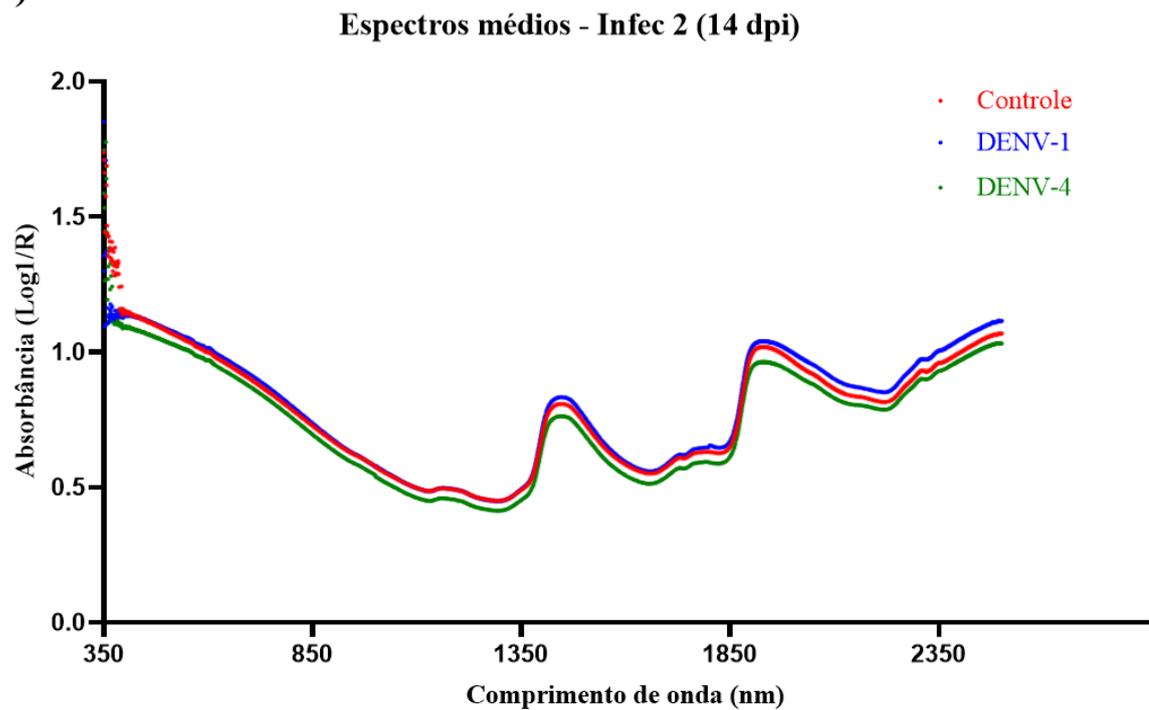


Figura 21: Espectros NIR médios de mosquitos não infectados [Controle (linha vermelha)], infectados com DENV-1 (linha azul) e infectados com DENV-4 (linha verde), do segundo experimento de infecção (Infec 2), na faixa espectral de 350-2500 nm (eixo x), de acordo com seu valor de absorbância (eixo y); (a) espectros médios dos grupos de infecção em 10 dpi; (b) espectros médios dos grupos de infecção em 14 dpi.

3.4 Confirmação da infecção por RT-qPCR

O RNA viral dos mosquitos amostrados em ambos os experimentos de infecção foi extraído com kit QIAamp® Viral RNA Mini (Qiagen). A detecção e quantificação do RNA viral em cada indivíduo infectado com o DENV-1 foi realizada por meio de RT-qPCR com o kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen) no sistema de PCR em tempo real QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems) e em cada indivíduo infectado com o DENV-4 com o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega) no sistema de PCR em tempo real AriaMx (Agilent) e QuantStudio 5 (Applied Biosystems), com a utilização de primers e condições de amplificação já estabelecidos (Johnson et al. 2005; Santiago et al. 2013; Fernandes et al. 2018; Santos et al. 2021; Torres et al. 2021). Os números de cópias de vírus foram calculados por quantificação absoluta, usando uma curva padrão de uma série de diluição de 6 pontos para DENV-1 e 7 pontos para DENV-4 do RNA do DENV transcrito *in vitro*. A análise do valor CT (Cycle Threshold) e da quantificação de cópias de vírus de cada amostra usada na RT-qPCR para confirmação de infecção, referente a cada grupo, foi feita pelos programas de software Agilent Aria, QuantStudio™ Design & Analysis Software e QuantStudio™ Real-Time PCR Software.

3.5 Análise dos dados por Redes Neurais Artificiais

Analizamos os espectros coletados das amostras dos três grupos, Controle, DENV-1 e DENV-4, a fim de compará-los e conseguir promover a detecção de suas diferenças, de acordo com seus constituintes bioquímicos. Dessa forma classificá-los baseados nessas diferenças encontradas pela técnica NIRS. Para isso, os dados dos espectros brutos foram exportados para o software JMP Versão 16 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021), onde a triagem e a análise dos modelos de predição foram realizadas. Os dados (espectros) foram divididos em seus respectivos grupos, Controle, DENV-1 e DENV-4, e depois analisados separadamente. A análise preditiva foi desenvolvida usando Redes Neurais Artificiais (ANN) (Goh *et al.* 2022).

ANN é um termo usado para definir técnicas computacionais que utilizam modelos matemáticos inspirados no sistema nervoso central humano, o qual adquire conhecimento por meio de aprendizagem. A estrutura das ANN simula a forma, o comportamento e as funções de um neurônio biológico. Para isso, existem camadas de “entradas”, onde os sinais (dados) são

apresentados, e de “saídas”, onde esses sinais geram um resultado final. Entre essas duas camadas existem camadas ocultas, onde a maior parte do processamento dos dados é realizada, por meio de conexões ponderadas. Nessas camadas existem “nós” (neurônios artificiais), que são ativados quando há estímulos ou “entradas” suficientes (Fig. 22). A soma dos estímulos que chegam à camada de “entradas” passa por funções de ativação de um “nó”. Essas funções introduzem componentes não lineares nas redes e determinam a extensão em que um sinal deve progredir na mesma, agindo como vias para a transferência de dados. Para isso, diferentes “pesos” (valores) são atribuídos a essas conexões das camadas, que acabam por influenciar na camada de “saídas”. Dessa maneira, as camadas ocultas ligam-se à camada de “saídas”, e ao exceder um limítrofe (threshold), o “nó” ativado ativa os outros “nós” conectados a ele e os resultados são obtidos. Ou seja, a partir da ativação dos “nós”, há um espalhamento por meio das camadas, criando uma resposta ao estímulo, que é o resultado final da camada de “saídas”. Todas essas conexões das camadas acabam por formar uma rede, a rede neural.

O maior benefício da técnica está em sua flexibilidade e adaptabilidade aos dados, sendo uma ferramenta robusta para reconhecer padrões e encontrar relações, por meio de algoritmos, entre dados de entrada e saída. O aprendizado das redes neurais acontece por meio do treinamento do modelo, com processo iterativo de ajustes na definição dos pesos das conexões entre os “nós” das camadas. A cada solução encontrada se calcula uma função de perda, onde são indicados os erros e acertos encontrados na execução do modelo, estabelecendo uma comparação com os dados reais. A partir disso, um conjunto de regras bem definidas é gerado a cada execução. Um treinamento em excesso não garante bons resultados, por isso é importante o ajuste de acordo com o tamanho do conjunto de dados. Quando se atinge uma solução generalizada para os problemas apresentados, se obtém o modelo não-linear com maior precisão preditiva. Dessa maneira, a ANN é capaz de classificar e agrupar dados por meio do aprendizado (Fleck *et al.* 2016; Niazkar & Niazkar 2020; Liu *et al.* 2021; Sarker 2021).

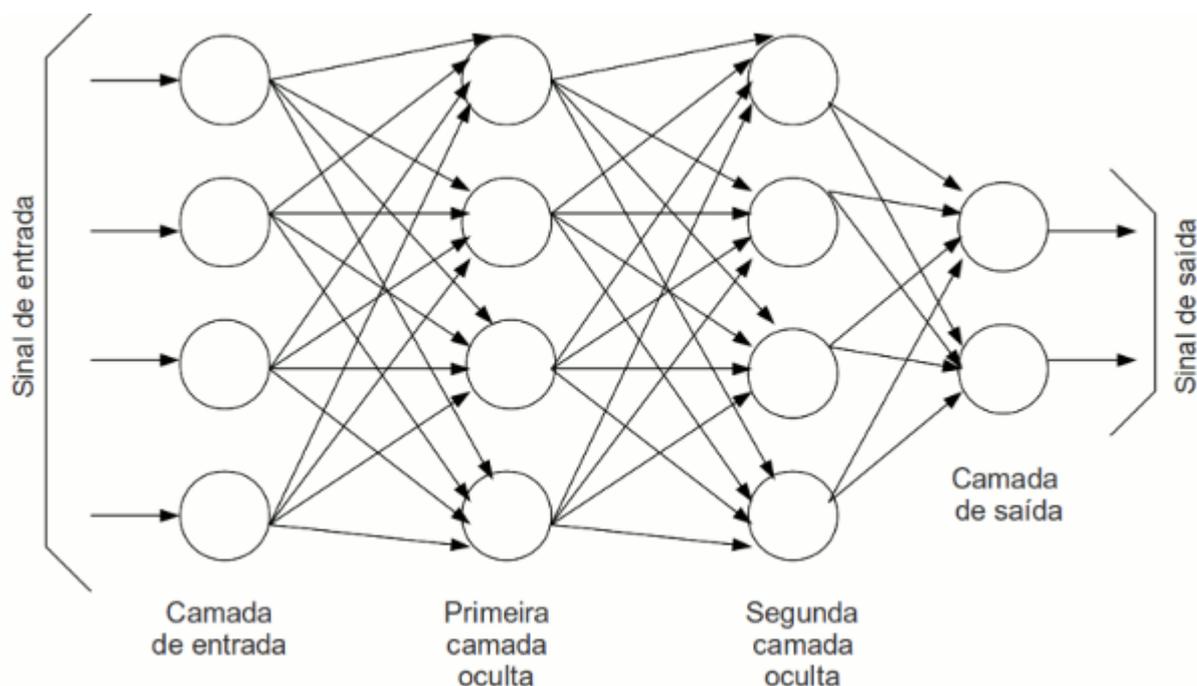


Figura 22: Esquemática da estrutura de uma Rede Neural Artificial simples com o sinal de entrada, que podem ser estímulos internos ou externos; camada de entrada; conexões entre as camadas (setas); camadas ocultas: primeira e segunda, no caso da figura; “nós” (círculos); camada de saída; e sinal de saída, que é a resposta da ANN. Fonte: Monolito Nimbus, 2017.

Neste estudo, utilizamos uma rede neural simples, com 1 camada de entrada e 1 camada de saída e, entre elas, 2 camadas ocultas. Para que as camadas das redes neurais fossem conectadas, no software JMP (Fig. 23) foram usadas três funções de ativação: tangente hiperbólica (TanH), que identifica o valor limítrofe (threshold) para que a ativação dos “nós” ocorra e gera resultados no intervalo de -1 a 1, normalizando o valor das variáveis de negativo para positivo; Linear, ativa os “nós” da camada de saída, e diz se há relação entre as variáveis dessa camada com as de entrada, por meio da atribuição de “pesos”; e Gaussiana, ativa os “nós” das camadas ocultas, mostrando a propagação dessa ativação. A primeira camada oculta foi estruturada com 3 funções de ativação TanH, 1 função de ativação Linear e 1 função de ativação Gaussiana (3:1:1). A segunda camada oculta foi estruturada com 1 função de ativação TanH, 1 função de ativação Linear e 1 função de ativação Gaussiana (1:1:1). O modelo das redes foi impulsionado iterativamente a uma taxa de aprendizado de 0,1. O número de “*tours*”, para refinamento/ajuste dos modelos, foi definido para 500, ou seja, a cada 500 execuções da ANN, o modelo que funcionou melhor em termos de precisão dos resultados (saídas), foi escolhido. O método selecionado foi dos quadrados, útil quando todas as variáveis da camada de “entradas” são importantes e influenciam na camada de “saídas”. Além disso, o modelo recebeu

dados da parte do corpo digitalizada (cabeça/tórax ou abdômen) e dpi (10 ou 14 dias) ao prever infectados (DENV-1 ou -4) versus não infectados. Foram utilizadas assinaturas espectrais na faixa de comprimento de onda de 350 a 2500 nm, isto é, toda a faixa espectral. Como fator de resposta foram utilizadas amostras infectadas com DENV (DENV-1 e DENV-4) e amostras não infectadas (Controle). No fim, o modelo ANN com maior precisão preditiva foi escolhido para o desenvolvimento do modelo final de predição.

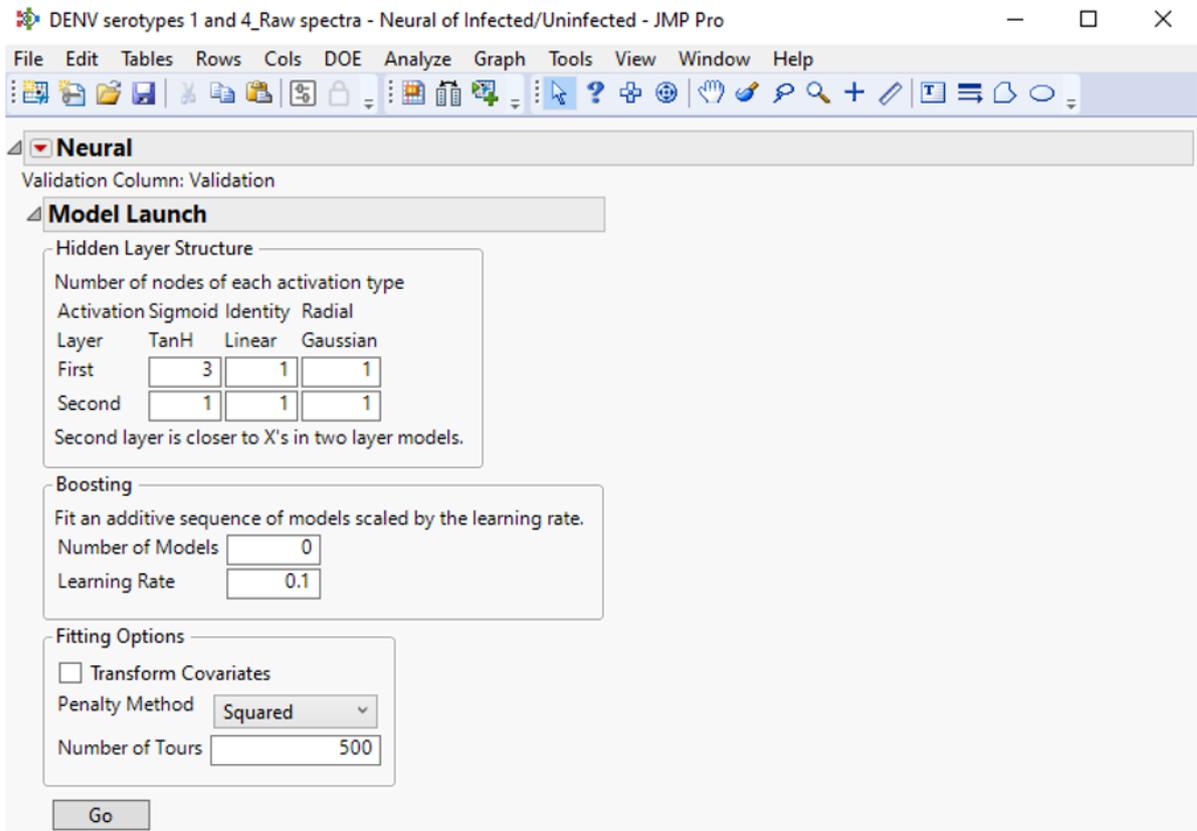


Figura 23: Exemplificação do uso do software JMP para a criação dos modelos de predição com o uso de espectros NIR por Redes Neurais Artificiais, com as configurações devidas para sua estruturação.

Os 5 últimos espectros de amostras segundo cada categoria (região do corpo do mosquito e dpi) foram excluídos do modelo de ANN, a fim de serem usados para realização de um “teste cego” de predição. Além das categorias, esses espectros também foram analisados segundo sua carga viral, de acordo com o número de CT (“*Cycle Threshold*”) da RT-qPCR. O restante dos espectros das amostras foi dividido em conjuntos. O conjunto de treinamento compreendeu 60% dos dados, utilizados para treinar os modelos de predição desenvolvidos; o conjunto de validação compreendeu 20% dos dados, utilizados para validar a acurácia dos modelos; e o conjunto de teste compreendeu 20% dos dados, utilizados para testar a acurácia dos modelos

(Goh *et al.* 2022). Também foram analisadas a sensibilidade, que corresponde ao percentual de acerto das amostras positivas e a especificidade, que corresponde ao percentual de acerto das amostras negativas dos modelos de predição (Kawamura 2002; Santos *et al.* 2022).

Cálculo para determinar acurácia (%):

$$A = \frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN} \times 100 = \%$$

Cálculo para determinar especificidade (%):

$$E = \frac{VN}{FP + VN} \times 100 = \%$$

Cálculo para determinar sensibilidade (%):

$$S = \frac{VP}{FN + VP} \times 100 = \%$$

Onde A = acurácia; E = especificidade; S = sensibilidade; VP = verdadeiro positivo; VN = verdadeiro negativo; FP = falso positivo; FN = falso negativo.

Definimos a interpretação dos valores de acordo com os valores estabelecidos para a curva ROC (Característica de Operação do Receptor), aplicada para análise de testes clínicos de diagnóstico. Seus valores variam de 0 a 1, onde de forma geral, são interpretados como: de 0,5-0,6 (péssimo), de 0,6-0,7 (ruim), de 0,7-0,8 (pobre), de 0,8-0,9 (bom), > 0,9 (excelente) (Polo & Miot 2020).

3.6 Considerações éticas

As fêmeas de *Ae. aegypti* utilizadas para os experimentos de infecção por DENV foram alimentadas por meio de sangue de doadores anônimos adquiridos no banco de sangue do Hospital Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). As bolsas de sangue foram rejeitadas pelo banco devido ao pequeno volume de sangue. Nenhuma informação sobre os doadores, como sexo, idade e condição clínica, foi divulgada. O uso de sangue humano foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fiocruz (CAAE* 53419815.9.0000.5248).

*CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética.

4. Resultados

4.1 N amostral dos grupos nas infecções

No primeiro experimento de infecção com DENV foram separadas 184 fêmeas de *Ae. aegypti* ingurgitadas com sangue para o grupo infectado com o DENV-1 e 100 fêmeas para o grupo infectado com o DENV-4. O grupo controle - sem oferta de vírus no sangue - contou com 57 fêmeas ingurgitadas. No segundo experimento de infecção, em comparação com a infecção 1, as fêmeas se alimentaram melhor. O número de amostras no grupo DENV-1 continuou alto e nos grupos DENV-4 e controle o número de amostras foi maior. Para o grupo de fêmeas infectadas com o DENV-1 foram separadas 139 amostras ingurgitadas e para o grupo de fêmeas infectadas com o DENV-4 foram separadas 161 amostras ingurgitadas. O grupo controle contou com 197 fêmeas ingurgitadas (Fig. 24). A partir desse N total de cada grupo - em cada experimento de infecção - parte das amostras foram recolhidas para posterior coleta de espectros NIR em 10 dpi e a outra parte restante das amostras foram recolhidas em 14 dpi.

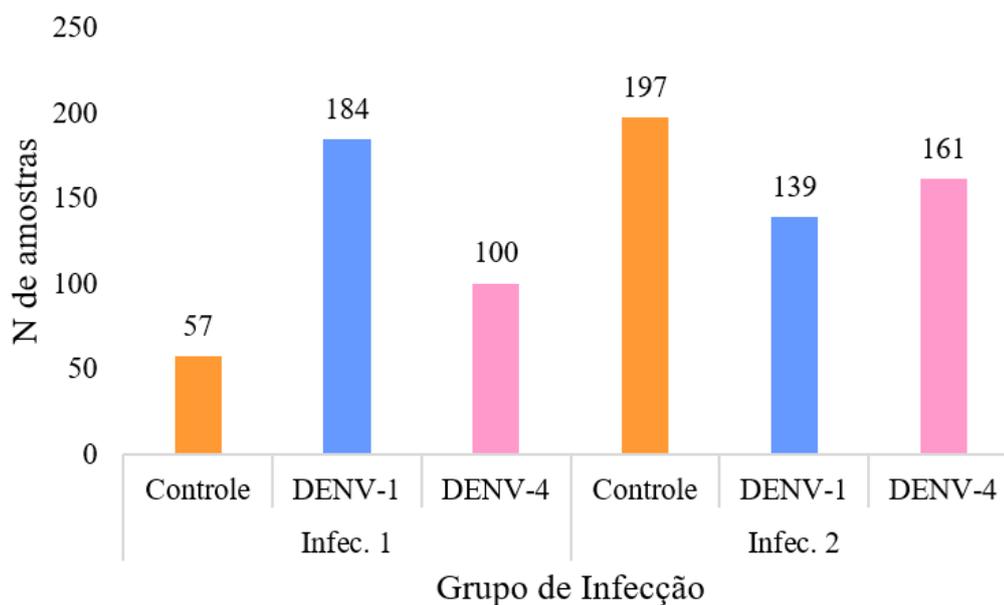


Figura 24: Eixo y = N de amostras; eixo x = Grupo de Infecção. Número total de mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas ingurgitadas (amostras) separadas em cada experimento de infecção (Infec. 1 e Infec. 2), de acordo com seu grupo: controle, DENV-1 ou DENV-4.

4.2 N de espectros coletados por NIRS

Em 10 e 14 dpi as fêmeas foram recolhidas para a coleta de espectros NIR. Devido à mortalidade de alguns mosquitos, o N total visto no tópico acima não condiz com N total de amostras as quais os espectros foram coletados, uma vez que as fêmeas que morreram antes de alcançar os dias 10 ou 14 dpi foram removidas do estudo sem a coleta de espectro. Como mostra a Tabela 1, no primeiro experimento de infecção (Infec. 1), no grupo DENV-1 em 10 e 14 dpi foram coletados os espectros de 79 e 100 amostras, respectivamente; no grupo DENV-4 em 10 e 14 dpi foram coletados os espectros de 37 e 58 amostras, respectivamente; no grupo Controle em 10 e 14 dpi foram coletados os espectros de 23 e 28 amostras, respectivamente. No segundo experimento de infecção (Infec. 2), no grupo DENV-1 em 10 e 14 dpi, 61 e 75 amostras, respectivamente; no grupo DENV-4 em 10 e 14 dpi, 76 e 79 amostras, respectivamente; no grupo Controle em 10 e 14 dpi, 94 e 89 amostras, respectivamente. De cada amostra foram coletados 2 espectros, 1 da região da cabeça/tórax e 1 da região do abdômen do mosquito.

No grupo de amostras infectadas pelo DENV-1 em 10 dpi, ao todo, foram coletados 280 espectros e em 14 dpi 350 espectros. No grupo de amostras infectadas pelo DENV-4 em 10 dpi foram 226 espectros coletados e em 14 dpi 274 espectros. No grupo Controle, de amostras não infectadas, tanto em 10 quanto em 14 dpi o mesmo número de espectros foi coletado (234). O estudo contou com 1598 espectros totais coletados.

Tabela 1: Número de amostras utilizadas, na primeira (Infec. 1) e segunda infecção (Infec. 2), para coleta de espectros NIR em 10 e 14 dpi. De cada amostra foram coletados 2 espectros, 1 da região da cabeça/tórax e 1 da região do abdômen.

Grupo	Dpi	Infec. 1	Infec. 2	Total
DENV-1	10	79	61	140
	14	100	75	175
DENV-4	10	37	76	113
	14	58	79	137
Controle	10	23	94	117
	14	28	89	117
Total				799

4.3 Competência Vetorial: confirmação de infecção por DENV-1 e -4 por RT-qPCR

Para a confirmação de infecção por meio da RT-qPCR, tentamos padronizar em ao menos 50 amostras por grupo/dpi. Isto para gerar maior robustez aos modelos de predição NIR, desenvolvidos pelos espectros coletados apenas dessas amostras confirmadas positivas por RT-qPCR para infecção por DENV (mais detalhes no tópico 4.5). Na primeira infecção realizada (Infec. 1), o grupo de fêmeas infectadas pelo DENV-1 em 10 dpi obteve uma taxa de infecção de 92%, superior à taxa de infecção em 14 dpi, de 90,5%. Na segunda infecção (Infec. 2), essa taxa diminuiu para o grupo DENV-1. Em 10 dpi a taxa de infecção das fêmeas foi de 58%, enquanto em 14 dpi foi de 50%. Para o grupo de amostras infectadas pelo DENV-4, na infecção 1 a taxa de infecção também foi superior em 10 dpi (96,6%) em comparação a 14 dpi (94,8%). Na infecção 2, o grupo DENV-4 em 10 dpi teve a taxa de infecção mais baixa, de 48,6%, e em 14 dpi, obteve uma taxa de 66,2%, também menor em comparação à taxa da primeira infecção para o mesmo ponto (Tab. 2).

Tabela 2: Taxa de infecção dos grupos de mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas infectadas por DENV-1 e -4 na infecção 1 (Infec. 1) e na infecção 2 (Infec. 2), em 10 e 14 dpi. A taxa de infecção foi calculada baseada nas amostras comprovadamente positivas para infecção por meio da RT-qPCR.

Grupo	Dpi	Infec. 1	Infec. 2	Total
DENV-1	10	46/50 (92%)	29/50 (58%)	75
	14	67/74 (90,5%)	29/58 (50%)	96
DENV-4	10	25/26 (96,2%)	36/74 (48,6%)	61
	14	55/58 (94,8%)	49/74 (66,2%)	104
Total				336

A carga viral (log base 10) de DENV-1 e DENV-4 das amostras comprovadamente infectadas por meio da RT-qPCR, tanto para o primeiro quanto para o segundo experimento de infecção, em cada ponto de tempo é mostrada nas Figuras 25a e 25b.

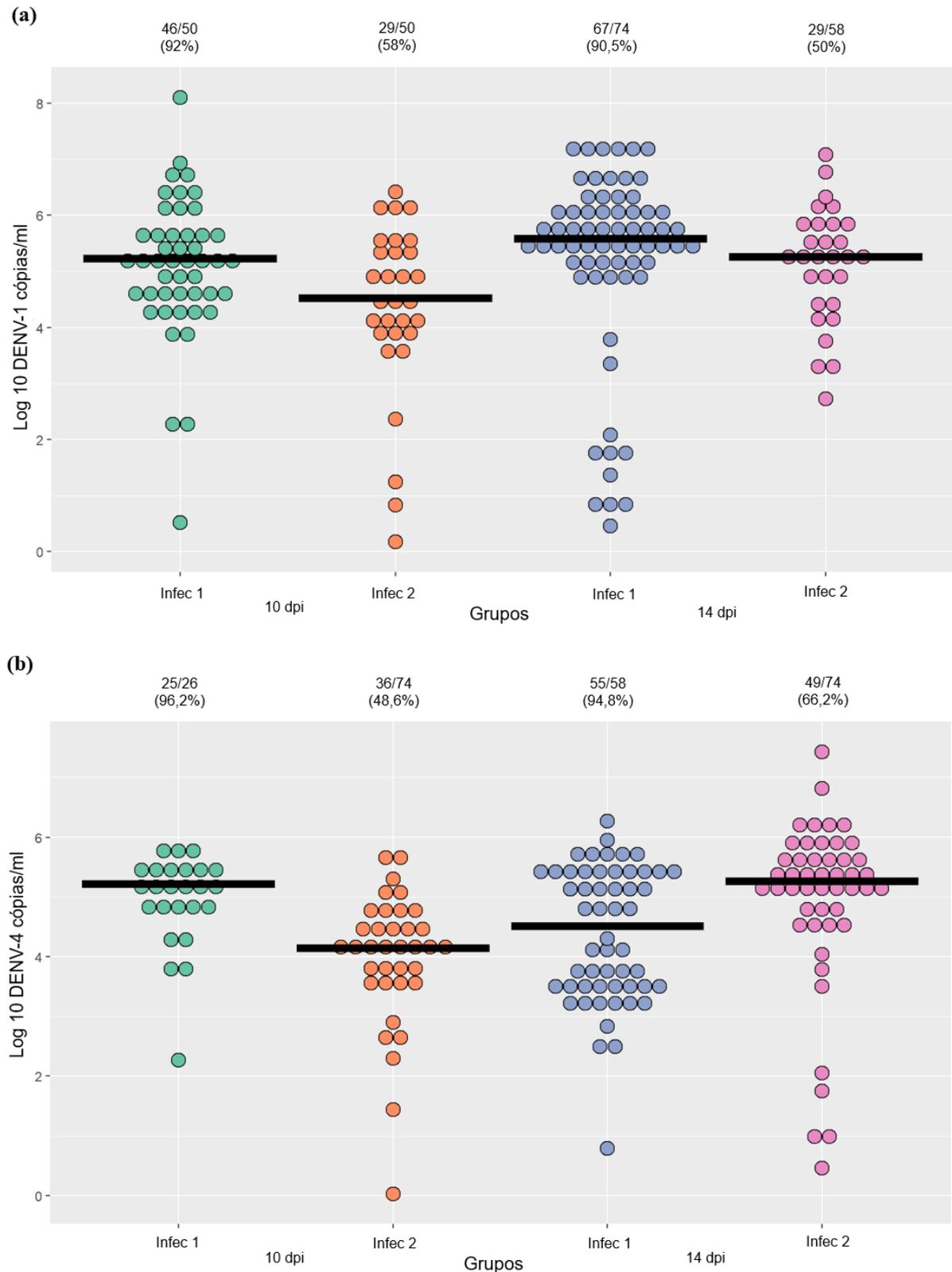


Figura 25: Carga viral de amostras de *Ae. aegypti* positivas para infecção por DENV: em 10 (verde) e 14 (laranja) dpi no primeiro experimento de infecção (Infec 1) e em 10 (azul) e 14 (rosa) dpi no segundo experimento de infecção (Infec 2). Na região superior do gráfico está a proporção de mosquitos infectados (representados na figura pelas bolinhas coloridas, de acordo com seu dpi e experimento de infecção), seguido pela taxa de infecção (entre parênteses) para cada condição; (a) Amostras infectadas com isolado brasileiro do DENV1/H.

sapiens/Brasil/MV09/2015, fornecido em título de 8×10^6 FFU/ml; (b) Amostras infectadas com isolado brasileiro do DENV4/TVP/360, fornecido em título de 2×10^7 PFU/ml. As cópias virais foram determinadas por RT-qPCR em homogenatos de mosquitos individuais com uma curva padrão de uma série de diluição de 6 pontos (10^1 a 10^6 cópias/ml) de RNA de DENV-1 e 7 pontos (10^1 a 10^7 cópias/ml) de RNA de DENV-4 transcrito *in vitro*.

A partir dos dados acima, nota-se que a taxa de infecção das fêmeas foi maior na infecção 1 em relação à infecção 2. Estabelecendo uma comparação entre os grupos, o grupo DENV-4 obteve taxas de infecção superiores às do grupo DENV-1 nos dois experimentos, exceto em 10 dpi na segunda infecção, onde o grupo DENV-1 teve uma taxa de infecção maior.

4.4 Infecção 1: exclusão dos espectros NIR das análises

Nos resultados que serão explanados a seguir concentramos as análises dos espectros NIR apenas de amostras dos grupos da infecção 2, não utilizando os espectros de amostras dos grupos da infecção 1. Isso porque, no período entre a realização dos dois experimentos de infecção para este estudo – que tiveram uma distância de tempo de mais ou menos 1 ano devido à situação pandêmica do SARS-CoV-2 – notou-se que 2 das 6 fibras ópticas de iluminação que compõem a sonda do equipamento NIR, que usamos para coleta dos espectros, estavam quebradas. Cerca de 9 meses após a coleta de espectros das amostras da infecção 1, foi feita a troca das fibras ópticas quebradas por fibras novas. Dessa maneira, o equipamento para a infecção 2 estava funcionando adequadamente, sem nenhuma peça quebrada. Entretanto, ao analisarmos os espectros das amostras da infecção 1, cujos espectros foram coletados sem sabermos se a sonda estava íntegra ou já danificada, notamos espectros muito distintos em relação aos obtidos com a nova sonda, na infecção 2. Levantamos a hipótese então, de que ao menos 1 dessas fibras poderia já estar quebrada no momento da coleta e acabou passando despercebido. Sendo assim, para que os resultados deste trabalho não sejam afetados e influenciados por este suposto ocorrido, foi decidido a não utilização dos dados da infecção 1 para o desenvolvimento dos modelos de predição NIR. Os resultados obtidos com os dados da primeira infecção estão disponíveis nos Apêndices desta dissertação.

4.5 Conjuntos de Treinamento x Validação x Teste por NIRS

Nesse estudo, separamos 3 grupos de mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas: mosquitos não infectados (grupo Controle) e mosquitos infectados (confirmados via RT-qPCR) com 2 sorotipos do DENV (grupo DENV-1 e grupo DENV-4). Para avaliar a capacidade da NIRS em diagnosticar a infecção por DENV e ainda diferenciar as infecções por sorotipos, coletamos espectros individuais das amostras pertencentes a cada um dos grupos. Inicialmente, os 5 últimos espectros das amostras de cada categoria selecionada para este estudo - regiões do corpo e dpi - foram selecionados e excluídos de cada grupo para a realização do teste cego. O restante das amostras foi dividido para compor 3 conjuntos. Para as análises, os espectros foram escolhidos de forma aleatória para compor o conjunto de treinamento, que contou com 60% dos dados, usados para treinar os modelos de predição criados; e para compor o conjunto de validação, que contou com 20% dos dados, usados para validar a precisão dos modelos. Além desses conjuntos, teve o conjunto de teste, que também contou com 20% dos dados, para assim testar a acurácia, sensibilidade e especificidade dos modelos de predição.

Como foram coletados 2 espectros de cada amostra (regiões da cabeça/tórax e do abdômen), o número de dados foi duplicado para cada grupo. Portanto, como os grupos Controle e DENV-4 possuíam um número maior de amostras em relação ao grupo DENV-1, o número de espectros também foi maior para esses grupos em relação a este último. Esta lógica se repete para todos os dados, que serão mostrados a seguir em tópicos baseados em perguntas relativas aos objetivos deste estudo.

4.5.1 A NIRS é capaz de diagnosticar diferencialmente Controle e DENV, sem distinção por sorotipo?

A análise dos espectros dos grupos, somente da segunda infecção, foi feita para compreender a possibilidade do diagnóstico diferencial por meio da NIRS de amostras infectadas por DENV-1, por DENV-4 e não infectadas. Inicialmente, estabelecemos uma análise entre os espectros de amostras não infectadas (Controle) e de amostras infectadas por DENV (DENV-1 + DENV-4), sem distinção por sorotipo. Para isso, foi desenvolvido um modelo de predição mediante um conjunto de treinamento. Para este conjunto, utilizou-se um total de 356 espectros, onde 206 espectros pertenciam ao grupo Controle e 150 ao grupo DENV. Para o grupo Controle, 197 espectros foram classificados corretamente, com especificidade de 95,6%; para o grupo DENV, 138 espectros foram classificados corretamente, com sensibilidade

de 92%. O modelo de predição para o conjunto de treinamento obteve uma acurácia de 94,1%, com alta especificidade e sensibilidade.

Para o conjunto de validação, ao todo foram utilizados 121 espectros, com 72 espectros do grupo Controle e 49 espectros do grupo DENV. O grupo Controle teve acerto de 60 espectros, com especificidade de 83,3%; o grupo DENV teve acerto de 44 espectros, com sensibilidade de 89,8%. A acurácia do modelo de predição para este conjunto foi de 85,9%, com bons percentuais de especificidade e sensibilidade.

Para o conjunto de teste, ao todo foram utilizados 115 espectros, com 68 para o grupo Controle e 47 para o grupo DENV. O modelo no conjunto de teste teve especificidade de 82,4%, com 56 espectros classificados corretamente, como pertencentes ao grupo Controle. Para o grupo DENV, a sensibilidade do modelo foi de 80,9%, com 38 espectros classificados corretamente. A acurácia do modelo para o conjunto de teste foi de 81,7%, mantendo bons percentuais de especificidade e sensibilidade.

Tabela 3: Na primeira coluna estão os grupos de infecção, Controle e DENV (DENV-1 + DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia.

Grupo de Infec.	Predição do Modelo								
	Conjunto de Treinamento			Conjunto de Validação			Conjunto de Teste		
	Controle	DENV	Total	Controle	DENV	Total	Controle	DENV	Total
Controle	197 (95,6%)	9 (4,4%)	206	60 (83,3%)	12 (16,7%)	72	56 (82,4%)	12 (17,6%)	68
DENV	12 (8%)	138 (92%)	150	5 (10,2%)	44 (89,8%)	49	9 (19,1%)	38 (80,9%)	47
			356			121			115

4.5.2 A NIRS é capaz de diagnosticar diferencialmente Controle, DENV-1 e DENV-4?

Posteriormente fizemos a análise do modelo de predição para os espectros dos grupos Controle, DENV-1 e DENV-4, dessa vez fazendo a distinção de amostras infectadas de acordo com o sorotipo. Para o conjunto de treinamento, utilizou-se um total de 356 espectros, onde 206 espectros pertenciam ao grupo Controle, 57 espectros ao grupo DENV-1 e 93 espectros ao

grupo DENV-4 (Tab. 4). Para o grupo Controle, 205 espectros foram classificados corretamente, com especificidade de 99,5%; para o grupo DENV-1, 55 espectros foram classificados corretamente, com sensibilidade de 96,5%; e para o grupo DENV-4 92 espectros foram classificados corretamente, com sensibilidade de 98,9%. O modelo de predição para diagnóstico diferencial de Controle x DENV-1 x DENV-4, neste conjunto, obteve uma acurácia de 98,8%, com alta especificidade e sensibilidade.

Para o conjunto de validação, ao todo foram utilizados 121 espectros para análise, com 72 espectros do grupo Controle, 23 espectros do grupo DENV-1 e 26 espectros do grupo DENV-4. O grupo Controle teve acerto de 61 espectros, com especificidade de 84,7%; o grupo DENV-1 teve acerto de 16 espectros, com sensibilidade de 69,6%; e o grupo DENV-4 teve acerto de 19 espectros, com sensibilidade de 73,1%. Em comparação ao conjunto de treinamento, a acurácia do modelo para o conjunto de validação cai consideravelmente, sendo de 79,3%.

Para o conjunto de teste, ao todo foram utilizados 115 espectros, com 68 para o grupo Controle, 16 para o grupo DENV-1 e 31 para o grupo DENV-4. O modelo no conjunto teste teve especificidade de 85,3%, com 58 espectros classificados corretamente, como do grupo Controle, havendo um aumento em relação à predição do conjunto anterior. Para o grupo DENV-1, a sensibilidade do modelo foi muito baixa de 37,5%, com 6 espectros classificados corretamente e 10 erroneamente, sendo 6 equivocadamente atribuídos ao grupo Controle e 4 ao grupo DENV-4. Para o grupo DENV-4, 19 espectros foram classificados corretamente, com sensibilidade de 61,3%. A acurácia do modelo para o conjunto de teste foi de 72,1%.

Tabela 4: Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle, DENV-1 e DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle, DENV-1 e DENV-4), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia.

Grupo de Infec.	Predição do Modelo											
	Conjunto de Treinamento				Conjunto de Validação				Conjunto de Teste			
	Controle	DENV-1	DENV-4	Total	Controle	DENV-1	DENV-4	Total	Controle	DENV-1	DENV-4	Total
Controle	205 (99,5%)	0	1 (0,5%)	206	61 (84,7%)	7 (9,7%)	4 (5,6%)	72	58 (85,3%)	5 (7,4%)	5 (7,4%)	68
DENV-1	2 (3,5%)	55 (96,5%)	0	57	5 (21,7%)	16 (69,6%)	2 (8,7%)	23	6 (37,5%)	6 (37,5%)	4 (25%)	16
DENV-4	1 (1,1%)	0	92 (98,9%)	93	5 (19,2%)	2 (7,7%)	19 (73,1%)	26	8 (25,8%)	4 (12,9%)	19 (61,3%)	31
				356				121				115

A partir desses resultados, é possível inferir que o modelo desenvolvido pelos espectros NIR obteve altos percentuais de especificidade e de sensibilidade para o conjunto de treinamento. Entretanto, para os outros conjuntos esses percentuais diminuem, e o modelo obtém baixas acurácias, com destaque para o grupo de amostras infectadas pelo DENV-1 que apresentou uma sensibilidade de apenas 37,5% para o conjunto de teste.

4.5.3 A acurácia da diferenciação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 para o Controle (comparações pareadas) varia entre os sorotipos?

Para analisar se há variação entre a diferenciação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 com o grupo Controle (Tab. 5), ao todo foram utilizados 263 espectros para o desenvolvimento do modelo pelo conjunto de treinamento. Desse total, 206 espectros foram do grupo Controle e 57 espectros do grupo de amostras infectadas por DENV-1. A porcentagem de especificidade do modelo neste conjunto para as amostras não infectadas foi alta, de 99,5%, com 205 espectros previstos corretamente. Para o grupo de amostras infectadas com o DENV-1 a sensibilidade se mostrou bem baixa, de 64,9%, com 37 espectros previstos corretamente. A acurácia do modelo para este conjunto foi de 92%.

Para o conjunto de validação foram utilizados 95 espectros, e a especificidade do modelo também foi alta para o grupo Controle, com 70 espectros previstos corretamente de 72 espectros totais (97,2%). O grupo de amostras infectadas por DENV-1, contou com 17 espectros previstos

corretamente de 23 espectros totais, com sensibilidade de 73,9%. A acurácia do modelo para este conjunto foi de 91,5%, com uma diferença de 0,5% para a do conjunto anterior.

Para o conjunto de teste, com 84 espectros, a especificidade para o grupo Controle foi menor em comparação à dos outros conjuntos, de 88,2%, com 60 espectros previstos corretamente de 68 espectros totais. A sensibilidade do modelo para o grupo de amostras infectadas com DENV-1 foi muito baixa (31,2%), com a maior parte dos espectros (68,8%) sendo classificados equivocadamente como pertencentes a amostras não infectadas. Dessa maneira, o modelo não obteve um bom percentual para a diferenciação das amostras infectadas por DENV-1 das amostras não infectadas, com acurácia de 77,3%.

Tabela 5: Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle e DENV-1), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV-1), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia.

Grupo de Infec.	Predição do Modelo								
	Conjunto de Treinamento			Conjunto de Validação			Conjunto de Teste		
	Controle	DENV-1	Total	Controle	DENV-1	Total	Controle	DENV-1	Total
Controle	205 (99,5%)	1 (0,5%)	206	70 (97,2%)	2 (2,8%)	72	60 (88,2%)	8 (11,8%)	68
DENV-1	20 (35,1%)	37 (64,9%)	57	6 (26,1%)	17 (73,9%)	23	11 (68,8%)	5 (31,2%)	16
			263			95			84

Para a análise da diferenciação de amostras do grupo Controle de amostras do grupo DENV-4 (Tab. 6), foram utilizados 299 espectros para o desenvolvimento do modelo do conjunto de treinamento. As predições corretas foram altas para os dois grupos neste conjunto. O grupo Controle teve 205 espectros previstos corretamente de 206 espectros totais (especificidade de 99,5%) e o grupo DENV-4 teve 92 espectros previstos corretamente de 93 espectros totais (sensibilidade de 98,9%). A acurácia do modelo para este conjunto foi de 99,3%.

Para o conjunto de validação foram utilizados ao todo 98 espectros, com 72 espectros do grupo Controle e 26 espectros do grupo DENV-4. A predição correta desse conjunto para os dois grupos diminui em comparação ao conjunto anterior, porém a especificidade do grupo Controle se mantém alta (94,4%) com 68 espectros previstos corretamente. Enquanto a

sensibilidade do grupo DENV-4 cai consideravelmente (80,8%) com 21 espectros previstos corretamente. A acurácia do modelo para este conjunto foi de 90,8%.

No conjunto de teste, foram utilizados 99 espectros totais, onde as predições corretas para os dois grupos continuaram a diminuir. Para o grupo de amostras não infectadas (Controle) o modelo de predição obteve especificidade de 82,4%, com 56 espectros previstos corretamente de 68 totais. Para o grupo de amostras infectadas com DENV-4, o modelo obteve sensibilidade de 74,2%, com 23 espectros previstos corretamente de 31 totais. A acurácia do modelo para este conjunto foi de 79,7%.

Tabela 6: Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle e DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV-4), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia.

Grupo de Infec.	Predição do Modelo								
	Conjunto de Treinamento			Conjunto de Validação			Conjunto de Teste		
	Controle	DENV-4	Total	Controle	DENV-4	Total	Controle	DENV-4	Total
Controle	205 (99,5%)	1 (0,5%)	206	68 (94,4%)	4 (5,6%)	72	56 (82,4%)	12 (17,6%)	68
DENV-4	1 (1,1%)	92 (98,9%)	93	5 (19,2%)	21 (80,8%)	26	8 (25,8%)	23 (74,2%)	31
			299			98			99

Dessa maneira, estabelecendo uma comparação pareada entre a análise de espectros de Controle x DENV-1 e Controle x DENV-4, nota-se que os percentuais de sensibilidade do modelo foram melhores, para os três conjuntos, para o DENV-4. O percentual de especificidade se manteve bom nas duas análises, porém houve uma diminuição em seu percentual no conjunto de teste. A sensibilidade do modelo para o DENV-1, com destaque para o conjunto de teste, foi muito baixa, obtendo um maior percentual de amostras classificadas equivocadamente como pertencentes ao grupo Controle.

Apesar da sensibilidade do modelo desenvolvido com espectros das amostras infectadas com o sorotipo DENV-4 ter sido maior, a porcentagem de acertos é considerada pobre para ser capaz de promover a diferenciação com amostras não infectadas.

4.5.4 A NIRS é capaz de diferenciar os sorotipos DENV-1 e DENV-4?

Em relação aos espectros das amostras infectadas, foi feita a análise do modelo de predição, para saber a possibilidade de diagnosticar diferencialmente os sorotipos envolvidos na infecção (Tab. 7). No conjunto de treinamento foram utilizados 150 espectros, onde 57 espectros pertenciam ao grupo de amostras infectadas por DENV-1 e 93 espectros pertenciam ao grupo de amostras infectadas por DENV-4. No grupo DENV-1, 52 espectros foram classificados de forma correta, com sensibilidade de 91,2% do modelo. No grupo DENV-4, a sensibilidade foi maior, de 98,9%, com 92 espectros classificados corretamente. A acurácia do modelo foi de 96%.

Para o conjunto de validação, foram utilizados 49 espectros, onde no grupo DENV-1 de 23 espectros, 20 foram classificados corretamente, com sensibilidade de 87% e no grupo DENV-4 de 26 espectros, 25 foram classificados corretamente. Este último grupo com sensibilidade ainda alta, de 96,2%. A acurácia do modelo para este conjunto foi de 91,8%.

No conjunto de teste, o número de espectros utilizados foi 47, com 16 do grupo DENV-1 e 31 do grupo DENV-4. Nota-se que o percentual de sensibilidade nos dois grupos diminuiu, principalmente para o grupo do sorotipo DENV-1, com 9 acertos (56,3%), e 26 acertos (83,9%) para o grupo DENV-4. Neste conjunto, no grupo DENV-1, 7 amostras foram classificadas como infectadas pelo sorotipo DENV-4, mostrando que o modelo não foi capaz de promover a diferenciação desses espectros de forma adequada. A acurácia do modelo para este conjunto foi de 74,4%.

Tabela 7: Na primeira coluna estão os grupos de infecção (DENV-1 e DENV-4), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (DENV-1 e DENV-4), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia.

Grupo de Infec.	Predição do Modelo								
	Conjunto de Treinamento			Conjunto de Validação			Conjunto de Teste		
	DENV-1	DENV-4	Total	DENV-1	DENV-4	Total	DENV-1	DENV-4	Total
DENV-1	52 (91,2%)	5 (8,8%)	57	20 (87%)	3 (13%)	23	9 (56,3%)	7 (43,8%)	16
DENV-4	1 (1,1%)	92 (98,9%)	93	1 (3,8%)	25 (96,2%)	26	5 (16,1%)	26 (83,9%)	31
			150			49			47

O modelo de predição diminuiu consideravelmente seu percentual de acurácia no conjunto de teste, mas obteve um bom percentual de sensibilidade para diagnosticar amostras infectadas com o DENV-4 de forma diferencial do DENV-1.

Estabelecemos uma comparação entre os percentuais de acurácia encontrados para os três conjuntos em todas as análises do modelo de predição NIRS realizadas até aqui (Tab. 8). Nota-se que para todas as análises o modelo apresentou excelentes acurácias para o conjunto de treinamento. As acurácias do modelo em relação ao conjunto de validação continuam excelentes (acima de 90%), com exceção da análise feita entre Controle x DENV-1 x DENV-4, onde o percentual de acurácia foi pobre. Por fim, para o conjunto de teste, o qual obtém as respostas mais conclusivas a respeito da predição do modelo por espectros NIR, nota-se acurácias pobres em todas as análises feitas. Exceto para a análise entre Controle x DENV, que apresentou um bom percentual de acurácia.

Tabela 8: Comparativo das acurácias (%) encontradas em cada análise dos modelos de predição, por meio de espectros NIR, para os três conjuntos: treinamento, validação e teste.

Controle x DENV			
	Conj. Treinamento	Conj. Validação	Conj. Teste
Acurácia (%)	94,1%	85,9%	81,7%
Controle x DENV-1 x DENV-4			
	Conj. Treinamento	Conj. Validação	Conj. Teste
Acurácia (%)	98,8%	79,3%	72,1%
Controle x DENV-1			
	Conj. Treinamento	Conj. Validação	Conj. Teste
Acurácia (%)	92%	91,5%	77,3%
Controle x DENV-4			
	Conj. Treinamento	Conj. Validação	Conj. Teste
Acurácia (%)	99,3%	90,8%	79,7%
DENV-1 x DENV-4			
	Conj. Treinamento	Conj. Validação	Conj. Teste
Acurácia (%)	96%	91,8%	74,4%

4.5.5 Como o modelo preditivo varia de acordo com região do corpo (cabeça/tórax ou abdômen), dias pós-infecção (10 ou 14 dias) e carga viral; como as amostras classificadas erroneamente se agrupam de acordo com essas categorias?

Buscando fazer uma análise direcionada para as categorias definidas neste estudo, utilizamos os espectros selecionados para o teste cego, os quais foram excluídos dos modelos de predição por ANN, para prever o grupo de infecção (Infec. 2) no qual seriam agrupados. Inicialmente, esses espectros foram usados para prever somente os grupos de infecção: Controle, DENV-1 e DENV-4 (Fig. 26). Para cada grupo havia 20 espectros. No grupo Controle, dos 20 espectros totais, apenas 6 foram previstos corretamente, tendo a maior parte dos seus espectros sendo previstos como do grupo DENV-1 (8), e o restante (6) como do grupo DENV-4. Para o grupo de amostras infectadas com DENV-1, dos 20 espectros totais, apenas 6 foram previstos como pertencentes a este grupo, tendo o mesmo número de espectros previstos como do grupo Controle. A maior parte dos espectros do grupo DENV-1 foram previstos como do grupo DENV-4 (8). Para o grupo de amostras infectadas com DENV-4, a maior parte dos espectros foram de fato previstos como pertencentes a este grupo (11). O restante foi previsto como do grupo Controle (4) e do grupo DENV-1 (5). Dessa forma, com a utilização de espectros de amostras desconhecidas do modelo (teste cego), o grupo DENV-4 foi o que obteve o melhor resultado de predição. Entretanto, o modelo não foi capaz de prever, de maneira sensível e específica, os espectros das amostras dos grupos de infecção.

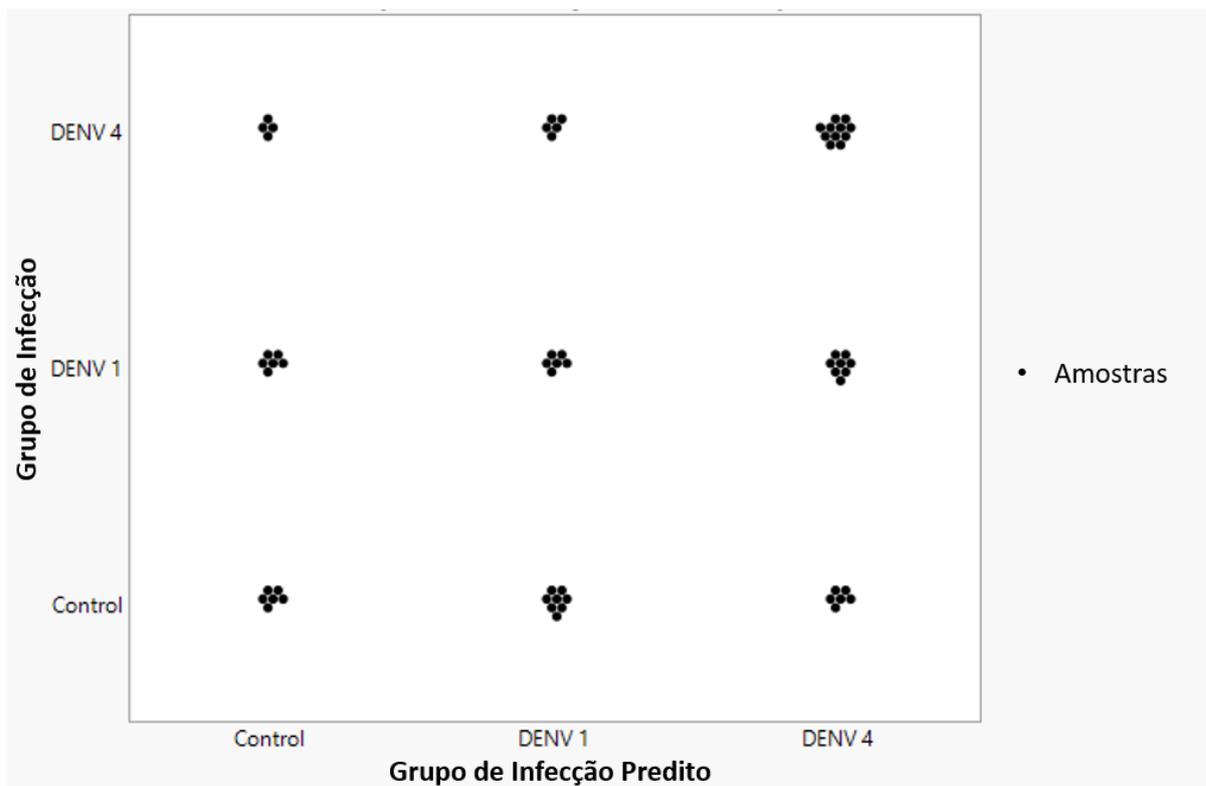


Figura 26: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR. Cada bolinha é um espectro/amostra de seu grupo (Controle, DENV-1 ou DENV-4). O modelo de predição não foi capaz de prever corretamente a maioria das amostras. O grupo DENV-4 foi o grupo que contou com o maior número de espectros classificados de forma correta em comparação aos outros grupos.

Em relação à categoria “região do corpo do mosquito”, dividida em cabeça/tórax (à direita da figura) e abdômen (à esquerda da figura), dos 20 espectros totais utilizados para análise, metade (10) foi usada para prever espectros da região do abdômen e a outra metade (10) para prever espectros da região da cabeça/tórax (Fig. 27). Para o grupo Controle, dos espectros coletados da região do abdômen do mosquito, apenas 2 foram previstos corretamente, enquanto a maior parte foi prevista como sendo de amostras infectadas (8). Para o grupo DENV-1, dos espectros coletados na mesma região, 3 foram previstos corretamente, sendo o mesmo número de espectros previstos como do grupo DENV-4. O restante (4) foi previsto como grupo Controle. Para o grupo DENV-4, ainda com espectros do abdômen, metade (5) dos espectros foram previstos corretamente, e 3 foram previstos como espectros de amostras não infectadas e 2 como do grupo DENV-1. Agora em relação à região da cabeça/tórax dos mosquitos, no grupo Controle, o número de espectros previstos corretamente aumenta para 4, mesmo número previsto como de amostras infectadas com DENV-1. O restante (2) foi previsto como do grupo DENV-4. Para o grupo DENV-1, 3 espectros foram previstos de forma correta, e 5 foram previstos como do grupo DENV-4 e 2 como do grupo Controle. Por último, o grupo DENV-4,

foi o grupo que mais teve espectros previstos corretamente (6) nessa região do corpo. O restante foi previsto como do grupo DENV-1 (3) e do grupo Controle (1).

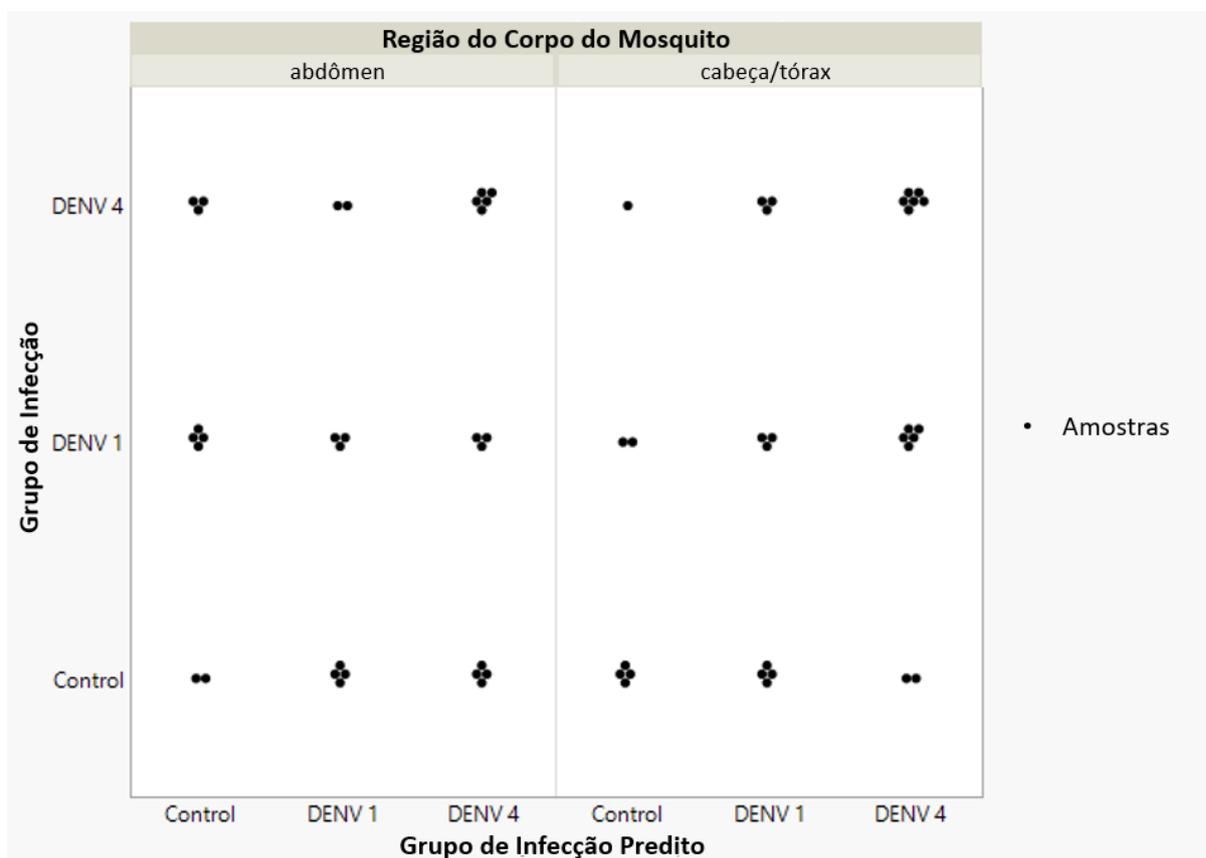


Figura 27: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR, de acordo com a região do corpo do mosquito: abdômen ou cabeça/tórax. Cada bolinha é um espectro/amostra de seu grupo (Controle, DENV-1 ou DENV-4). O modelo de predição não foi capaz de prever corretamente a maior parte das amostras. O grupo DENV-4 foi o grupo com o maior número espectros classificados de forma correta, tanto para a região do abdômen quanto para a região da cabeça/tórax.

Na categoria “dias pós infecção (dpi)”, em 10 (à esquerda da figura) e 14 (à direita da figura) dias, também foi utilizado metade dos 20 espectros totais para cada dpi (Fig. 28). Em relação à 10 dpi, no grupo Controle apenas 3 espectros foram previstos corretamente, enquanto a maior parte foi predita como do grupo DENV-1 (6), e o restante (1) como do grupo DENV-4. No grupo de amostras infectadas com o DENV-1, 4 espectros foram previstos corretamente, mesmo número previsto como do grupo DENV-4, e o resto (2) previsto como de amostras não infectadas. Para o grupo de amostras infectadas com DENV-4, 3 espectros foram previstos de forma correta, 5 previstos como do grupo DENV-1 e 2 previstos como do grupo Controle.

Em relação à 14 dpi, no grupo Controle, novamente apenas 3 espectros foram previstos de forma correta, sendo a maior deles previstos como do grupo DENV-4 (5) e o restante (2)

como do grupo DENV-1. O grupo DENV-1 contou com menos acertos, em comparação ao décimo dpi, com apenas 2 espectros previstos de forma correta. O restante (8) foi previsto como Controle e DENV-4. No grupo DENV-4 houve o melhor resultado de predição, com 8 espectros previstos corretamente, e 2 previstos como do grupo Controle. Dessa vez, nenhum espectro foi previsto como do grupo DENV-1.

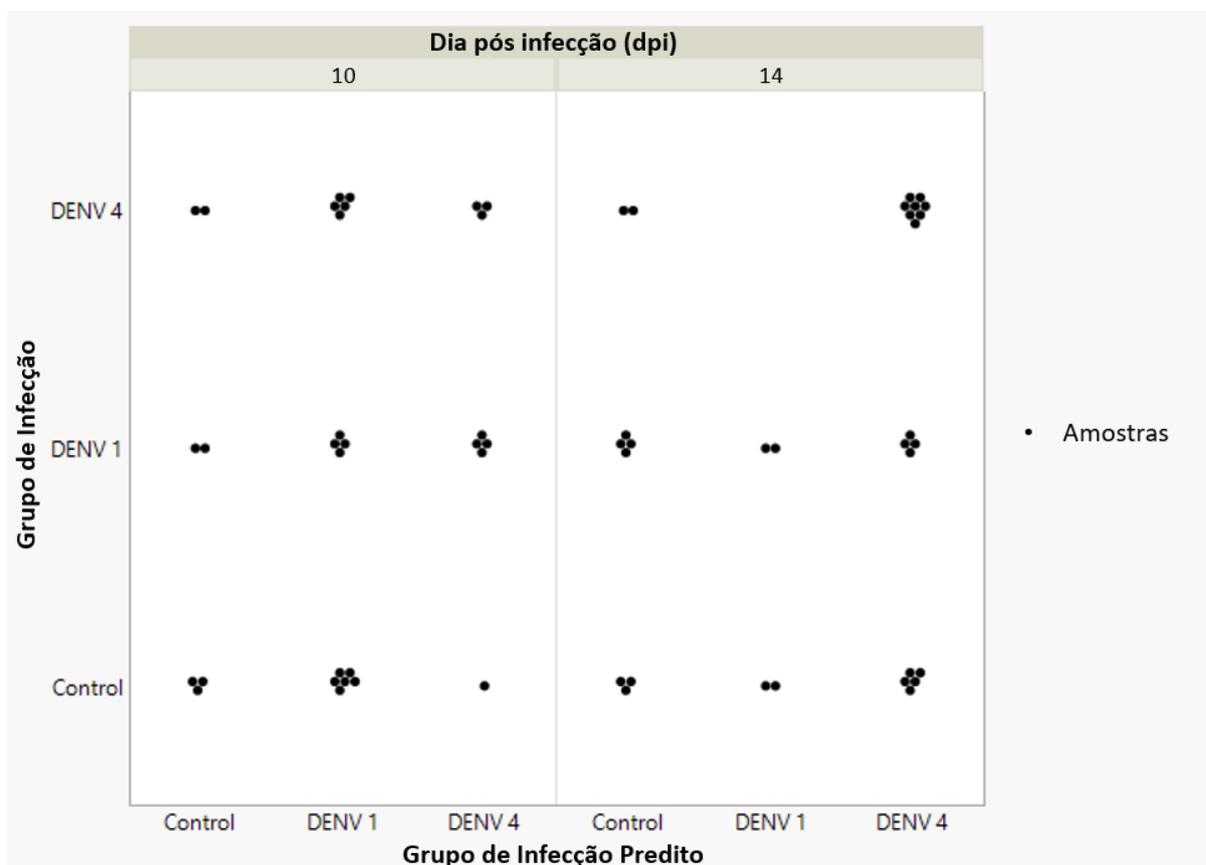


Figura 28: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR, de acordo com o dpi: 10 ou 14 dias. Cada bolinha é um espectro/amostra de seu grupo (Controle, DENV-1 ou DENV-4). O modelo de predição não foi capaz de prever corretamente a maior parte das amostras. Em 10 dpi, a predição para os 3 grupos não foi boa. Em 14 dpi, o grupo DENV-4 obteve o maior número de espectros classificados de forma correta.

Por fim, analisamos também a predição dos espectros em relação à categoria de “carga viral” das amostras em relação ao CT encontrado na RT-qPCR (Fig 29). Portanto, só foram avaliados os espectros dos grupos de amostras infectadas: DENV-1 e DENV-4. O CT corresponde ao número de ciclos necessários na PCR para que se inicie a amplificação do vírus. Sendo assim, o CT tem é inversamente proporcional à carga viral: quanto menor o CT, maior a quantidade de vírus e vice-versa. Aqui definimos um alta carga viral para amostras com CT entre 18-25 e uma baixa carga viral com CT entre 25-37.

Os mesmos 20 espectros - do teste cego - foram usados. Desses 20, 16 espectros foram de amostras com CTs entre 18-25 e 4 de amostras com CTs entre 25-37 para o grupo do sorotipo DENV-1. Para o grupo do sorotipo DENV-4, foram 10 espectros de amostras com CTs entre 18-25 e 10 de amostras com CTs entre 25-37. Das amostras que possuíam maior carga viral (CT entre 18-25), no grupo DENV-1 apenas 5 espectros foram previstos corretamente, sendo a maior parte deles previstos como do grupo de amostras não infectadas (6); e no grupo DENV-4, 9 foram preditas corretamente, com apenas 1 amostra predita como do grupo DENV-1. Das amostras que possuíam menor carga viral (CT entre 25-37), no grupo DENV-1 apenas 1 espectro foi previsto de forma correta, os outros 3 foram previstos como do grupo DENV-4; no grupo DENV-4 apenas 2 espectros foram previstos corretamente. Quatro foram previstos como de espectros de amostras não infectadas e 4 como de amostras do grupo DENV-1 (Fig. 28). Dessa maneira, percebe-se que os espectros NIR pertencentes a amostras com alta carga viral possuem melhores resultados de predição do modelo em relação aos espectros de amostras com baixa carga viral.

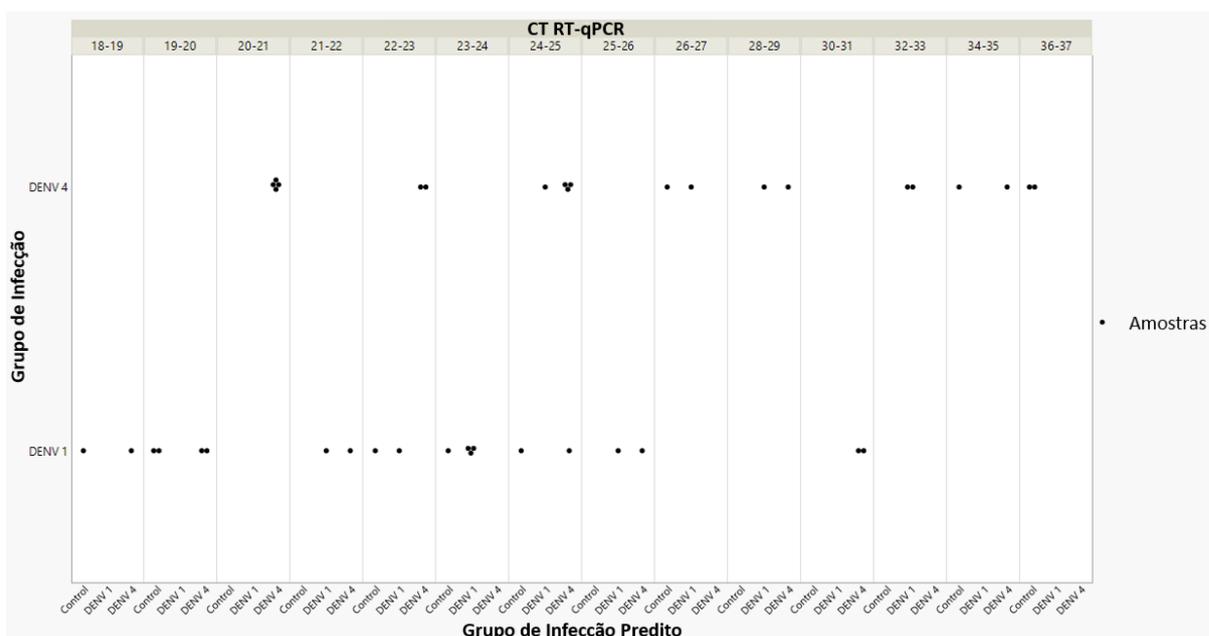


Figura 29: Grupo de Infecção (eixo y) x Grupo de Infecção Predito (eixo x) pelo modelo NIR, de acordo com a carga viral: baixa (CT de 25-37) ou alta (CT de 18-25) que é indicada na parte superior da figura. Cada bolinha é um espectro/amostra de seu grupo (Controle, DENV-1 ou DENV-4). O modelo de predição não foi capaz de prever corretamente a maior parte das amostras. Em relação às amostras com alta carga viral, o grupo DENV-4 obteve o maior número de amostras preditas corretamente. Em relação às amostras com baixa viral, tanto do grupo DENV-1 quanto do grupo DENV-4, o número de espectros preditos pelo modelo foi bem baixo.

5. Discussão

Neste estudo buscamos testar a capacidade da técnica NIR em diagnosticar fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com um dos dois sorotipos do DENV em laboratório, DENV-1 ou DENV-4. A detecção de flavivírus em mosquitos vetores pode ser feita por diferentes métodos de diagnóstico como isolamento viral, detecção de antígenos virais ou técnicas moleculares. O isolamento viral (técnica padrão ouro para detecção de vírus) gera uma resposta qualitativa, indicando a ausência ou a presença do vírus na amostra pela observação do efeito citopático causado pela infecção, a depender da linhagem de células e da cepa do vírus utilizadas. Vírus que causam efeitos mais discretos nas células inoculadas, tornam mais difícil a detecção por este método. Além disso, a necessidade de um laboratório com estrutura adequada para a manutenção das culturas de células, com profissionais especializados, são algumas desvantagens para a aplicação do isolamento viral na vigilância virológica em larga escala com mosquitos de campo. O ensaio de imunoabsorção enzimática (Elisa) – comumente utilizado para detecção do DENV em pacientes com suspeita de dengue – busca por anticorpos imunoglobulina da classe M (IgM) para infecções recentes ou por anticorpos imunoglobulina da classe G (IgG) para infecções antigas. Todavia, a utilização desse teste pode levar a reações cruzadas entre os anticorpos nas infecções por arbovírus, que circulam simultaneamente em uma mesma área geográfica, tornando o diagnóstico diferencial mais difícil (Bona *et al.* 2011; Licínio & Ayres 2021; Brasil 2022). Dessa forma, o método mais utilizado para diagnóstico de arboviroses pela vigilância de arbovírus, como o DENV, é a técnica molecular RT-PCR. Esta apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção do patógeno mesmo em baixas quantidades (Arya *et al.* 2005; Licínio & Ayres 2021). Entretanto, sua aplicação em países endêmicos com poucos recursos, como o Brasil, enfrenta certas limitações. O alto custo dos reagentes e equipamentos necessários à execução do método é uma das principais limitações. Além disso, o tempo que se leva até a obtenção do resultado para diagnosticar um grande número de amostras se torna um empecilho para que decisões oportunas sejam tomadas em tempo hábil em relação à circulação do vírus, inviabilizando o alerta precoce para grandes regiões afetadas (Fernandes *et al.* 2018; Santos *et al.* 2021). Os resultados aqui obtidos mostraram que a técnica NIRS foi capaz de detectar o DENV, diferenciando amostras infectadas de amostras não infectadas. Porém, para diagnóstico diferencial a nível de sorotipo, apresentou baixos percentuais de acurácia e sensibilidade.

O DENV é o mais importante arbovírus transmitido por mosquitos aos humanos, compreendendo 4 sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a -4), com uma alta diversidade de genótipos e cepas, o que traz uma grande problemática para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Gubler 2011; Ekwudu *et al.* 2020). Sendo assim, a melhor estratégia para diminuir a incidência dos casos de dengue é pelo controle do vetor. Atualmente no Brasil, de maneira geral, é feito o monitoramento de larvas do mosquito *Ae. aegypti*, por meio do Levantamento de Índice Rápido para o *Ae. aegypti* (LIRAA). Esta metodologia usada na vigilância entomológica faz uma amostragem de imóveis com recipientes de água positivos para a presença de larvas de *Ae. aegypti*. A partir dessa amostragem é feito o cálculo de índices de infestação, como os índices Predial e de Breteau. Os resultados obtidos definem as áreas prioritárias (com maiores índices) para receberem intervenções. A sensibilização e conscientização da população por consequência acontece por meio da informação de dados importantes a respeito dos problemas identificados na sua área, que possam levar a transmissão de arboviroses (MacCormack-Gelles *et al.* 2020; Ribeiro *et al.* 2021; Brasil 2022). Entretanto, alguns estudos mostram eficácia limitada desse método baseado em densidade larvar usado pela vigilância atual. MacCormack-Gelles *et al.* (2020) e Leandro *et al.* (2022) em suas pesquisas mostraram relação ruim (ou nenhuma relação) entre os índices aferidos pelo LIRAA e a previsão de escala e localização da transmissão da dengue. Embora esses índices tenham uma ampla utilização para levantamento de dados entomológicos, a frequência necessária para uma vigilância adequada gera altos custos. Além disso, esses índices não levam em conta a produtividade diferencial encontrada nos recipientes, e sim a presença ou ausência de larvas, sendo considerado um indicador fraco da densidade de mosquitos adultos (MacCormack-Gelles *et al.* 2020; Leandro *et al.* 2022).

Apesar dos esforços das instituições públicas de saúde e também dos centros de pesquisa, estabelecer um sistema de controle eficaz e sustentável do mosquito *Ae. aegypti* é uma tarefa árdua. Em muitos países, como o Brasil, ainda se encontra uma vulnerabilidade socioambiental, onde muitas pessoas habitam locais em situações precárias de saneamento básico. Somado a isso, há o crescimento desordenado nas grandes cidades devido a urbanização acelerada. Estes cenários propiciam grande disponibilidade de criadouros, viabilizando a proliferação de mosquitos *Ae. aegypti* em diferentes áreas (Lima-Camara *et al.* 2006; Ribeiro *et al.* 2021; Brasil 2022; Leandro *et al.* 2022). Além disso, hoje se vê o grande impacto causado pelas mudanças climáticas em função do aquecimento global, que acabam por alterar os ciclos das chuvas e promover o aumento das temperaturas. Estes dois últimos fatores influenciam

diretamente no ciclo de transmissão de dengue, visto que promovem a aceleração do desenvolvimento do vetor, facilitando a manutenção do mesmo em altas densidades. Isso conseqüentemente acelera o PIE do vírus em mosquitos infectados, visto que esse tempo também é influenciado por altas temperaturas (Tjaden *et al.* 2013). Além disso, há a ampliação de sua distribuição, inclusive para áreas em que antes não se encontrava o vetor (Iwamura *et al.* 2020; Ribeiro *et al.* 2021). Dessa forma, há uma rápida disseminação do vírus, em diferentes regiões, onde o mosquito *Ae. aegypti* está presente.

Sendo assim, a complexidade envolvida na dinâmica de transmissão da dengue exige uma abordagem de vigilância eficaz e oportuna para que um controle eficiente e direcionado para áreas com maior risco seja realizado (MacCormack-Gelles *et al.* 2020). O que tem se visto de mais promissor é a Vigilância Integrada (VI), que pode envolver dois ou mais tipos de vigilância, como a virológica/genômica, entomológica e epidemiológica. A pesquisa dos entes envolvidos na dinâmica de arboviroses (vírus, vetor e hospedeiro) feita de forma simultânea gera resultados mais consistentes e confiáveis para se estabelecer uma relação entre a previsão e a realidade do risco de transmissão em determinada região. Assim, propicia um cenário fidedigno da complexidade existente em comparação ao obtido em estudos isolados, nos quais se estudam variáveis com apenas um foco, não integradas com outras fontes de variação ou formas de vigilância (Guzman *et al.* 2010; Maciel-de-Freitas *et al.* 2012; Mustafa *et al.* 2015; Leandro *et al.* 2022; Leandro *et al.* 2022). Nos anos de 2014-2016, foi realizada a vigilância do ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti* coletados na cidade do Rio de Janeiro, onde por meio da PCR foi possível detectar a presença do arbovírus nos mosquitos antes mesmo do primeiro caso autóctone da doença ser diagnosticado na cidade (Calvet *et al.* 2016; Ayllón *et al.* 2017). Leandro e colaboradores (2022), recentemente, demonstraram que índices baseados na captura de adultos, geram resultados de previsão de surtos de dengue mais altos em comparação com os índices de pesquisa de larvas adotados, mencionados anteriormente. Os mosquitos adultos da espécie *Ae. aegypti* são triados e submetidos a análise por RT-qPCR para detecção de infecção ou não por arbovírus. Dessa forma, se estabelece um método de vigilância entomoviroológica que promove a identificação de áreas críticas e as direciona medidas de controle do vetor, para que se evite a tempo a detecção de casos humanos (Leandro *et al.* 2022). Entretanto, essa estratégia integrada apresenta dificuldades em ser aplicada como componente de uma vigilância de rotina a longo prazo. Além do alto custo envolvido, sabe-se que há uma demanda muito grande de amostras que chegam para serem processadas, gerando uma demora

no fornecimento dos dados. Dessa maneira, o alerta precoce não é possível, visto que a detecção dos arbovírus em estágios iniciais da transmissão muitas vezes se torna inviável.

Por isso, é importante que cada vez mais se estude novas técnicas que auxiliem de forma satisfatória o monitoramento de arbovírus (assim como de outros patógenos) pelo mundo. A utilização da NIRS como uma técnica integrada ao plano de vigilância e não somente como uma técnica exclusiva para diagnóstico, permitiria que centenas de amostras fossem rastreadas e diagnosticadas em um curto espaço de tempo. Tudo isso podendo ser realizado por um corpo técnico, visto a facilidade de manuseio do equipamento NIR (Fernandes *et al.* 2018; Garcia *et al.* 2022 submetido; Santos *et al.* 2021; Brasil 2022; Leandro *et al.* 2022). Dessa forma, promoveria a detecção rápida do vírus dengue em mosquitos, possibilitando o apontamento de potenciais áreas de transmissão para onde as medidas de controle do vetor devam ser aplicadas e/ou reforçadas. Medidas como o uso de larvicidas e inseticidas e a remoção ou alteração de criadouros do *Ae. aegypti* são as mais comuns (Brasil 2022). Entretanto, abordagens modernas como por exemplo a liberação de mosquitos com a bactéria *Wolbachia* é uma medida de controle vetorial que vem ganhando cada vez mais destaque, onde vê-se a redução da capacidade dos mosquitos de transmitir arbovírus como o DENV (WMP 2022).

Diferente de outros arbovírus como o ZIKV, o DENV possui um nível maior de dificuldade para que se encontre técnicas sensíveis (além da RT-qPCR) em fornecer um diagnóstico de forma precisa, visto que existem 4 sorotipos circulantes. Os surtos de dengue, comumente, estão associados à baixa imunidade da população humana local a um sorotipo específico (1-4), que não se encontra em circulação na região há certo tempo (Focks *et al.* 1995). A dengue tem um padrão sazonal e no Brasil a maioria dos casos costuma ocorrer na primeira parte do ano, devido ao clima propício para proliferação do vetor. Porém, na segunda parte do ano, com a diminuição dos casos, o DENV costuma circular de forma silenciosa na natureza (OPAS 2022). Por isso, conseguir uma técnica que forneça o diagnóstico rápido de infecção por DENV, sem distinção por sorotipo, já seria um grande avanço.

Em casos de coinfeção, com mais de um arbovírus envolvido na infecção do vetor também seria de grande utilidade. Apesar de ser um evento pouco conhecido em *Ae. aegypti* na natureza, sabe-se que é possível tanto em condições de laboratório quanto em condições naturais (Rückert *et al.* 2017; Ciota 2019; Novelo *et al.* 2021; Garcia *et al.* 2022 submetido; PAHO 2022). Chaves e colaboradores (2018) viram que a população de mosquitos *Ae. aegypti* de Manaus (Amazonas) foi altamente permissiva à monoinfecção e coinfeção com DENV e

ZIKV, sendo capaz de cotransmitir ambos os vírus por picada. Ainda nesse estudo foi visto que a coinfeção no vetor influenciou fortemente a sua competência, onde o ZIKV apresentou maior taxa de transmissão em relação ao DENV (Chaves *et al.* 2018). Recentemente foi feito um trabalho pelo nosso grupo para detectar por meio da NIRS monoinfecção de DENV e coinfeção de ZIKV e DENV em *Ae. aegypti* da Urca (Rio de Janeiro), criados em laboratório. O isolado usado foi do sorotipo DENV-1 (DENV1/*H sapiens*/Brazil Contagem/MG/MV17/2015), diferente do que usamos neste trabalho. O modelo de predição desenvolvido previu mosquitos infectados somente com DENV com uma sensibilidade de 100% para os conjuntos de treino, validação e teste. No caso de coinfeção com DENV e ZIKV, também apresentou alta sensibilidade preditiva >96% (Garcia *et al.* 2022 submetido). Dessa maneira, a NIRS foi capaz de detectar e diferenciar os arbovírus, tanto em caso de monoinfecção quanto em caso de coinfeção, com altos percentuais de sensibilidade.

Outro estudo recente, mostrou que a NIRS foi capaz de prever com 100% de sensibilidade e de especificidade infecção recente de DENV em mosquitos fêmeas da mesma espécie. Neste estudo foi estabelecida uma comparação entre o diagnóstico feito por NIRS (que obteve o melhor resultado de predição) e feito por espectroscopia no infravermelho médio (MIRS) (Santos *et al.* 2022). A região MIR é definida na faixa espectral de 2500-16000 nm de comprimento de onda, logo após a região NIR e, comumente, é aplicada em estudos que buscam identificar a estrutura vibracional-rotacional das moléculas e seus grupos funcionais. Por isso, os sinais obtidos nessa região média do infravermelho costumam fornecer análises mais detalhadas. Porém, a MIRS é considerada uma técnica invasiva, por conta da manipulação da amostra pré-coleta do espectro, e por isso acaba sendo inadequada para estudos *in vivo* (Goh *et al.* 2021). O autor e seus colaboradores utilizaram um instrumento de transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR), que atua nessa região média (Santos *et al.* 2022). Assim como nós, eles avaliaram os percentuais de sensibilidade e especificidade, porém utilizaram outros métodos de análise, SPA-LDA (algoritmo de projeção sucessiva com análise discriminante linear) e GA-LDA (algoritmo genético com análise discriminante linear), que são técnicas de classificação multivariada.

No presente estudo, nenhum dos modelos de predição desenvolvidos atingiram 100% de acurácia e sensibilidade, mas apoiam os resultados de que a técnica NIRS é capaz de diferenciar amostras infectadas com o DENV – sem distinção por sorotipo – de amostras não infectadas. A análise feita entre esses dois grupos, mostrou que o modelo de predição

apresentou bons percentuais de especificidade e sensibilidade (acima de 80%) em todos os conjuntos, com percentual de acurácia de 81,7% para o conjunto de teste. As moléculas que compõem as amostras utilizadas nesse experimento vibram na mesma ordem de grandeza da frequência de vibração da radiação infravermelha, viabilizando essa interação. A partir disso, a NIRS consegue adquirir informações quantitativas e/ou qualitativas (a qual usamos) dessas amostras escaneadas, a fim de classificá-la. A aplicação da espectroscopia nessa região do infravermelho pode ser considerada praticamente universal, com a utilização de qualquer amostra que seja composta de moléculas contendo ligações C-H, N-H, S-H ou O-H, tendo como base o tipo e a concentração desses compostos para classificação. Assim se obtém um espectro característico para cada espécime analisado (Sikulu *et al.* 2010; Pasquini 2018; Santos *et al.* 2020). As ligações entre esses átomos estão presentes em biomoléculas como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Santos *et al.* 2020), ou seja, moléculas presentes em amostras biológicas como mosquitos e vírus. Dessa forma, a NIRS é capaz de detectar mudanças químicas no padrão de composição das amostras, como alterações metabólicas e/ou fisiológicas que ocorrem no corpo do mosquito frente a infecção por DENV. Essa característica possibilita o diagnóstico diferencial entre amostras infectadas e não infectadas, como foi confirmado nesse estudo. Alterações na expressão de proteínas do intestino médio (Tchankouo-Nguetcheu *et al.* 2010), na expressão de genes envolvidos na regulação de fosfolipídios (Vial *et al.* 2019), na regulação de genes quimiossensoriais do sistema olfativo (Tallon *et al.* 2020) e nos níveis de expressão de genes relacionados ao ovário de fêmeas (Feitosa-Suntheimer *et al.* 2022) são algumas mudanças fisiológicas já relatadas que ocorrem no corpo do *Ae. aegypti* infectado por DENV. Apesar de saber que essas alterações acontecem devido a infecção pelo arbovírus, mais estudos são necessários para o entendimento da relação entre as mudanças metabólicas e fisiológicas e o sorotipo do DENV. Entender se existe ou não um padrão nessas alterações, visto que diferentes cepas são envolvidas nesse processo infectivo, torna a situação mais difícil.

Nas análises restantes, os percentuais de especificidade para o conjunto de teste continuaram bons (acima de 80%), o que mostra que os modelos foram capazes de diferenciar as amostras não infectadas das infectadas com DENV-1 ou DENV-4. Entretanto, para os percentuais de sensibilidade o cenário dos resultados foi diferente. Ao utilizarmos o modelo para prever espectros de amostras dos três grupos de infecção (Controle, DENV-1 e DENV-4) – com distinção por sorotipo –, notou-se pobres acurácias em relação ao conjunto de teste. Para os conjuntos de treinamento e validação os percentuais foram altos (acima de 90%), de maneira

geral, com exceção do conjunto de validação para a análise entre os três grupos. Entretanto, é importante que se considere os resultados de classificação dos espectros encontrados para o conjunto de teste em todas as análises feitas. Isso porque é justamente neste conjunto que os espectros NIR são utilizados para testar a capacidade de predição correta, por serem espectros desconhecidos pelos modelos que foram criados. Sendo assim, o conjunto de teste é o conjunto mais informativo a respeito da aplicação da técnica NIRS para a diferenciação das amostras. De maneira geral, para classificar corretamente os espectros do grupo de amostras infectadas com DENV-1, o modelo de predição obteve percentuais de sensibilidade ruins (inferiores a 60%). Para o grupo de amostras infectadas com o DENV-4 houve uma melhora nos percentuais, principalmente na análise da diferenciação entre os sorotipos do DENV (DENV-1 x DENV-4), onde a sensibilidade do modelo foi de 83,9%. Percebe-se então, que a classificação de amostras infectadas com o sorotipo DENV-4 apresentou melhores resultados em comparação às amostras infectadas pelo sorotipo DENV-1 por meio da técnica NIRS. Porém, apesar dos percentuais de sensibilidade dos modelos para este grupo terem sido maiores, sua acurácia foi pobre, de 74,4%, não sendo suficiente para promover o diagnóstico diferencial consistente entre os sorotipos DENV-1 e DENV-4.

Embora cada vírus apresente sua estrutura característica, pertencentes a diferentes famílias e gêneros, semelhanças na composição e estrutura desses patógenos podem ser observadas, como possuem a natureza de serem compostos principalmente de proteínas. É a partir do contato com as proteínas de superfície de um vírus, que o sistema imunológico é capaz de produzir os anticorpos necessários. E apesar dessas proteínas virais serem específicas para cada tipo de vírus, para um vírus de mesma família – ou um sorotipo do mesmo vírus – elas apresentam alto grau de semelhança (Santos *et al.* 2020). Grande parte da diversidade genética do DENV se deve às altas taxas de mutação que se acumulam no seu processo de replicação. Vírus RNA, como o DENV, possuem enzimas (RNA polimerases), responsáveis pela cópia de seu material genético. Devido a falhas nos mecanismos de reparo dos erros encontrados nessa cópia das sequências de nucleotídeos para a síntese do genoma viral ocorre o aparecimento de mutações. Altas taxas de replicação do vírus podem ser vistas com a crescente densidade populacional do vetor e de hospedeiros que levam a um aumento na taxa de transmissão viral. Além disso, existe o fluxo gênico, facilitado pela grande mobilidade urbana atual que viabiliza a migração/introdução de sorotipos e genótipos em novas áreas geográficas, onde cepas geneticamente distintas já são endêmicas (Chen & Vasilakis 2011; Mustafa *et al.* 2015). Todos esses fatores contribuem de forma direta para a diversidade genética de arbovírus. Apesar dessa

diversidade, os sorotipos do DENV ainda possuem alta semelhança genética, por apresentarem alta homologia entre suas sequências proteicas estruturais, apesar dos milhares de genótipos existentes em cada sorotipo. Cada sorotipo do DENV compartilha cerca de 65% do genoma, diferindo em 25-40% no nível de aminoácidos e com variabilidade nucleotídica inter-sorotípica em 30% (Halstead 2008; Guzman & Harris 2015; Cuypers *et al.* 2018; Tamura *et al.* 2022). Segundo hipótese baseada em uma extensa análise filogenética, os 4 sorotipos do vírus da dengue evoluíram de primatas não humanos (reservatórios). Há milhares de anos houve um salto evolutivo desses ancestrais progenitores silvestres para humanos devido ao agrupamento de cepas silvestres com cepas humanas por conta do crescimento da atividade humana na natureza. Essas cepas (silvestres e humanas) apresentam menos de 20% de divergência ao longo do genoma (Holmes & Twiddy 2003; Mustafa *et al.* 2015). Portanto, essa similaridade entre os sorotipos do vírus pode ter influenciado na baixa precisão do modelo em fornecer um diagnóstico mais sensível por meio dos espectros NIR para diferenciar DENV-1 e DENV-4.

Além da alta semelhança molecular dos sorotipos do DENV, a faixa de comprimento de onda dos espectros utilizada para criação dos modelos pode também explicar as acurácias encontradas. A NIRS é uma técnica que mede o quanto de energia foi absorvida em comprimentos de onda específicos das amostras biológicas, tendo a faixa de absorção dessa energia entre 750 a 2.500 nm. Ou seja, essa absorção varia de acordo com a composição bioquímica daquele organismo, que tem seu espectro de absorção único, como uma impressão digital, fazendo com que a técnica possa ser usada em modelos de classificação. Entretanto, a absorção de energia fora da faixa NIR pode influenciar na análise dos espectros, pois nas regiões iniciais e finais da faixa de comprimento de onda existem ruídos, que não são informativos para classificar aquela determinada amostra (Pasquini 2003; Mayagaya *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2017). Portanto, o pré-processamento dos dados é uma parte importante a ser realizada para que se alcance um melhoramento na relação sinal-ruído e apenas se obtenha informações quimicamente relevantes para a construção do modelo. Porém, ao realizar o pré-processamento, como o corte da faixa espectral, há uma redução na quantidade de informações que serão analisadas posteriormente. Por este motivo, deve-se haver cautela nessa etapa, para que não sejam excluídas informações importantes a respeito da classificação da amostra a ser analisada (Santos *et al.* 2020). Sendo assim, estudos que usam a técnica, buscam definir a região do espectro que seja mais formativa para o tipo de amostra que usam. Liebman e colaboradores (2015), por exemplo, utilizaram a faixa de 700 a 2.350 nm para analisar a influência da dieta na idade de mosquitos *Ae. aegypti* (Liebman *et al.* 2015). Já mais recentemente, Garcia e

colaboradores (2022), em suas análises restringiram a região em 600-1100 nm, onde, de acordo com o estudo, seria uma faixa mais informativa para classificação de *Ae. aegypti* infectados por ZIKV e/ou DENV (Garcia *et al.* 2022 submetido). Já Santos e colaboradores (2022), utilizaram a faixa espectral de 1200-2300 nm, para prever infecção recente com DENV em mosquitos da mesma espécie (Santos *et al.* 2022). Dessa forma, será de grande importância que novas análises dos espectros sejam feitas, com uma faixa espectral que concentre apenas informações do NIR, a fim de ver a influência na acurácia dos modelos no diagnóstico dos sorotipos do DENV.

Ademais, os constituintes das amostras analisadas devem estar presentes no nível de partes por mil ou mais para serem detectados pelo NIRS (Mayagaya *et al.* 2009). Os mosquitos *Ae. aegypti* utilizados no estudo foram criados, infectados e tratados de forma padronizada. Acredita-se então, que o que mais os diferenciam é a ausência ou a presença do DENV-1 ou do DENV-4. Dessa maneira, a carga viral também pode influenciar na leitura do espectro. Pelos nossos resultados é possível notar que as amostras da infecção 2, obtiveram, no geral, cargas virais (Log10, quantificação viral) mais baixas que as amostras do experimento de infecção 1. Como houve um grande desfalque no número amostral devido à exclusão das amostras da infecção 1, optou-se por analisar os modelos de predição utilizando os espectros de maneira total, sem estabelecer uma comparação por categorias, somente por grupos. Essa distinção dos espectros de acordo com as categorias (região do corpo e dpi) foi feita para a análise dos espectros do teste cego, que será discutida adiante. Por este motivo, mesmo as amostras da infecção 2 que obtiveram cargas virais baixas foram usadas para avaliação da predição da técnica NIRS. Na literatura foi visto, que a NIRS foi sensível para detectar espectros de *Ae. aegypti* infectados com DENV-1, a partir de 10^2 cópias virais/mosquito (baixa carga viral), em cabeças/tóraxes e abdomens, com sensibilidade de 100% (Garcia *et al.* 2022 submetido). Algumas amostras do segundo experimento de infecção, porém, obtiveram carga viral abaixo de 10^2 . Talvez essas amostras possam ter influenciado na acurácia dos modelos em prever as amostras infectadas por DENV, visto que não se sabe se a sensibilidade da NIRS se mantém para cargas virais nesse nível (abaixo de 10^2). Tal possibilidade será investigada posteriormente.

Para os espectros excluídos para o teste cego, analisou-se a carga viral das amostras, dessa vez de acordo com o número de ciclos (CT) suficientes para a amplificação do vírus na RT-qPCR. Quanto mais ciclos são necessários, menor é a carga viral das amostras, e quanto menos ciclos, maior é a carga viral. A maior parte dos espectros selecionados de amostras do

grupo DENV-1 tiveram CTs mais baixos, ou seja, mais amostras com alta carga viral. E foi nessa faixa, CT entre 18-25, que houve mais predições corretas dos espectros em relação aos espectros de amostras com baixa carga viral. Já os espectros selecionados de amostras do grupo DENV-4 tiveram sua distribuição de forma igual, tanto para CTs baixos (18-25) quanto para CTs mais altos (25-37). E novamente a maior predição correta ocorreu com espectros de amostras com alta carga viral (CT entre 18-25). Durante o processo de infecção nos mosquitos já foi visto que há um custo no fitness (custos fisiológicos e físicos) associado à replicação de arbovírus (Maciel-de-Freitas *et al.* 2011; Petersen *et al.* 2018). Apesar desse custo, existe uma tolerância frente a essa infecção por parte do mosquito, que possibilita que ele seja um vetor competente para transmitir o patógeno (Oliveira *et al.* 2019). Essa tolerância, entretanto, não significa que ações/mecanismos de resposta do vetor frente a replicação do patógeno em seu corpo não ocorram. Em mosquitos *Ae. aegypti*, a imunidade inata e a microbiota agem juntamente contra o DENV por vias de sinalização antivirais como a via Toll-like, proteínas do tipo complemento e *small RNAs*, por exemplo. Além disso, existem barreiras anatômicas no mosquito, como a barreira de infecção do intestino médio (MIB), as quais o vírus encontra no processo de infecção. Porém, apesar desse controle frente a infecção, o vírus também possui seus mecanismos de escape, o que permite que ele consiga se multiplicar no corpo do vetor (Bennett *et al.* 2002; Sim & Dimopoulos 2010; Mukherjee *et al.* 2019). Dessa maneira a infecção consegue se estabelecer. Esses mecanismos utilizados tanto pelos vetores quanto pelos vírus podem explicar a diferença na carga viral das amostras. Com os resultados obtidos, percebe-se que a técnica NIRS mostrou uma maior capacidade de predição correta para amostras com cargas virais mais altas do que amostras com cargas virais mais baixas.

A avaliação dos dados de acordo com a região do corpo do mosquito e do dpi são importantes para que se possa compreender mais a respeito do PIE dos sorotipos do DENV aqui estudados, o qual tem grande influência na competência vetorial (Chaves *et al.* 2021). Ao analisarmos os espectros NIR em relação ao dpi, consideramos 2 pontos de tempo, de acordo com o PIE do DENV e de sua dinâmica no corpo do *Ae. aegypti*. Esse período é referente ao tempo em que se leva desde o vetor contrair o vírus em um repasto sanguíneo realizado em um humano em estado virêmico até ele estar apto a transmitir o patógeno, quando o mesmo atinge suas glândulas salivares. Apesar da divergência em alguns estudos para determinar este período do vírus em questão, o qual é influenciado pela temperatura do meio em que o vetor se encontra, definimos aqui o PIE entre 10 e 14 dias (Watts *et al.* 1987; Woodring *et al.* 1996; Campanelli 2007; Salazar *et al.* 2007; Chan & Johansson 2012; Tjaden *et al.* 2013; Chaves *et al.* 2021). De

acordo com nossos modelos de predição NIR, o vírus foi previsto com mais precisão em 10 dias, para o sorotipo DENV-1, e já para o sorotipo DENV-4, o grupo que teve a melhor previsão, foi em 14 dias. Um estudo buscou testar se a cinética de replicação (disseminação pelo corpo do vetor) do DENV variou de forma sistemática entre os sorotipos envolvidos na infecção. Observou-se que a proporção de mosquitos infectados foi maior para os sorotipos DENV-1 e DENV-2 em relação aos outros sorotipos, DENV-3 e DENV-4, além de replicarem para níveis mais altos de RNA em períodos pós-infecção mais curtos (Ekwudu *et al.* 2020). Diferente de um estudo feito por Novelo e colaboradores (2019) que viram que cepas de DENV-1 e DENV-2 exigiram menos cópias virais para estabelecer uma infecção tanto em *Ae. aegypti* quanto em *Ae. albopictus*, enquanto as cepas de DENV-3 e DENV-4 exigiram mais cópias (Novelo *et al.* 2019). Porém, o estabelecimento da infecção pelo DENV-1 também já ocorria em dpis mais curtos, que para a infecção pelo DENV-4. Esses resultados podem explicar o baixo percentual de predição correta para o DENV-1 em dpis mais longos, usados nesse estudo. Garcia e colaboradores (2022) ao analisarem a técnica NIRS para predição de DENV-1, viram que em 7 dpi – um período mais curto – melhores resultados de predição foram alcançados (Garcia *et al.* 2022 submetido). Dessa forma, nota-se que a diferença na cinética dos sorotipos também acaba por influenciar os resultados obtidos por meio da leitura dos espectros NIR coletados das amostras infectadas neste experimento com DENV-1 ou DENV-4.

Em relação à região do corpo do mosquito, os grupos de amostras não infectadas e infectadas por DENV-4 mostraram melhores resultados de predição do modelo na região da cabeça/tórax. Enquanto o grupo de amostras infectadas pelo sorotipo DENV-1 teve o mesmo resultado de predição positiva nas duas regiões, apenas 3 espectros. No trabalho de Garcia *et al.* (2022), a melhor precisão da predição dos espectros de amostras infectadas pelo DENV-1, de maneira geral, foi na região do abdômen. Em cabeças/tórax, o vírus foi detectado com mais precisão no período de incubação de 7 dias e com menos precisão em um período maior de incubação, 10 ou 14 dias. Isto se repete para o abdômen, onde o vírus também foi previsto com mais precisão em 7 dpi (Garcia *et al.* 2022 submetido). Santos *et al.* (2022) coletou espectros apenas da região abdominal do mosquito, tendo bons resultados de predição com a coleta feita em apenas 1 hora após a infecção desses mosquitos com DENV (Santos *et al.* 2022). Quando o mosquito contrai o vírus, ele inicialmente vai para o intestino médio, antes de se disseminar para outras regiões do corpo. Na análise entre as regiões do corpo do vetor, nós não analisamos de forma comparada aos dpis, para observar a influência na predição dos espectros entre essas duas categorias. Porém, como 10 e 14 dpi são períodos de tempo maiores em comparação a 1

hora e a 7 dpi, acreditamos que isso explique os resultados aqui obtidos, com melhor predição na região da cabeça/tórax ao invés de abdômen. É importante salientar que o N de espectros utilizados para as análises do teste cego foi baixo e sabe-se que a robustez de modelos de predição é de certa forma dependente de um bom número amostral. Dessa maneira, pretendemos repetir as análises referentes às categorias aqui estudadas (região do corpo e dpi) com um N amostral maior. Além da realização de novas análises, que estabeleçam uma comparação entre as categorias selecionadas.

A suscetibilidade de um mosquito a um arbovírus é dependente de diferentes fatores, inclusive do sorotipo/genoma do DENV envolvido na infecção (Chaves *et al.* 2021). A evolução molecular do DENV apresenta um grande impacto na sua virulência para o homem e na epidemiologia da dengue em todo o mundo. Por isso, é fundamental que haja o conhecimento a respeito do sorotipo circulante junto ao monitoramento/mapeamento do deslocamento do vírus para diferentes áreas geográficas (Rico-Hesse *et al.* 1997; Rico-Hesse 2009; Silva 2013). Nesse presente trabalho, espectros de infravermelho próximo coletados de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com dois sorotipos do DENV e não infectadas foram utilizados para construir modelos de predição, a fim de poder diferenciar estes grupos. De maneira geral observou-se que os melhores resultados de predição ocorreram nos conjuntos de treinamento, no qual haviam espectros conhecidos e usados para criação do modelo. Porém, no conjunto de teste, esses resultados não se mostram tão consistentes, com acurácias mais baixas. Apesar de não ter se observado uma alta sensibilidade para promover a diferenciação dos sorotipos, é importante salientar que este é o primeiro estudo que visa esta proposta por meio da técnica NIRS. Novas análises com os espectros coletados de cada grupo devem ser feitas, a fim de se obter resultados mais consistentes. Ademais, de acordo com artigos recentes, o presente estudo mostrou que a técnica é capaz de detectar e diferenciar amostras infectadas com DENV de amostras não infectadas, com bons percentuais de acurácia, sensibilidade e especificidade >80%.

Sendo assim, o conjunto de dados do presente trabalho sugere que o uso inicial da NIRS como uma técnica de diagnóstico para o DENV é viável, podendo atuar como uma técnica de triagem, pré análise molecular (RT-qPCR). Mosquitos coletados para análise, seriam avaliados primeiramente pela NIRS, a fim de apontar quais são positivos para infecção por DENV. As amostras positivas, seriam encaminhadas para a análise mais sensível por RT-PCR, para comprovar a infecção e também identificar o sorotipo envolvido. Dessa forma obtém-se uma grande economia de recursos financeiros e de tempo. Todavia, como já mencionado, para criar

mais robustez aos modelos de predição aqui feitos, novas análises devem ser realizadas. Como por exemplo a comparação da predição dos espectros entre as categorias “região do corpo” e “dpi”, além do aumento do N amostral. Sabe-se que as técnicas de espectroscopia vibracional são suscetíveis a sutis variações que possam ocorrer na composição química de uma amostra e por esse motivo são promissoras para serem aplicadas na área virológica (Santos *et al.* 2020). Portanto, é importante que cada vez mais estudos que envolvam a NIRS sejam realizados e aprimorados. Gradativamente se veem trabalhos na área entomológica envolvendo a técnica, entretanto ainda se trata de uma aplicação recente, principalmente envolvendo a área entomoviológica.

6. Conclusão

Pode-se concluir que o modelo de predição por meio de espectros NIR apresentou dificuldade em diferenciar os sorotipos envolvidos na infecção de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* criados e mantidos em laboratório. Sabe-se da semelhança molecular entre os sorotipos do DENV, e que talvez esse tenha sido um dos motivos para a baixa sensibilidade de classificação dos espectros. Entretanto, o sorotipo DENV-4 mostrou resultados mais consistentes em relação ao sorotipo DENV-1, com mais espectros preditos corretamente, e isso pode ser referente ao tempo pós infecção. Acredita-se que o DENV-1 precise de menos tempo para atingir seu pico de infecção em comparação ao DENV-4, que necessita de mais tempo, e os momentos em que as amostras foram analisadas (10 e 14 dias) em comparação a outros estudos, foram espaços de tempo maiores. Embora novas análises precisem ser feitas a fim de promover ajustes nos modelos de predição dos espectros NIR para terem maior robustez, acredita-se que os resultados aqui obtidos já são de grande valia. É a primeira vez que um estudo, por meio da NIRS, tenta diferenciar os sorotipos da dengue em mosquitos *Ae. aegypti*.

Além disso, apoiando resultados encontrados em estudos recentes com a NIRS, o modelo de predição foi capaz de diferenciar mosquitos infectados por DENV – sem distinção por sorotipo – de mosquitos não infectados, com boa acurácia. Dessa maneira, acreditamos que em um futuro próximo a NIRS possa ser usada pelos programas de vigilância como uma técnica de diagnóstico, com a finalidade de triagem de amostras infectadas por arbovírus de amostras não infectadas. Essa aplicação já seria de grande utilidade, com um melhor direcionamento dos espécimes a serem analisados por técnicas moleculares de alta sensibilidade, como a RT-PCR. Com isso haveria uma significativa economia de recurso e tempo, o que ajudaria países pouco desenvolvidos e endêmicos para a dengue a conseguirem melhorar a qualidade e oportunidade de seus dados, acelerando as respostas aos surtos da doença. Sabe-se que existem grandes desafios para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos, ainda mais no tange o cenário com arbovírus. Porém, vê-se cada vez mais resultados promissores com a técnica NIRS em estudos envolvendo as áreas da virologia, entomologia e epidemiologia.

7. Referências bibliográficas

Achee NL, Gould F, Perkins TA, Reiner RC, Morrison AC, Ritchie SA, Gubler DJ, Teyssou R, Scott TW. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(5): e0003655.

Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(5): 886-92.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005; 5(2): 209-19.

Ayllón T, Campos RM, Brasil P, Morone FC, Câmara DCP, Meira GLS, Tannich E, Yamamoto KA, Carvalho MS, Pedro RS, Schmidt-Chanasit J, Cadar D, Ferreira DF, Honório NA. Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(8): 1411–1412.

Bale G, Elwell CE, Tachtsidis I. From Jöbsis to the present day: A review of clinical near-infrared spectroscopy measurements of cerebral cytochrome-c-oxidase. *J. Biomed. Opt*. 2016; 21(9): 091307.

Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, Cuadra R, Rocha J, Pérez MA, Silva S, Rocha C, Harris E. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 74(3): 449–456.

Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud. av*. 2008; 22 (64): 53-72.

BBC News Brasil. Zika vírus pode estar a um passo de novo surto global. Disponível em <<https://www.bbc.com/portuguese/internacional-61088444>>. Acesso em 16 de abr. de 2022.

Bennett KE, Olson KE, Munoz ML, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, Black WC, Beaty BJ. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(1): 85-92.

Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64: 115-37.

Bezerra JMT, Sousa SC, Tauil PL, Carneiro M, Barbosa DS. Entry of dengue virus serotypes and their geographic distribution in Brazilian federative units: a systematic review. *Rev Bras Epidemiol.* 2021; 24: E210020.

BIOMAX – Manejo Ecológico de Pragas. Novo Larvicida Biológico Elimina Larvas do *Aedes aegypti*. 2022. Disponível em <<https://www.biomax-mep.com.br/novo-larvicida-biologico-elimina-larvas-do-aedes-aegypti/>>. Acesso em 25 de out. de 2022.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013; 496(7446): 504–507.

Bona ACD, Twerdochlib AL, Navarro-Silva MA. Detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos. *Bol Mal Salud Amb.* 2011; 51(2): 107-116.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde.* 2007; 16(2): 113-118.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 53(34). 2022. Disponível em <[file:///C:/Users/Samsung/Downloads/Boletim_epidemiologico_SVS_34%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Samsung/Downloads/Boletim_epidemiologico_SVS_34%20(1).pdf)>. Acesso em 10 de nov. de 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 53(41). 2022. Disponível em <[file:///C:/Users/Samsung/Downloads/Boletim%20Epidemiol%C3%B3gico%20Vol.53%20N%C2%BA41%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Samsung/Downloads/Boletim%20Epidemiol%C3%B3gico%20Vol.53%20N%C2%BA41%20(1).pdf)>. Acesso em 10 de nov. de 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento/Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 2002. 20 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - 2. ed. rev. - Brasília: Ministério da Saúde, 2008; 197 p.: il. - (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 21).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Plano de contingência para resposta às emergências em Saúde Pública por dengue, chikungunya e Zika [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2022; 44 p.

Burns DA, Ciurczak EW. Handbook of Near-Infrared Analysis. CRC press. 2007; 3: 834 p.

Cabrini I. Avaliação de repelentes eletrônicos e estudos quanto à eficiência de transposição de telas, utilizando-se *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1854) (Diptera: Culicidae). 2005. 119 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Cabrini I, Andrade CFS. Resposta de fêmeas de mosquitos ao hospedeiro - busca por alimentação sanguínea - uma revisão. Página na internet: Ecologia Aplicada - Instituto de Biologia da UNICAMP. Disponível em: <https://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm>. 2006.

Calvet GA, Filippis AM, Mendonça MC, Sequeira PC, Siqueira AM, Veloso VG, Nogueira RM, Brasil P. First detection of autochthonous Zika virus transmission in a HIV-infected patient in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Virol. 2016; 74: 1–3.

Campanelli ES. O desenvolvimento de um processo de infecção do *Aedes aegypti* pelo vírus dengue: caracterização da interação do vírus com uma população de mosquitos autóctones. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2007.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol. 1990; 44: 649-88.

Chan M, Johansson MA. The Incubation Periods of Dengue Viruses. PLoS One. 2012; 7(11): e5097.

Chaves BA, Godoy RSM, Campolina TB, Vieira Junior AB, Paz AC, Vaz EBC, Silva BM, Nascimento RM, Guerra MGVB, Lacerda MVG, Monteiro WM, Secundino NFC, Pimenta PFP. Dengue Infection Susceptibility of Five *Aedes aegypti* Populations from Manaus (Brazil) after Challenge with Virus Serotypes 1–4. Viruses. 2021; 14 (20): 2-17.

Chaves BA, Orfano AS, Nogueira PM, Rodrigues NB, Campolina TB, Nacif-Pimenta R, Pires ACAM, Vieira Júnior AB, Paz AC, Vaz EBC, Guerra MGVB, Silva BM, Melo FF, Norris DE, Lacerda MVG, Pimenta PFP, Secundino NFC. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. J Infect Dis. 2018; 218:563–571.

Chen R, Vasilakis N. Dengue — Quo tu et quo vadis? Viruses. 2011; 3(9): 1562-1608.

Chen Y, Li N, Lourenço J, Wang L, Cazelles B, Dong L, Li B, Liu Y, Jit M, Bosse NI, Abbott S, Velayudhan R, Wilder-Smith A, Tian H, Brady OJ. Measuring the effects of COVID-19-related disruption on dengue transmission in southeast Asia and Latin America: a statistical modeling study. Lancet Infect Dis. 2022; 22: 657–67.

Christophers SR. *Aedes aegypti* (L.), the Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics and Structure. Cambridge University Press, London, 1960. 739 p.

Ciota AT. The role of co-infection and swarm dynamics in arbovirus transmission. Virus Res. 2019; 265: 88–93.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p.

Costa CA, Santos IGC, Barbosa MG. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(6): 677-681.

Crovello TJ, Hacker CS. Evolutionary strategies in life table characteristics among feral and urban strains of *Aedes aegypti* (L.). Evolution. 1972; 26(2):185-96.

Cuypers L, Libin PJK, Simmonds P, Nowé A, Muñoz-Jordán J, Alcantara LCJ, Vandamme AM, Santiago GA, Theys K. Time to Harmonize Dengue Nomenclature and Classification. *Viruses*. 2018; 10: 569.

Day JF, Edman JD, Scott TW. Reproductive fitness and survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) maintained on blood, with field observations from Thailand. *J Med Entomol*. 1994; 31: 611-617.

Dos Santos TP, Cruz OG, Da Silva KAB, De Castro MG, De Brito AF, Maspero RC, De Alcântara R, Dos Santos FB, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Dengue serotype circulation in natural populations of *Aedes aegypti*. *Acta Trop*. 2017; 176:140-143.

Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, Huy R, Tarantola A, Scott TW, Sakuntabhai A, Buchy P. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(47): 14688–14693.

Dutra HLC. Uso da cepa wMel de *Wolbachia* como forma alternativa de controle do vírus Zika [Tese]. Centro de Pesquisas René Rachou: Fundação Oswaldo Cruz; 2017.147 p.

Dzul-Manzanilla F, Correa-Morales F, Che-Mendoza A, Palacio-Vargas J, Sánchez-Tejeda G, González-Roldan JF, López-Gatell H, Flores-Suárez AE, Gómez-Dantes H, Coelho GE, Bezerra HSS, Pavia-Ruz N, Lenhart A, Manrique-Saide P, Vazquez-Prokopec GM. Identifying urban hotspots of dengue, chikungunya, and Zika transmission in Mexico to support risk stratification efforts: a spatial analysis. *Lancet Planet Health*. 2021; 5: e277–85.

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. Geographical distribution of dengue cases reported worldwide, 2020. Disponível em <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/geographical-distribution-dengue-cases-reported-worldwide-2020>>. Acesso em 12 de abr. de 2022.

Ekwudu O, Marquart L, Webb L, Lowry KS, Devine GJ, Hugo LE, Frentiu FD. Effect of Serotype and Strain Diversity on Dengue Virus Replication in Australian Mosquito Vectors. *Pathogens*. 2020; 9: 668.

Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2009; 104(1): 124-126.

Feitosa-Suntheimer F, Zhu Z, Mameli E, Dayama G, Gold AS, Broos-Caldwell A, Troupin A, Rippee-Brooks M, Corley RB, Lau NC, Colpitts TM, Londoño-Renteria B. Dengue Virus-2 Infection Affects Fecundity and Elicits Specific Transcriptional Changes in the Ovaries of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Front Microbiol.* 2022; 13: 886787.

Fernandes JN, Santos LMB, Chouin-Carneiro T, Pavan MG, Garcia GA, David MR, Beier JC, Dowell FE, Maciel-de-Freitas R, Sikulu-Lord MT. Rapid, noninvasive detection of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes by near-infrared spectroscopy. *Sci. Adv.* 2018; 4(5), eaat0496.

Ferreira AC, Neto FC. Infestação de área urbana por *Aedes aegypti* e relação com níveis socioeconômicos. *Rev Saúde Pública.* 2007; 41(6): 915-22.

Fleck L, Tavares MHF, Eyng E, Helmann AC, Andrade MAM. Redes Neurais Artificiais: Princípios Básicos. *Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia UTFPR.* 2016; 1(13): 47-57.

Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53(5): 489-506.

Forattini OP. *Ecologia, Epidemiologia e Sociedade.* São Paulo: Artes Médicas. 1992.

Forato LA, Bernardes-Filho R, Osiro D, Bicudo TC, Colnago LA. *A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações.* São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária. 2010. 14 p.

Funasa - Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. *Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.* Brasília. 2001. 3: 84 p.

Gadelha DP, Toda AT. *Biologia e comportamento do Aedes aegypti.* *Rev Bras Malariol Doenças Trop.* 1985; 37: 29-36.

Godói IP, Lemos LLP, Araújo VE, Bonoto BC, Godman B, Guerra Júnior AA. CYD-TDV dengue vaccine: systematic review and meta-analysis of efficacy, immunogenicity and safety. *J Comp Eff Res.* 2017; 6(2): 165-180.

Goeldi EA. Os mosquitos no Pará. Reunião de quatro trabalhos sobre os mosquitos indígenas, principalmente as espécies que molestem o homem. Pará, Brazil, C. Wiegandt. 1905. 154 p.

Goh B, Ching K, Soares-Magalhães RJ, Ciocchetta S, Edstein MD, Maciel-de-Freitas R, Sikulu-Lord MT. The application of spectroscopy techniques for diagnosis of malaria parasites and arboviruses and surveillance of mosquito vectors: A systematic review and critical appraisal of evidence. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15(4): e0009218.

Goh B, Visendi P, Lord AR, Ciocchetta S, Liu W, Sikulu-Lord MT. First Report of the Detection of DENV 1 Virus in Human Blood Plasma with Near-Infrared Spectroscopy. *Viruses*. 2022, 14: 2248.

Gomes AC. Vigilância Entomológica. Informe Epidemiológico do SUS. 2002; 11(2) : 79 - 90.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(3): 480-496.

Gubler DJ. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21(st) century. *Trop Med Health*. 2011; 39(4): 3–11.

Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002; 10(2): 100-3.

González-Himénez M, Babayan SA, Khazaeli P, Doyle M, Walton F, Reedy E, Glew T, Viana M, Ranford-Cartwright L, Niang A, Siria DJ, Okumu FO, Diabaté A, Ferguson HM, Baldini F, Wynne K. Prediction of mosquito species and population age structure using mid-infrared spectroscopy and supervised machine learning. *Wellcome Open Res*. 2019; 4: 76.

Gu W, Novak RJ. Short report: Detection probability of arbovirus infection in mosquito populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71(5): 636–638.

Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 2015; 385: 453–465.

Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 18(2): 16055.

- Halstead SB. Dengue Virus–Mosquito Interactions. *Annu Rev Entomol.* 2008; 53: 273–91.
- Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol.* 2017; 1546: 125-133.
- Herschel W. Experiments on the Refrangibility of the Invisible Rays of the Sun. *Philos Trans R Soc.* 1800; 90: 284–292.
- Holmes EC. Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. *Brit Med Bull.* 1998; 54: 533-543.
- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003; 3(1), 19–28.
- Hu SF, Li M, Zhong LL, Lu S, Liu Z, Pu J, Wen J, Huang X. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4. *BMC Microbiol.* 2015; 15(1): 1-15.
- Huang H, Yu H, Xu H, Ying Y. Near Infrared Spectroscopy for on/in- Line Monitoring of Quality in Foods and Beverages: A Review. *J Food Eng.* 2008; 87(3): 303–313.
- Iwamura T, Guzman-Holst A, Murray KA. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nat Commun.* 2020; 11: 2130.
- Jobling B, Lewis DJ. Anatomical drawings of biting flies. London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust. 1987; 49-68.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10), 4977-83.
- Johnson JB, Naiker M. Seeing red: A review of the use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in entomology. *Appl Spectrosc Rev.* 2019; 1-30.
- Kawamura T. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um Teste. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 79(4): 437-41.

Krajacich B, Meyers JI, Alout H, Dabiré RK, Dowell FE, Foy BD. Analysis of near infrared spectra for age-grading of wild populations of *Anopheles gambiae*. *Parasit Vectors*. 2017; 10: 552.

Kramer LD, Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol*. 2015; 15: 112–118.

Kramer LD, Ebel GD. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res*. 2003; 60: 187-232.

Kuczera D, Bavia L, Mosimann ALP, Koishi AC, Mazzarotto GACA, Aoki MN, Mansano AMF, Tomeleri EI, Costa Junior WL, Miranda MM, Sarzi ML, Pavanelli WR, Conchon-Costa I, Santos CND, Bordignon J. Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. *Virol J*. 2016; 13: 93.

Leandro AS, Castro WAC, Lopes RD, Delai RM, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R. Citywide Integrated *Aedes aegypti* Mosquito Surveillance as Early Warning System for Arbovirus Transmission, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2022; 28(4): 707-716.

Leandro AS, Britto AS, Rios JA, Galvão SR, Kafka R, Oliveira WF, Neto OF, Silva I, Delai RM, Gonçalves DD, Svoboda WK, Rivas AV, Lopes RD, Trench FJP, Castro WAC, Sibim AC, Ribas LFO, Gois FR, Vieira RFC, Biondo AW. Molecular Detection of Dengue Virus in Mosquitoes as an Early Indicator to Aid in the Prevention of Human Infection in Endemic Areas. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2020; 20(1): 54-59.

Leandro AS, Lopes RD, Martins CA, Delai RM, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R. Entomo-virological surveillance followed by serological active survey of symptomatic individuals is helpful to identify hotspots of early arbovirus transmission. *Front Public Health*. 2022; 10: 1024187.

Leur SWV, Heunis T, Munnur D, Sanyal S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*. 2021; 12(1): 2814-2838.

Licínio COL, Ayres FM. O uso de PCR em tempo real em diagnósticos de arboviroses: revisão integrativa. *J Bras Patol Med Lab*. 2021; 57: 1-9.

Liebman K, Swamidoss I, Vizcaino L, Lenhart A, Dowell F, Wirtz R. The Influence of Diet on the Use of Near-Infrared Spectroscopy to Determine the Age of Female *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 92: 1070–1075.

Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Peixoto AA. Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. *PLoS ONE.* 2011; 6(3): e17690.

Lima-Camara TN, 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: 2079-2084.

Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, Li XF, Zhang R, Wang T, Qin CF, Wang P, Shi PY, Cheng G. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature.* 2017; 545: 482–486.

Liu X, Tian S, Tao F, Yu W. A review of artificial neural networks in the constitutive modeling of composite materials. *Compos. B: Eng.* 2021; 109152.

MacCormack-Gelles B, Neto ASL, Sousa GS, Nascimento OJ, Castro MC. Evaluation of the usefulness of *Aedes aegypti* rapid larval surveys to anticipate seasonal dengue transmission between 2012–2015 in Fortaleza, Brazil. *Acta Trop.* 2020; 205: 105391.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Struchiner CJ, Valle D, O’neill S, Moreira LA. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne disease in Latin America? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2012; 107(6): 828-829.

Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, Lima JBP, Martins AJ, Coelho GE, Valle D. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS ONE.* 2014; 9(3): e92424.

Maciel-de-Freitas R, Koella JC, Lourenço-de-Oliveira R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105(8): 452-8.

Maciel-de-Freitas R, Lourenço-de-Oliveira R. Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2009; 43(1): 8-12.

Maciel-de-Freitas R, Sylvestre G, Gandini M, Koella JC. The Influence of Dengue Virus Serotype-2 Infection on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Motivation and Avidity to Blood Feed. *PLoS ONE*. 2013; 8(6): e65252.

Martins M, Ramos LFC, Murillo JR, Torres A, Carvalho SS, Domont GB, Oliveira DMP, Mesquita RD, Nogueira FCS, Maciel-de-Freitas R, Junqueira M. Comprehensive Quantitative Proteome Analysis of *Aedes aegypti* Identifies Proteins and Pathways Involved in *Wolbachia pipientis* and Zika Virus Interference Phenomenon. *Front Physiol*. 2021; 12: 642237.

Mayagaya VS, Michel K, Benedict MQ. Non-destructive determination of age and species of *Anopheles gambiae* s.l. using near-infrared spectroscopy. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 81: 622–630.

Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9: 800–809.

Monolito nimbus. Redes Neurais Artificiais. 2017. Disponível em <<https://www.monolitonimbus.com.br/redes-neurais-artificiais/>>. Acesso em 10 de out. de 2022.

Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PloS Negl Trop Dis*. 2014; 8(9): e3167.

Mukherjee D, Das S, Begum F, Mal S, Ray U. The Mosquito Immune System and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. *Pathogens*. 2019; 8(2): 77.

Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am*. 1990; 262(4): 56-65.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India*. 2015; 71: 67-70.

Mutero CM, Schlodder D, Kabatereine N, Kramer R. Integrated vector management for malaria control in Uganda: knowledge, perceptions and policy development. *Malar J.* 2012; 11: 21.

Natal D. Biologia do *Aedes aegypti*. *Biológico.* 2002; 64: 205-207.

Niazkar HR, Niazkar M. Application of artificial neural networks to predict the COVID-19 outbreak. *Glob Health Res Policy.* 2020; 5: 50.

Novelo M, Audsley MD, McGraw EA. The effects of DENV serotype competition and coinfection on viral kinetics in *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit Vectors.* 2021; 14: 314.

Novelo M, Hall MD, Pak D, Young PR, Holmes EC, McGraw EA. Intra-host growth kinetics of dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* 2019; 15(12): e1008218.

Nunes PCG, Daumas RP, Sánchez-Arcila JC, Nogueira RMR, Horta MAP, Dos Santos FB. 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. *BMC Public Health.* 2019; 19: 329.

Oliveira, JH, Bahia AC, Vale PF. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? *Dev Comp Immunol.* 2019; 103: 103514.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. Dengue. 2022. Disponível em <<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>>. Acesso em 19 de mar. de 2022.

Osanaí CH. A epidemia de Dengue em Boa Vista, território Federal de Roraima, 1981-1982 [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública. 1984.

Pasquini C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *J. Braz. Chem. Soc.* 2003; 14(2): 198-219.

Pasquini C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. *Anal Chim Acta.* 2018; 1026: 8-36.

PAHO – Pan American Health Organization / WHO – World Health Organization. Dengue. Disponível em <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en.html>>. Acesso em 10 de nov. de 2022.

PAHO – Pan American Health Organization / WHO – World Health Organization. Integrated Management Strategy for Dengue Prevention and Control in the Region of the Americas. Washington, D.C. 2018. Disponível em <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34860/PAHOCHA17039_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y>. Acesso em 27 de mar. de 2022.

Passos MNP, Santos LCJG, Pereira MRR, Casali CG, Fortes BPMD, Valencia LIO, Alexandre AJ, Medronho RA. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37(4): 293-295.

Perez-Mendoza J, Dowell FE, Broce AB, Throne JE, Wirtz RA, Xie F, Fabrick JA, Baker JE. Chronological Age-Grading of House Flies by Using Near-Infrared Spectroscopy. *J Med Entomol.* 2002; 39: 499–508.

Petersen MT, Silveira ID, Tátilla-Ferreira A, David MR, Chouin-Carneiro T, Wouwer LVD, Maes L, Maciel-de-Freitas R. The impact of the age of first blood meal and Zika virus infection on *Aedes aegypti* egg production and longevity. *PLoS ONE.* 2018; 13(7): e0200766.

Polo TCF, Miot HA. Aplicações da curva ROC em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras.* 2020; 19: e20200186.

Prieto N, Pawluczy O, Dugan MER, Aalhus JL. A Review of the Principles and Applications of Near-Infrared Spectroscopy to Characterize Meat, Fat, and Meat Products. *Appl Spectrosc.* 2017; 71(8): 3702817709299.

Reeves WK, Peiris KHS, Scholte EJ, Wirtz RA, Dowell FE. Age-grading the biting midge *Culicoides sonorensis* using near-infrared spectroscopy. *Med. Vet. Entomol.* 2010; 24(1): 32-7.

Regla-Nava JA, Wang Y, Fontes-Garfias CR, Liu Y, Syed T, Susantono M, Gonzalez A, Viramontes KM, Verma SK, Kim K, Landeras-Bueno S, Huang C, Prigozhin DM, Gleeson JG, Terskikh AV, Shi P, Shresta S. A Zika virus mutation enhances transmission potential and confers escape from protective dengue virus immunity. *Cell Rep.* 2022; 39: 110655.

Ribeiro MS, Ferreira DF, Azevedo RC, Santos GBG, Medronho RA. Índices larvais de *Aedes aegypti* e incidência de dengue: um estudo ecológico no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública. 2021; 37(7): e00263320.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology. 1997; 230: 244–251.

Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. J Pharm Biomed Anal. 2007; 44: 683–700.

Romeiro MF, Souza WM, Tolardo AL, Vieira LC, Colombo TE, Aquino VH, Nogueira ML, Figueiredo LTM. Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2016; 49(03): 279-285.

Rückert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, Murrieta RA, Fauver JR, Ebel GD. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. Nat. Commun. 2017; ;8(1): 15412.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiol. 2007; 7(9), 1-13.

Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, Medina F, Colón C, Margolis H, Muñoz-Jordán JL. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. PLOS Negl Trop Dis. 2013; 7(7): e2311.

Santos EAT, Lopo M, Páscoa RNMJ, Lopes JA. A Review on the Applications of Portable Near-Infrared Spectrometers in the Agro-Food Industry. Appl Spectrosc. 2013; 1215-1233.

Santos LM. Monitoramento da dessorção de água na madeira por espectroscopia no infravermelho próximo. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Pós-

Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, área de concentração em Utilização da Madeira como Matéria-Prima. 2017. 56 p.

Santos LMB, Mutsaers M, Garcia GA, David MR, Pavan MG, Petersen MT, Corrêa-Antônio J, Couto-Lima D, Maes L, Dowell F, Lord A, Sikulu-Lord M, Maciel-de-Freitas R. High throughput estimates of *Wolbachia*, Zika and chikungunya infection in *Aedes aegypti* by near-infrared spectroscopy to improve arbovirus surveillance. *Commun Biol.* 2021; 4(1): 67.

Santos LMB. Utilização da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS) na detecção de arbovírus e bactéria *Wolbachia pipientis* Hertig (1936) em mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762). Tese (Doutorado), Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária. 2020. 81 p.

Santos MCD, Morais CLM, Lima KMG, Martin FL. Vibrational spectroscopy in protein research toward virus identification: challenges, new research, and future perspectives. *Vibrational Spectroscopy in Protein Research.* Elsevier. 2020; 315–335.

Santos MCD, Viana JLS, Monteiro JD, Freire RCM, Freitas DLD, Camara IM, Silva GJS, Gama RA, Araújo JMG, Lima KMG. Infrared spectroscopy (NIRS and ATR-FTIR) together with multivariate classification for non-destructive differentiation between female mosquitoes of *Aedes aegypti* recently infected with dengue vs. uninfected females. *Acta Trop.* 2022; 235: 106633.

Sarker IH. Deep Learning: A Comprehensive Overview on Techniques, Taxonomy, Applications and Research Directions. *SN Comput. Sci.* 2021; 2: 420.

Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso-Júnior RP. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) from Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78(6):895-903.

Schreck CE, Kline DL, Carlson DA. Mosquito attraction to substances from the skin of different humans. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990; 6: 406-410.

Sikulu M, Killeen GF, Hugo LE, Ryan PA, Dowell KM, Wirtz RA, Moore SJ, Dowell FE. Near-infrared spectroscopy as a complementary age grading and species identification tool for African malaria vectors. *Parasit Vectors.* 2010; 3: 49.

Sikulu-Lord MT, Milani MP, Henry M, Wirtz RA, Hugo LE, Dowell FE, Devine GJ. Near-Infrared Spectroscopy, a Rapid Method for Predicting the Age of Male and Female Wild-Type and *Wolbachia* Infected *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 10: e0005040.

Sikulu-Lord MT, Maia MF, Milani MP, Henry M, Mkandawile G, Kho EA, Wirtz RA, Hugo LE, Dowell FE, Devine GJ. Rapid and Non-destructive Detection and Identification of Two Strains of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* by Near-Infrared Spectroscopy. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(6): e0004759.

Silva MMO, Rodrigues MS, Paploski IAD, Kikuti M, Kasper AM, Cruz JS, Queiroz TL, Tavares AS, Santana PM, Araújo JMG, Ko AI, Reis MG, Ribeiro GS. Accuracy of Dengue Reporting by National Surveillance System, Brazil. Emerg Infect Dis. 2016; 22(2): 336-9.

Sim S, Dimopoulos G. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. PLoS ONE. 2010; 5: e10678.

Siria DJ, Sanou R, Mitton J, Mwangi EP, Niang A, Sare I, Johnson PCD, Foster GM, Belem AMG, Wynne K, Murray-Smith R, Ferguson HM, González-Jiménez M, Babayan SA, Diabaté A, Okumu FO, Baldini F. Rapid age-grading and species identification of natural mosquitoes for malaria surveillance. Nat Commun. 2022; 13: 1501.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Princípios de análise instrumental. 6.ed. Porto Alegre: Bookman. 2009.

Sousa MMF, Melo BO, Costa AKS, Nunes JPP, Monteiro SG, Carvalho ACP, Pinto CMFS, Cosme LMSS, Turri RJG, Teixeira MM, Bomfim MRQ. Detection and differentiation of dengue virus serotypes by one-step multiplex reverse transcription PCR assays. Braz. J. Develop. 2020; 6(1), 227-246.

Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, Zhu M, Bonaparte M, Machabert T, Savarino S, Zambrano B, Moureau A, Khromava A, Moodie Z, Westling T, Mascareñas C, Frago C, Cortés M, Chansinghakul D, Noriega F, Bouckennooghe A, Chen J, Ng SP, Gilbert PB, Gurunathan S, DiazGranados CA. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. N Engl J Med. 2018; 379: 327-40.

Tallon AK, Lorenzo MG, Moreira LA, Martinez Villegas LE, Hill SR, Ignell R. Dengue infection modulates locomotion and host seeking in *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2020; 14(9): e000853.

Tamura T, Zhanga J, Madana V, Biswasa A, Schwoerera MP, Cafieroa TR, Hellera BL, Wangc W, Plossa A. Generation and characterization of genetically and antigenically diverse infectious clones of dengue virus serotypes 1–4. Emerg Microbes Infect. 2022; 11(1): 227–239.

Tátilla-Ferreira A, Garcia GA, Santos LMB, Pavan MG, Moreira CJC, Victoriano JC, Silva-Junior R, Santos-Mallet JR, Verly T, Britto C, Sikulu-Lord MT, Maciel-de-Freitas R. Near infrared spectroscopy accurately detects *Trypanosoma cruzi* non-destructively in midguts, rectum and excreta samples of *Triatoma infestans*. Sci Rep Nat. 2021; 11: 23884.

Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2001; 17: 99-102.

Taveira LA, Fontes LR, Natal D. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto. 2001. 104 p.

Tchankouo-Nguetcheu S, Khun H, Pincet L, Roux P, Bahut M, Huerre M, Guette C, Choumet V. Differential Protein Modulation in Midguts of *Aedes aegypti* Infected with Chikungunya and Dengue 2 Viruses. PLoS ONE. 2010; 5(10): e13149.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Informe Epidemiológico do SUS vol. 1999.

Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2005; 21(5):1307-1315.

Tjaden NB, Thomas SM, Fischer D, Beierkuhnlein C. Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. PLoS Negl Trop. 2013; 7(6): e2207.

Torres MC, Mendonça MCL, Rodrigues CDS, Fonseca V, Ribeiro MS, Brandão AP, Cunha RV, Dias AI, Boas LSV, Felix AC, Pereira MA, Pinto LMO, Sakuntabhai A, Filippis

AMB. Dengue Virus Serotype 2 Intrahost Diversity in Patients with Different Clinical Outcomes. *Viruses*. 2021; 13(349): 1-20.

Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. Dengue: teoria e práticas [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2015. 450 p.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy T, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000; 181: 2–9.

Vial T, Tan WL, Xiang BWW, Missé D, Deharo E, Marti G, Pompon J. Dengue virus reduces AGPAT1 expression to alter phospholipids and enhance infection in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*. 2019; 15(12): e1008199.

Wasick DA, Mulchandani A, Yates MV. Point-of-use nanobiosensor for detection of dengue virus NS1 antigen in adult *Aedes aegypti*: A potential tool for improved dengue surveillance. *Anal. Chem*. 2017; 90(1):679-684.

Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. Effect of Temperature on the Vector Efficiency of *Aedes aegypti* for Dengue 2 Virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 36(1): 143-152.

Wijesingue C, Gunatilake J, Kusumawathie PHD, Sirisena PDNN, Daulagala SWPL, Iqbal BN, Noordeen F. Circulating dengue virus serotypes and vertical transmission in *Aedes* larvae during outbreak and inter-outbreak seasons in a high dengue risk area of Sri Lanka. *Parasit Vectors*. 2021; 14(1): 614.

Wilder-Smith A. Dengue vaccine development by the year 2020: challenges and prospects. *Curr Opin Virol*. 2020; 43: 71–78.

WMP - World Mosquito Program. Sobre o Método *Wolbachia*. Disponível em <<https://www.worldmosquitoprogram.org/sobre-o-metodo-wolbachia>>. Acesso em 13 de abr. de 2022.

Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ. Natural cycles of vector-borne pathogens. In the *Biology of Disease Vectors*; University Press of Colorado: Boulder, CO, USA, 1996; 51–72 p.

Zara ALSA, Dos Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidemiol Serv Saúde, Brasília. 2016; 25(2): 391-404.

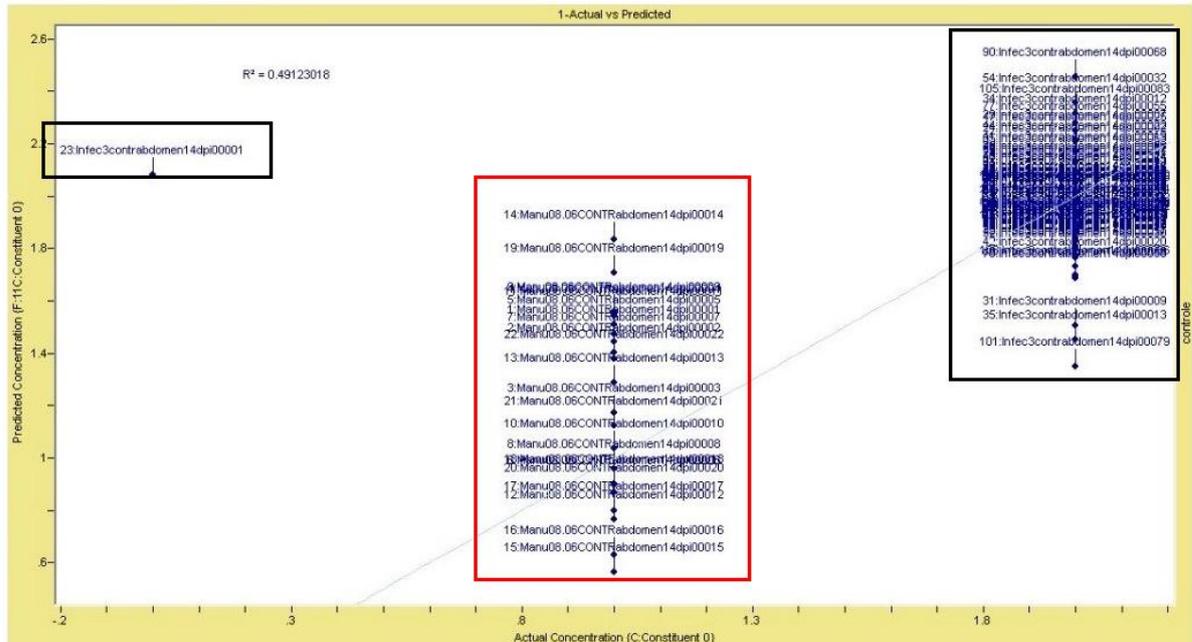
8. Apêndices

APÊNDICE A – Análise exploratória dos espectros NIR

Antes de analisar os espectros tratados por ANN, fizemos uma análise exploratória simples usando GRAMS IQ Spectroscopy Software, que é um programa também capaz de desenvolver modelos preditivos. Para isso, primeiramente convertemos os espectros brutos para o modo Log1/R e os arquivos .asd em .spc, por meio do software *Asd to Spc*. Cortamos os espectros na faixa de comprimento de onda de 500 a 2350 nm, a fim de excluir regiões com muitos ruídos. Posteriormente, transferiu-se os espectros convertidos para o programa GRAMS IQ. Nele estabelecemos uma análise comparativa dos espectros dos grupos de infecção. A partir dessa comparação dos espectros, é possível saber se eles se assemelham, e por isso se agrupam, ou se eles se diferem, e por isso se distanciam. Dessa forma, espera-se que espectros do mesmo grupo de infecção sejam agrupados e espectros de grupos distintos sejam distanciados.

Entretanto, ao analisar os espectros, coletados na região do abdômen em 14 dpi, do mesmo grupo (Controle) dos experimentos 1 (demarcados em vermelho) e 2 (demarcados em preto) de infecção 2, percebe-se que eles se distanciam, e não se agrupam (Fig. A.1a). Além da distância, os espectros do grupo Controle da infecção 1 se distribuem mais em comparação com os espectros de mesmo grupo da infecção 2, que estão mais próximos uns dos outros. Supõe-se então, que os espectros são diferentes. Mais um exemplo dessa análise feita, é com os espectros do grupo DENV-1. Na Figura A.1b, nota-se que os espectros do grupo DENV-1 da infecção 1 (demarcados em vermelho) chegam a ser mais próximos. Todavia, os espectros da infecção 2 (demarcados em preto) novamente se agrupam mais, devido a maior semelhança entre eles. Além disso, os espectros das amostras infectadas por DENV-1 da infecção 1 se distanciam ainda mais dos espectros do mesmo grupo (DENV-1) da infecção 2.

(a)



(b)

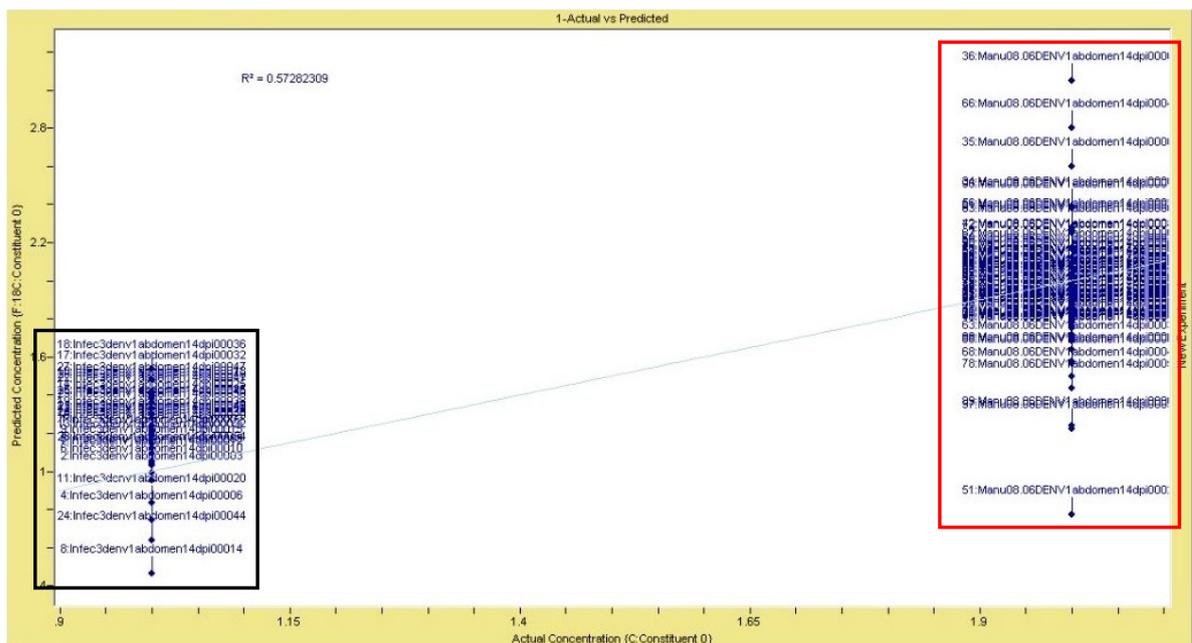


Figura A.1: Análise comparativa dos espectros das amostras dos grupos do experimento de infecção 1 com os espectros dos grupos do experimento de infecção 2, a fim de ver o quanto se assemelham ou o quanto se diferenciam. (a) Espectros do grupo Controle da infecção 1 demarcados em vermelho e espectros de amostras do mesmo grupo da infecção 2 demarcados em preto. Os espectros da infecção 1 mostram-se mais dispersos entre si e estão distantes dos espectros da infecção 2, que se agrupam em sua maioria; (b) Espectros do grupo DENV-1 da infecção 1 demarcados em vermelho e espectros de amostras do mesmo grupo da infecção 2 demarcados em

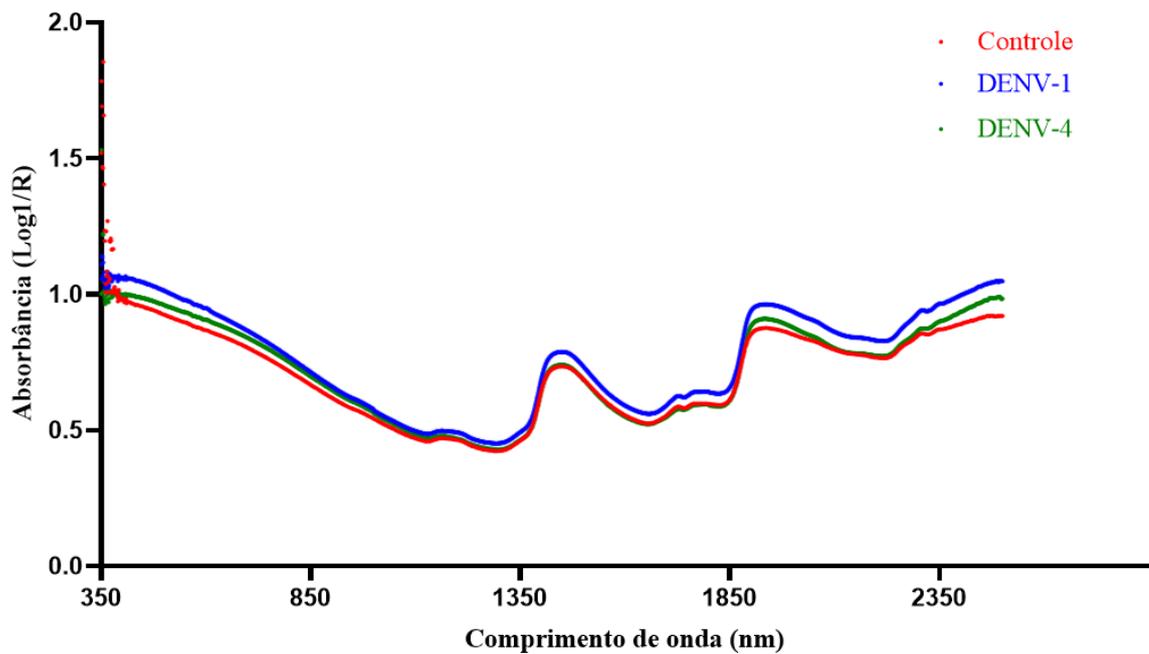
preto. Os espectros da infecção 1 se agrupam um pouco mais, mas ainda estão dispersos entre si e neste grupo mais distantes dos espectros da infecção 2, que se agrupam melhor.

APÊNDICE B – Análise dos espectros NIR médios

Por meio dos espectros NIR médios, de todos os grupos da infecção 1, foi possível analisar que em 10 dpi (Fig. B.1a) os espectros NIR médios dos 3 grupos de infecção foram evidentes no início e no fim da faixa espectral. O grupo DENV-1 teve maior valor de absorbância, seguido do grupo DENV-4, e por fim o grupo Controle, com menor valor. Entretanto, na faixa média espectral o espectro médio de amostras infectadas pelo sorotipo 4 do DENV é sobreposto pelo espectro médio de amostras não infectadas. Em 14 dpi (Fig. B.1b), no início da faixa espectral é possível notar os espectros NIR médios dos grupos DENV-1 e Controle, tendo o primeiro grupo um valor de absorbância ligeiramente superior ao do segundo grupo. Ainda no início da faixa, nota-se também que o espectro médio do grupo DENV-1 se sobrepõe ao espectro médio do grupo DENV-4. A partir de aproximadamente 1350 nm até o fim da faixa espectral (2500 nm), os espectros médios coletados de amostras dos 3 grupos se sobrepõem, não havendo diferenciação perceptível entre eles.

(a)

Espectros médios - Infec 1 (10 dpi)



(b)

Espectros médios - Infec 1 (14 dpi)

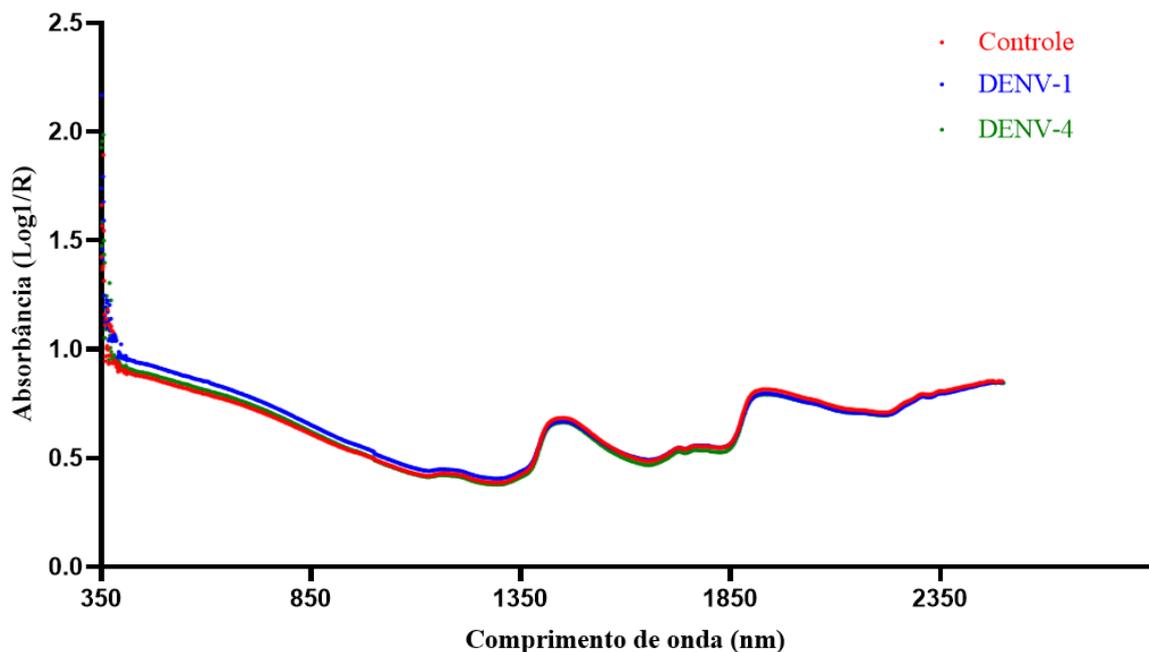


Figura B.1: Espectros NIR médios de mosquitos não infectados (Controle), infectados por DENV-1 e infectados por DENV-4, do primeiro experimento de infecção (Infec 1), coletados pelo espectrômetro Labspec 4i NIR na faixa espectral de 350-2500 nm. (a) em 10 dpi o espectro NIR médio do grupo DENV-4 (linha verde) torna-se evidente no início e no fim da faixa espectral, sendo na faixa média sobreposto pelo espectro NIR médio do grupo Controle (linha vermelha); (b) em 14 dpi no início da faixa espectral é possível notar os espectros NIR médios dos grupos DENV-1 (linha azul) - que se sobrepõe ao espectro médio do grupo DENV-4 (linha verde) - e do grupo Controle (linha vermelha).

APÊNDICE C – Análise dos espectros NIR por modelos de predição ANN

Ao analisarmos os dados pelos modelos de predição NIR desenvolvidos por ANN, tivemos uma análise mais robusta, com resultados mais consistentes a respeito dos espectros da infecção 1, que serão mostrados a seguir.

Na Tabela C.1 são mostrados os percentuais de acertos e de erros do modelo de predição para os espectros dos grupos Controle e DENV (DENV-1 + DENV-4), somente da infecção 1, para os 3 conjuntos: treinamento, validação e teste. Para o conjunto de treinamento, o modelo de predição obteve acurácia de 86,8%, onde uma observa-se especificidade boa de 98,5%, porém sensibilidade muito baixa, de 42,6%, com menos da metade de amostras preditas corretamente. Para o conjunto de validação, a acurácia aumenta para 90,4%, com a maior parte dos espectros sendo preditos de forma correta, para os dois grupos. Para este conjunto o modelo obteve especificidade, ainda alta, de 95,7% e sensibilidade, ainda baixa, de 64,3%. O conjunto de teste teve o pior resultado de predição. Para este conjunto, o modelo obteve acurácia de 70%, onde a maior parte dos espectros foram previstos como de amostras não infectadas, tendo uma sensibilidade mais baixa que o conjunto de treinamento, de 15,8%. Além disso, houve uma diminuição do percentual de especificidade, que foi de 84,5%.

Tabela C.1: Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle e DENV - dados dos sorotipos -1 e -4 juntos), que contam com espectros NIR das amostras do experimento de infecção 1; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV - dados dos sorotipos -1 e -4 juntos), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia.

Grupo de Infec.	Predição do Modelo								
	Conjunto de Treinamento			Conjunto de Validação			Conjunto de Teste		
	Controle	DENV	Total	Controle	DENV	Total	Controle	DENV	Total
Controle	202 (98,5%)	3 (1,5%)	205	67 (95,7%)	3 (4,3%)	70	60 (84,5%)	11 (15,5%)	71
DENV	31 (57,4%)	23 (42,6%)	54	5 (35,7%)	9 (64,3%)	14	16 (84,2%)	3 (15,8%)	19
			259			84			90

Na Tabela C.2 são mostrados os percentuais de acertos e de erros do modelo de predição para os espectros dos grupos Controle e DENV (DENV-1 + DENV-4) dos dois experimentos de infecção, para os 3 conjuntos: treinamento, validação e teste. Ao avaliar a influência dos espectros das amostras da infecção 2 no resultado da predição do modelo NIR desenvolvido, percebe-se que há uma melhora nas acurácias do grupo de amostras infectadas com DENV. Para os três conjuntos houve um aumento dos percentuais da sensibilidade do modelo de predição. Em especial para os conjuntos de treinamento (93,8%) e de teste (71,3%), onde dessa vez a maior parte dos espectros foram previstos corretamente, como pertencentes ao grupo DENV. Além disso, as acurácias aumentam para estes conjuntos: de 94,6% para o conjunto de treinamento e de 77,5% para o conjunto de teste. A acurácia se mantém boa para o conjunto de validação, sendo de 87,3%. O modelo manteve bons percentuais de especificidade para os 3 conjuntos.

Tabela C.2: Na primeira coluna estão os grupos de infecção (Controle e DENV - dados dos sorotipos -1 e -4 juntos), que contam com espectros NIR das amostras dos experimentos de infecção 1 e 2; as linhas correspondem ao modelo de predição feito a partir dos espectros NIR selecionados das amostras de seus respectivos grupos (Controle e DENV - dados dos sorotipos -1 e -4 juntos), aplicado aos conjuntos de treinamento (60%), validação (20%) e teste (20%). Para cada conjunto, o modelo previu um número de espectros, de forma correta ou não, onde entre parênteses consta a porcentagem de sua acurácia.

Grupo de Infec.	Predição do Modelo								
	Conjunto de Treinamento			Conjunto de Validação			Conjunto de Teste		
	Controle	DENV	Total	Controle	DENV	Total	Controle	DENV	Total
Controle	338 (95,2%)	17 (4,8%)	355	107 (89,9%)	12 (10,1%)	119	97 (82,2%)	21 (17,8%)	118
DENV	16 (6,2%)	244 (93,8%)	260	14 (16,3%)	72 (83,7%)	86	25 (28,7%)	62 (71,3%)	87
			615			205			205

Por fim, fizemos uma análise comparativa entre os espectros das amostras da infecção 1 (à esquerda da figura) e os espectros das amostras da infecção 2 (à direita da figura). Para essa análise utilizamos os espectros selecionados para o teste cego, os quais foram excluídos dos modelos de predição por ANN, a fim de prever o grupo de infecção no qual seriam agrupados (Infectados x Não Infectados) (Fig. C.1). Para o grupo Não Infectados (Controle) foram usados 20 espectros (para cada experimento de infecção). Para o grupo Infectados (DENV-1 + DENV-4) foram usados 40 espectros (para cada experimento de infecção), devido à junção das amostras infectadas pelos dois sorotipos do vírus.

Para o grupo de amostras não infectadas da infecção 1, apenas 4 espectros foram previstos corretamente, o restante (16) foi previsto como de amostras infectadas por DENV. No experimento de infecção 2, ainda no grupo Controle (Não Infectados), a maioria dos espectros (13) foram previstos corretamente. Para o grupo de amostras infectadas por DENV na infecção 1, 34 espectros foram previstos corretamente e na infecção 2, 38 espectros foram previstos de forma correta, com apenas 2 espectros previstos como de amostras não infectadas.

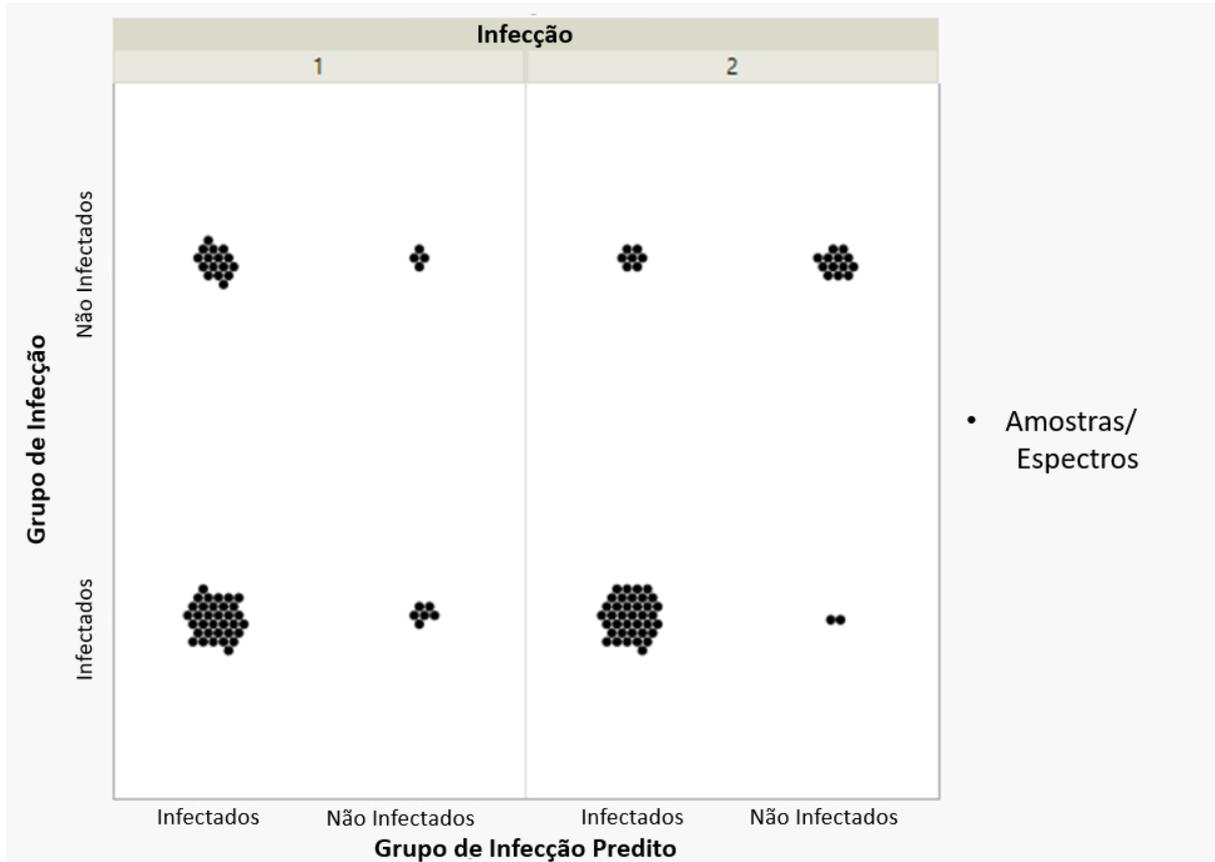


Figura C.1: Comparação dos espectros (bolinhas pretas) - selecionados para o teste cego - entre amostras Infectadas x Não Infectadas. Eixo x = Grupo de Infecção; eixo y = Grupo de Infecção Predito; à esquerda estão os espectros de amostras da infecção 1 e à direita estão os espectros de amostras da infecção 2, previstos como do grupo Controle - não infectados - ou do grupo DENV (DENV-1 + DENV-4) - infectados.

Dessa forma, concluímos que os espectros das amostras da infecção 1 são diferentes dos espectros das amostras da infecção 2, e devido ao problema encontrado com as fibras da sonda do espectrômetro, preferimos não aderir os dados desse primeiro experimento em nossas análises/resultados.