DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO POR DENV EM *Aedes aegypti*: VALIDAÇÃO DE MÉTODO COM ARMADILHA BIOAEDES TRAP®

Julia Vaz Lisboa (IC) e Camila Sacchelli Ramos (Orientador)

Apoio:PIBIC CNPq

RESUMO

A dengue representa uma constante ameaça à saúde pública no Brasil, exigindo estratégias eficientes de monitoramento de seu vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Nesse contexto, a vigilância entomológica e molecular pode contribuir para a antecipação de surtos epidêmicos e para o direcionamento de ações de controle. Este trabalho avaliou a utilização de exemplares coletados pela armadilha BioAedes Trap® em metodologias de extração e amplificação de RNA viral. Para isso, *pools* de mosquitos coletados nos municípios de São Paulo, Barueri e Santana de Parnaíba durante o primeiro semestre de 2025 foram submetidos à extração de RNA total pelos protocolos de coluna de sílica (QIAamp® Viral RNA) ou fenol:clorofórmio (TRI® Reagent). Ambos os métodos apresentaram limitações quanto à pureza das amostras. A amplificação do gene *COI* de *Ae. aegypti* foi confirmada em 90% das amostras, demonstrando a viabilidade da obtenção de material genético. No entanto, não foi possível determinar a presença de infecção por DENV, uma vez que as reações de PCR para o gene *NS5* não produziram amplicons. Duas hipóteses foram consideradas para explicar esse resultado: (i) degradação do RNA viral durante o armazenamento e transporte das amostras; e (ii) inviabilidade da reação utilizando o par de oligonucleotídeos Fow-FG1/Rev-FG2. Os resultados sugerem que uma abordagem baseada em coletas semanais e armazenamento a -80°C por até três meses pode reduzir o risco de degradação do RNA. Entre os métodos avaliados, recomenda-se a extração por coluna de sílica, uma vez que o protocolo fenol:clorofórmio apresentou maior frequência de contaminação por compostos orgânicos, prejudicando as etapas de RT-PCR.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, extração de RNA, vigilância molecular.

ABSTRACT

Dengue remains a persistent public health threat in Brazil, requiring effective strategies for monitoring its vector, *Aedes aegypti*. In this context, entomological and molecular surveillance can contribute to the early detection of epidemic outbreaks and support targeted control measures. This study evaluated the use of specimens collected by the BioAedes Trap® for viral RNA extraction and amplification methodologies. Pools of mosquitoes collected in the municipalities of São Paulo, Barueri, and Santana de Parnaíba during the first semester of 2025 were subjected to total RNA extraction using either a silica column-based protocol (QIAamp® Viral RNA) or a phenol-chloroform protocol (TRI® Reagent). Both methods showed limitations regarding sample purity. Amplification of the *Ae. aegypti* cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) gene was confirmed in 90% of the samples, demonstrating the feasibility of obtaining genetic material from field-collected specimens. However, it was not possible to determine DENV infection status, as PCR assays targeting the viral *NS5* gene failed to produce amplicons. Two hypotheses were considered to explain this result: (i) viral RNA degradation during sample storage and transport; and (ii) failure of amplification using the Fow-FG1/Rev-FG2 primer pair. The findings suggest that weekly collections combined with storage at -80°C for no longer than three months may reduce the risk of RNA degradation. Among the extraction methods evaluated, the silica column-based protocol is recommended, as the phenol-chloroform method showed a higher frequency of organic compound contamination, negatively affecting RT-PCR performance.

Keywords*:* *Aedes aegypti*; RNA extraction; molecular surveillance.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* e representa atualmente uma grave ameaça à saúde pública, tanto pela situação epidemiológica dos últimos anos, como pelo potencial risco de complicações e morte.

No Brasil, somente no ano de 2024, foram registradas 1.601 mortes dentre os mais de 3,5 milhões de casos prováveis da doença (BRASIL, 2025). O controle do mosquito enfrenta diversos desafios, principalmente por sua capacidade de adaptação a ambientes considerados desfavoráveis, como locais com água poluída, além das condições climáticas que favorecem sua proliferação. O *Ae. aegypti* pode ser encontrado tanto em áreas densamente povoadas quanto em regiões menos populosas, como áreas rurais.

A vigilância entomológica desempenha um papel fundamental no monitoramento da distribuição geográfica e da densidade do *Aedes* ao longo do tempo, além de ser um componente essencial para controle e prevenção de doenças transmitidas por vetores (arboviroses), como o caso da dengue. Para tanto, uma das estratégias é a realização de levantamentos amostrais em imóveis e o uso de armadilhas, associadas à análise molecular para a detecção de arbovírus, para a determinação de indicadores que estimam os riscos de transmissão de patógenos e a antecipação de surtos em áreas endêmicas, o que leva a otimização dessas intervenções de controle e redução dos impactos causados por esses surtos.

Dentre as diversas armadilhas disponíveis no mercado, a armadilha BioAedes Trap®, lançada no ano de 2024, diferencia-se das demais por uma série de características que atraem e aprisionam fêmeas de *Aedes*, fundamentando-se em atrativos físicos e químicos. Uma das características relevantes a este estudo é o fato de que os insetos atraídos para o interior da armadilha tendem a ficar aprisionados em um cartão adesivo que impossibilita o escape pela abertura principal de entrada. Além de ser mais seletiva para a espécie e permitir um levantamento mais preciso da quantidade de mosquitos circulantes, a coleta e identificação da amostra é facilitada, precisando apenas retirar e realizar a leitura no próprio cartão.

De maneira geral, a espécie *Ae. aegypti* tem maior incidência nos meses com temperaturas acima de 28°C e chuvas mais frequentes, no entanto, frente às alterações climáticas e menor definição das estações do ano, há maior dificuldade em delimitar os períodos ideais para as ações de controle de vetores

Conhecer a frequência de mosquitos capturados ao longo do ano e quantos deles estão infectados com o vírus da dengue é uma abordagem que ajudaria na tomada de decisões sobre ações de prevenção e controle de criadouros.

Considerando a armadilha BioAedes Trap® um instrumento novo de vigilância epidemiológica, torna-se relevante determinar um método eficiente de extração de RNA viral dos mosquitos aprisionados pela armadilha. Monitorar os sorotipos circulantes permite não apenas prever possíveis epidemias, mas também orientar estratégias de controle e prevenção mais direcionadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Histórico da dengue no Brasil

Cada um dos sorotipos da dengue tem uma introdução diferente no Brasil, com surtos e padrões epidemiológicos variados. Apesar da dificuldade de confirmação de casos de dengue, há relatos de infecções febris desde o século XIX, que poderiam ser casos de dengue.

A transmissão dos diferentes sorotipos tem implicações significativas no controle da doença uma vez que há imunidade permanente para o sorotipo da infecção e transitória para os demais sorotipos, porém com essa infecção secundária aumentando o risco de formas clínicas graves como a dengue grave (hemorrágica). Abaixo são apresentados alguns dados históricos sobre a circulação de cada um dos sorotipos no Brasil (Freitas; Andrade, 2023; Nogueira et al., 2021; De Castro Catão; Guimarães, 2011; Silva; de Fátima Mariano; Scopel, 2008; Braga; Valle, 2007).

- DENV-1: foi o primeiro sorotipo a ser identificado no Brasil, com a introdução confirmada entre 1981 e 1982 em Boa Vista, Roraima. Esse foi o início da reemergência da dengue no Brasil, após um longo período de ausência. Esse sorotipo foi responsável pelos primeiros surtos registrados no país. Apesar de o DENV-1 ter sido o primeiro a circular, a disseminação para outras regiões do Brasil ocorreu de forma gradual, principalmente devido à adaptação do *Ae. aegypti* aos ambientes urbanos. Ao longo dos anos, o DENV-1 foi se tornando o sorotipo mais prevalente em muitas áreas do Brasil. O primeiro grande surto de dengue foi causado pelo DENV-1 que ocorreu em 1986, no Rio de Janeiro. Neste surto, a disseminação do vírus em áreas urbanas densas foi significativa, o que gerou uma grande quantidade de casos e destacou a necessidade de ações de controle do mosquito vetor. Na época, o sistema de saúde do Brasil não estava completamente preparado para enfrentar surtos desse nível, o que contribuiu para a falta de controle inicial da doença. As primeiras campanhas de conscientização e controle do vetor foram implementadas, mas as condições de infraestrutura urbana e a falta de conhecimento sobre a dinâmica da doença limitaram o sucesso dessas ações.

- DENV-2: foi introduzido no Brasil em 1990, com os primeiros casos registrados no Rio de Janeiro. A infecção por DENV-2 foi relacionada ao aumento da gravidade das manifestações clínicas da doença, especialmente em pessoas que haviam sido infectadas anteriormente por outros sorotipos do vírus. A disseminação do DENV-2 foi relativamente rápida, afetando diversas regiões do país, com grandes surtos. O surto de 1998, causado pelo DENV-2, foi um dos mais graves da história da dengue no Brasil. Esse surto resultou no aumento do número de casos graves e óbitos, especialmente em estados das regiões Nordeste e Sudeste. O principal fator que contribuiu para a gravidade desse surto foi o surgimento de casos de dengue grave (antiga febre hemorrágica), uma forma da doença que pode ser fatal. Esse quadro clínico é mais comum em indivíduos que tiveram uma infecção anterior por um sorotipo diferente, respondendo então de forma exagerada ao vírus em infecções subsequentes.

- DENV-3: foi introduzido no Brasil entre 2000 e 2001, com os primeiros casos registrados no Rio de Janeiro. A introdução do DENV-3 ocorreu em um momento em que a população brasileira já havia sido exposta aos sorotipos DENV-1 e DENV-2, o que aumentou o risco de infecção secundária. Esse fenômeno resultou em uma crescente preocupação com o controle da circulação do DENV-3. O surto de 2002, causado pelo DENV-3, foi uma das maiores epidemias de dengue já registradas no Brasil até aquele momento. A infecção por DENV-3 gerou muitos casos graves e óbitos, especialmente devido ao fato de que muitas pessoas já haviam sido infectadas pelos outros sorotipos, o que as tornou mais suscetíveis a formas graves de dengue. Este surto evidenciou a dificuldade do controle da doença. Em 2025, o Brasil está novamente enfrentando uma situação crítica com a circulação do DENV-3. A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) no ano de 2024 alertou para o risco de surtos graves de dengue devido à persistência deste sorotipo em várias regiões do país. A continuidade da circulação de diferentes sorotipos, especialmente DENV-3, e o aumento do número de casos graves indicam que a situação da dengue no Brasil ainda exige atenção contínua e estratégias eficazes de controle.

- DENV-4: foi introduzido no Brasil em 1981-1982, junto com o DENV-1, em Boa Vista, Roraima. No entanto, após essa introdução inicial, o sorotipo desapareceu do país por cerca de 30 anos. Em 2010, o DENV-4 reapareceu em Roraima e, a partir de 2011, começou a se espalhar para outras regiões do Brasil. Sua reintrodução gerou preocupação, pois muitos brasileiros já estavam imunes aos outros três sorotipos, o que aumentou o risco de infecções secundárias e de formas graves. Desde 2011, o DENV-4 passou a circular em outras regiões do Brasil, aumentando a complexidade do cenário epidemiológico. A reintrodução do DENV-4, juntamente com os outros sorotipos, elevou o risco de formas graves e complicações.

Controle do mosquito no Brasil

Dentre as arboviroses de importância para a saúde pública brasileira, como a dengue e a febre amarela, desde o início do século passado o mosquito *Ae. aegypti* já era reconhecido como um foco importante de controle dessas infecções. A Entre 1930 e 1939, o Brasil enfrentou dificuldades de controle do mosquito, associado principalmente aos casos de febre amarela urbana (Zara et al., 2016).

Em 1940, com a criação do Serviço Nacional da Febre Amarela – SNFA, há o planejamento de ações contra o mosquito *Aedes*, oficializado com o Decreto nº8.675, de 4 de fevereiro de 1942. Inicialmente, a estratégia se concentrou na redução da densidade do vetor em cidades costeiras para interromper a transmissão da doença por meio da inspeção dos domicílios, porém em pouco tempo o objetivo passou a ser a erradicação do *Ae. aegypti* das áreas urbanas como forma de prevenir novos surtos, em paralelo a campanhas de vacinação contra a febre amarela (Costa et al., 2011).

Entre 1940 e 1973, o Brasil foi declarado livre do *Aedes* em várias regiões, resultado de campanhas intensas de erradicação, especialmente com o uso do inseticida DDT. Essas iniciativas se expandiram para campanhas continentais, mas tiveram seus avanços comprometidos devido a persistência do mosquito nos países vizinhos e a resistência crescente ao DDT (Wermelinger; Carvalho, 2016).

A partir de 1974, a situação se agravou com a reintrodução do *Ae. aegypti* no Brasil, o que culminou para o retorno da dengue anos depois. Em 1985 a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) reconheceu que a erradicação total do vetor era inviável. Assim, o foco passou a ser o controle da população do mosquito a níveis que não representassem risco significativo à saúde pública, com estratégias integradas envolvendo métodos químicos, biológicos, físicos e ações de educação em saúde (Braga; Valle, 2007).

Em 2014, a epidemia de zika evidenciou o impacto da proliferação descontrolada do *Aedes* em um contexto de urbanização desordenada e populações vulneráveis (Löwy, 2017).

Ao longo dos anos, a OPAS tem desempenhado um papel crucial no desenvolvimento e implementação de estratégias para o controle da dengue por meio de abordagens integradas, monitoramento contínuo e colaboração multisetorial, o que tem contribuído significativamente para a redução da doença (OPAS, 2022). Além dessas estratégias de controle, a OPAS publicou em 2024 que liberou mosquitos *Ae. aegypti* com a bactéria *Wolbachia*, para impedir que o vírus da dengue, zika e chikungunya se desenvolvam no mesmo, graças à essa bactéria a capacidade do *Aedes* de transmitir os vírus fica reduzida.

Tipos de armadilhas e uso pela vigilância epidemiológica

O uso de armadilhas para capturar mosquitos é amplamente adotado nas práticas de vigilância. As armadilhas mais comuns incluem as de ovoposição, que coletam ovos, armadilhas luminosas, que atraem mosquitos adultos à noite, e armadilhas de CO_2, que simulam a respiração humana e atraem mosquitos em busca de hospedeiros.

Cada tipo de armadilha tem suas particularidades e se mostra eficaz dependendo do contexto e da espécie de mosquito alvo. Por exemplo, as armadilhas de CO_2 são especialmente úteis para capturar adultos de *Ae. aegypti*, um dos principais vetores da dengue. Já as armadilhas luminosas, que utilizam luz UV para atrair os mosquitos, se mostram eficazes em áreas urbanas com alta incidência de mosquitos noturnos (Amos, B. A, 2020).

Uma vez capturados, os mosquitos podem ser submetidos a testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), para detectar a presença de vírus, como os vírus da dengue, zika ou chikungunya. Estudos como Ribeiro et al. (2021) reforça que a testagem molecular em mosquitos é uma abordagem sensível e eficaz para monitorar a circulação viral. A detecção precoce do patógeno nas populações de mosquitos permite a identificação de áreas de risco e possibilita intervenções mais assertivas, como a eliminação de criadouros e a aplicação direcionada de inseticidas, antes que surtos em larga escala ocorram.

Além disso, a integração das armadilhas com métodos de monitoramento molecular proporciona uma vigilância em tempo real, que, quando combinada com modelos matemáticos, pode prever a evolução da epidemia e orientar as políticas de saúde pública. O estudo de Lana, R. M. et al. (2018) destaca como essa combinação de dados de captura e análises moleculares pode otimizar a alocação de recursos nas áreas mais afetadas, melhorando a eficiência das medidas de controle.

A testagem de mosquitos também fornece informações valiosas sobre a resistência dos vetores aos inseticidas. Rahman, R. U. et al. (2021) mostraram que a análise molecular pode identificar variantes genéticas associadas à resistência em populações de *Ae. aegypti,* tornando possível ajustar as estratégias de controle e evitar o uso excessivo de substâncias químicas que poderiam induzir ainda mais resistência.

Embora a testagem molecular seja uma técnica robusta e confiável, sua eficácia depende da combinação com métodos de captura eficientes e do monitoramento contínuo. Estudos como o de Leandro A. S. et al. (2022) enfatizam a necessidade de um sistema de vigilância integrado, no qual a captura de mosquitos, a detecção de arbovírus e a análise de dados em tempo real formem uma rede coesa de informações para a gestão de surtos. A integração de diferentes tipos de armadilhas e a utilização de diferentes abordagens

diagnósticas são, portanto, fundamentais para uma vigilância eficaz e para a prevenção de epidemias.

Além disso, a aplicação desses métodos contribui para o desenvolvimento de modelos preditivos, como sugerido por Leandro et al. (2023), que utilizam dados de monitoramento de mosquitos para prever surtos de arbovírus e otimizar a resposta das autoridades de saúde. Tais modelos podem, por exemplo, antecipar as áreas de risco e a intensidade de surtos futuros, fornecendo informações cruciais para ações preventivas e de controle.

Em suma, a combinação de armadilhas de captura de mosquitos com a testagem molecular de arbovírus tem se mostrado uma abordagem eficaz e necessária na vigilância epidemiológica de doenças transmitidas por vetores, como a dengue. O uso dessas ferramentas permite a detecção precoce da circulação viral, a melhor alocação de recursos e o direcionamento preciso de medidas de controle. Assim, a integração de armadilhas de captura, testes moleculares e modelagem preditiva forma um sistema robusto para a vigilância ativa e a prevenção de surtos, oferecendo uma resposta mais eficiente aos desafios impostos pelas doenças transmitidas por mosquitos.

Dentre os métodos atualmente empregados para detecção de infecção viral em mosquitos, destacam-se os protocolos de extração de RNA. O estudo de Garcia et al. (2024), publicado na *International Journal of Molecular Sciences*, comparou diversos kits e reagentes comerciais, como TRIzol® e QIAamp® Viral RNA QIAGEN, avaliando custo-benefício, rendimento e integridade do RNA extraído de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com chikungunya. Os resultados indicaram que o kit QIAamp® ofereceu extração eficiente com boa qualidade de RNA, sendo uma escolha robusta para laboratórios com infraestrutura básica.

Uma alternativa emergente e inovadora é a utilização de excretas de mosquitos como matriz para detecção viral, o que pode eliminar a necessidade de processamento individual de espécimes. Segundo Ramírez et al. (2020), essa abordagem demonstrou alta sensibilidade para dengue e zika, abrindo caminho para armadilhas automatizadas que monitoram grupos de mosquitos de forma não destrutiva.

Recentemente, iniciativas brasileiras têm incorporado inteligência artificial (IA) ao monitoramento vetorial. A UFMG desenvolveu um sistema que analisa imagens aéreas e de fachadas urbanas para identificar potenciais criadouros do mosquito, como caixas d'água e piscinas. Essa tecnologia pode auxiliar prefeituras a identificar locais de risco com precisão e agilidade (Oliveira; Mafra, 2024).

Outra inovação promissora é o uso de armadilhas inteligentes baseadas em Internet das Coisas (IoT), com sensores e câmeras que distinguem espécies de mosquitos e

transmitem os dados em tempo real. O Inatel, em parceria com a FAPESP, está desenvolvendo equipamentos que automatizam a contagem e identificação de *Aedes*, evitando capturas acidentais de outros insetos e facilitando o georreferenciamento dos focos.

3. METODOLOGIA

Para este estudo foram utilizadas fêmeas adultas de mosquitos *Ae. aegypti* capturadas nas cidades de São Paulo, Barueri e Santana de Parnaíba, durante o período de abril e maio de 2025, por meio da armadilha BioAedes Trap®. Como controle, foram incluídas fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas manualmente entre os meses de março a abril de 2026.

Os espécimes coletados por aderência ao cartão adesivo, foram armazenados no próprio cartão, em tubo cônico transparente, a -20°C, até o momento de uso nos protocolos de extração (período de 6 a 10 meses). As amostras controle, coletadas manualmente, foram congeladas a -20°C por um período máximos de 4 dias.

Antes de cada procedimento de extração de RNA, os espécimes eram retirados do cartão adesivo com o auxílio de uma pinça metálica e macerados em microtubo plástico por meio de pistilos estéreis, adequados para uso em microtubos. Cada amostra era composta por *pools* de 3 a 10 mosquitos.

3.1 Métodos de extração de RNA

Para comparar a eficácia e a qualidade da extração de RNA de mosquitos possivelmente infectados pelo vírus DENV, foram testados dois métodos: QIAamp® Viral RNA QIAamp® (QIAGEN) e o TRI Reagent® (Sigma-Aldrich). Os dois métodos foram realizados conforme as instruções dos fabricantes e basearam-se nos estudos de Garcia et al. (2024).

No QIAamp® Viral RNA (QIAGEN) a amostra foi lisada com uma solução contendo guanidina (Buffer AVL), que desnatura proteínas e inativa RNases. Após a adição de etanol, a mistura foi aplicada a uma coluna com membrana de sílica que se liga seletivamente ao RNA. As impurezas foram removidas por lavagens sucessivas, e o RNA purificado foi eluído em água livre de RNase.

O método com TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) a amostra foi primeiramente homogeneizada no reagente, que contém fenol e guanidina tiocianato para lise celular e desnaturação de proteínas. Após a adição de clorofórmio, centrifugação, e separação em três fases, recuperavamos a fase aquosa (contendo RNA) e desprezamos as fases interfacial (DNA) e orgânica (proteínas). O RNA foi precipitado da fase aquosa com isopropanol, lavado com etanol e ressuspendido em água livre de RNase.

3.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis® (Roche). Inicialmente, as amostras de RNA total obtidas pelos dois métodos descritos acima foram incubadas com os oligonucleotídeos Random Hexamer (60µM) e água a 65°C por 10 minutos, em seguida resfriados em gelo imediatamente. Aos tubos foram adicionados o tampão de reação, inibidor de RNase (20 U), mix de dNTPs (10 mM cada) e a enzima transcriptase reversa (Transcriptor High Fidelity RT – 20U).

Para a síntese do cDNA a mistura era incubada a 55°C por 30 minutos, inativada a 85°C por 5 minutos e armazenada a -20°C até utilização nas reações de polimerização em cadeia.

Tanto as amostras de RNA total como de cDNA foram quantificadas pelo equipamento NanoDrop 2000c Spectrophometer® (Thermo Fisher Scientific). Os gráficos gerados pelo equipamento foram salvos e estão apresentados no tópico adiante.

3.3 Reações de polimerização em cadeia

Com o intuito de confirmar a qualidade e integridade das amostras de cDNA obtidas a partir do RNA total do mosquito (mosquito+vírus), foram realizadas reações de polimerização em cadeia (PCR) para o gene da citocromo c oxidase – subunidade I (*COI*) de *Ae. aegypti* e outra para o gene *NS5* do vírus DENV (sorotipos 1-4). Como controle positivo para o RNA viral (C[+] DENV-1), utilizamos amostra de RNA DENV-1 gentilmente cedida pela Dra. Licia Natal Fernandes (IMT-USP).

O quadro 1 apresenta informações sobre os oligonucleotídeos utilizados em cada etapa.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR

Reação	Primer	Sequência	TM	Amplicon
Controle (+) *Ae. aegypti*	LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	53°C	710 bp
	HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	55°C	
Infecção pelo vírus DENV	Rev-FG2	5'-GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA-3'	°C	958 bp
	Fow-FG1	5'- TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT -3'	°C	
Identificação do sorotipo	Rev-nDEN1	5'-CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC-3’	°C	472 bp
	Rev-nDEN2	5'- GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC -3'	°C	316 bp
	Rev-nDEN3	5'- TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT -3'	°C	659 bp
	Rev-nDEN4	5'- GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC -3'	°C	222 bp

Como controle positivo da extração de RNA e síntese de cDNA foram utilizados os pares de oligonucleotídeos LCO1490 e HCO2198 (Folmer et al., 1994), utilizados como *barcoding* de metazoários. Nessa reação, as amostras foram submetidas a uma desnaturação

inicial a 94ºC por 2 minutos, seguindo 30 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 48ºC por 1 minuto e 72ºC por 2 minutos, encerrando com extensão final a 72ºC por 5 min.

A determinação dos sorotipos do vírus DENV foi realizada conforme descrito por Bronzoni et al. (2005). Para a amplificação do primeiro amplicon foram utilizados os pares de oligonucleotídeos FG1 e FG2, os quais anelam ao gene do nucleocapsídeo (NS5 gene) dos *Flavivirus*, resultando em um produto de 958 bp. A reação foi submetida a um período inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguindo 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min.

A segunda reação teve por objetivo distinguir os sorotipos do vírus. Resumidamente, após o PCR duplex (FG-1/ FG-2), seguiu-se com *nested PCR multiplex* (DENV-1, DENV-2 e DENV3) e/ou *nested PCR* (DENV-4). Nessas reações, foram mantidos os parâmetros de temperatura da reação inicial com FG-1 e FG2. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em agarose 1,0%.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

A armadilha BioAedes Trap® demonstrou elevada seletividade para *Ae. aegypti*, embora também tenha capturado insetos pertencentes a outros gêneros e famílias, conforme descrito por Menezes (2025). Considerando as condições frequentemente encontradas na rotina da vigilância epidemiológica, os cartões coletados foram armazenados a -20 °C por período superior a seis meses. Essa estratégia buscou reproduzir a realidade de muitos municípios, que nem sempre dispõem de infraestrutura para armazenamento em ultrafreezer (-80 °C) ou de equipes especializadas para a realização de análises moleculares dos exemplares.

Como os mosquitos encontravam-se fixados ao cartão adesivo da armadilha, foi utilizada pinça metálica de ponta fina para a remoção daqueles identificados como *Ae. aegypti*. É importante destacar que esta etapa apresentou desafios devido à forte aderência da cola, havendo fragmentação de algumas estruturas anatômicas, como o desprendimento de apêndices locomotores, que permaneceram colados no cartão adesivo. Apesar dessas intercorrências, cabeça e abdome foram transferidos integralmente para microtubos, onde foram macerados com o auxílio de pistilos estéreis.

A figura 1 ilustra a armadilha BioAedes Trap®, um exemplar do cartão adesivo com mosquitos aprisionados por aderência e o pistilo plástico utilizado para maceração.

Figura 1 – Representação da Armadilha BioAedes Trap® e do cartão adesivo com mosquitos *Aedes aegypti* aprisionados.



Fonte: BioControle (2025); Registro fotográfico da autora (2026); NetLab (2026).

A fim de verificarmos qual metodologia de extração de RNA seria mais eficiente, foram utilizados e comparados o desempenho dos reagentes TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) QIAamp® Viral RNA (Qiagen). As amostras 3, 6 e 7 foram submetidas à extração por TRI Reagent®, enquanto as amostras 1, 2, 4, 5, 8, 9 e 10 foram extraídas e purificadas em coluna de sílica, pelo kit QIAamp®. Ainda sobre as extrações, as amostras 1, 2, 4, 7 e 8 foram coletadas do cartão adesivo e armazenas no freezer (-20ºC) por 6-10 meses, enquanto as amostras 3, 5, 6, 9 e 10 foram coletadas manualmente, com armazenamento de 48-96 horas antes das extrações.

Nessa comparação é relevante destacar que a necessidade de uso de fenol e clorofórmio na extração pelo TRI Reagent® demandou infraestrutura laboratorial com capela e implicava em maior risco de toxicidade pelos vapores dos solventes orgânicos. Já a extração com a coluna QIAamp® pôde ser realizada em bancada, oferecendo assim maior praticidade e segurança.

A avaliação da qualidade e pureza do RNA extraído baseou-se nos parâmetros espectrofotométricos das razões 260/280 (contaminação proteica) e 260/230 (contaminação orgânica/sais), onde a razão 260/280 é considerada pura quando estiver no intervalo de 1,9 e 2,1 (sendo 2,0 o valor ideal), e a razão 260/230, no intervalo de 2,0 e 2,2 (De-Souza; Brigido; Maranhão, 2016).

Tabela 1. Parâmetros de concentração e pureza das amostras de RNA e cDNA.

		Amostras										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C(+) DENV 1
Método de coleta		BioAedes	BioAedes	Manual	BioAedes	Manual	Manual	BioAedes	BioAedes	Manual	Manual	
Método extração RNA		QIAamp	QIAamp	TRIReagent	QIAamp	QIAamp	TRIReagent	TRIReagent	QIAamp	QIAamp	QIAamp	
RNA	(ng/uL)	32.1	30.4	100.5	17.1	13.7	15132.4	14729.6	23.9	28.5	12.1	12
	260/280	2.26	2.34	1.8	1.96	2.19	1.3	1.44	1.67	2.26	2.85	1.81
	260/230	0.19	0.17	0.49	0.09	0.03	1.06	1.03	0.13	0.19	0.08	0.03
cDNA	(ng/uL)	1716.5	1654.3	1604.9	2435.5	1634	12602.1	-0.5	1366.5	1690.9	1684.3	1789.5
	260/280	1.79	1.82	1.81	1.8	1.8	1.77	1.23	1.82	1.82	1.81	1.8
	260/230	2.06	2.1	2.08	1.61	1.48	0.87	0.71	2.1	2.09	2.12	1.94

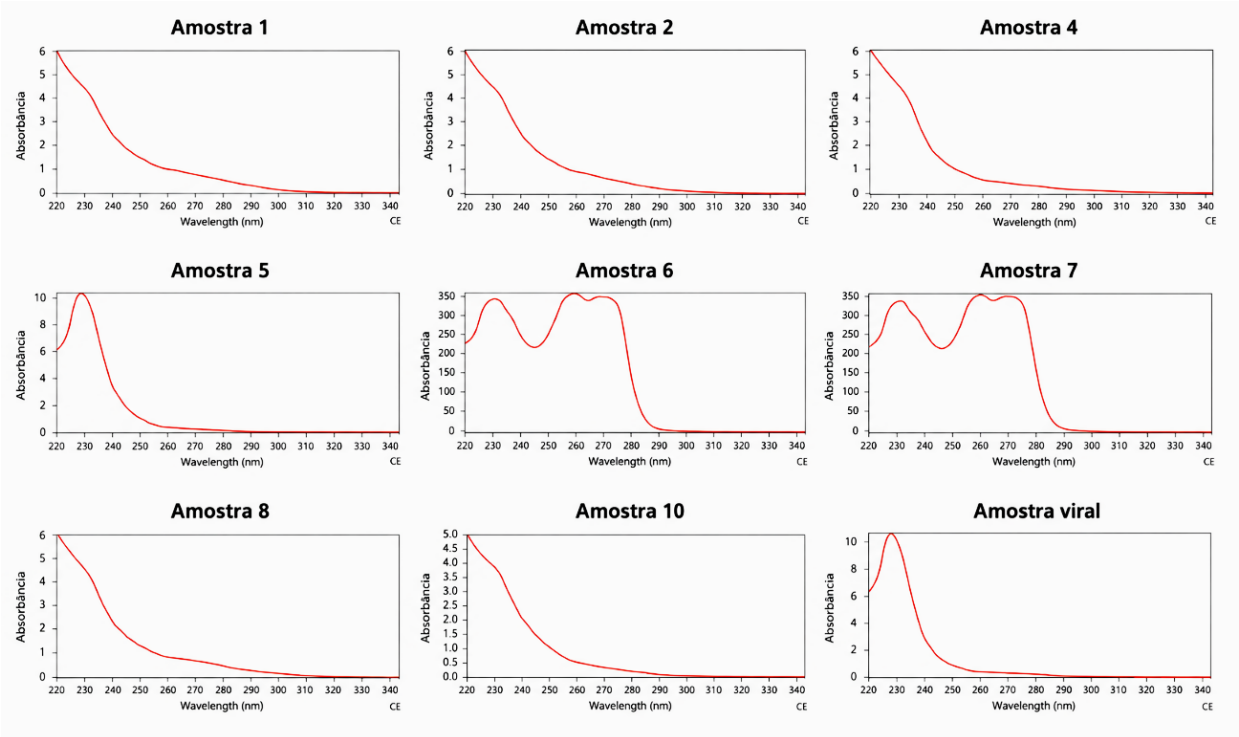
Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Os dados apresentados na Tabela 1 revelam variações significativas no grau de pureza em ambos os métodos testados. No que se diz respeito à razão 260/280, com exceção da amostra 4, todas as demais apontaram níveis de pureza abaixo (entre 1,3 – 1,81) ou acima (entre 2,19 – 2,85) do esperado, sugerindo presenças resíduos proteicos ou solventes orgânicos. Isso é muito provável, pois as amostras obtidas pelo método do TRI Reagent® podem ter sido contaminadas com fenol, durante a coleta da fase aquosa, e as amostras que foram extraídas com a coluna sílica podem ter sido contaminadas por guanidina e sais presentes nos reagentes do kit (Weidner et al., 2022).

Em relação à razão 260/230, nenhuma amostra apresentou o valor de absorbância desejado (≅ 2,0), sugerindo possível contaminação com sais caotrópicos, etanol residual ou mesmo carboidratos (quitina) do mosquito.

De modo geral, as concentrações apresentadas pelo equipamento indicam rendimento de RNA entre 12 a 100 ng/μL, dentro da faixa esperada, considerando que cada amostra continha de 2 a 10 exemplares apenas. Vale destacar que nas amostras 6 e 7, extraídas pelo TRI Reagent®, a massa sugerida pelo espectrofotômetro de 14.729,6 ng/μL e 15.132,4 ng/μL deve-se provavelmente a falhas do detector. Além do valor ser inviável, considerando a massa total dos mosquitos, as amostras 6 e 7 tiveram forte indício de contaminação por fenol, que tem absorbância na faixa dos 260 – 270 nm.

Figura 2 - Perfil de absorbância espectrofotométrica (NanoDrop®) das amostras de RNA total extraídas de fêmeas de *Aedes aegypti.*



Fonte: Obtidos pela autora, com NanoDrop (2026).

Em paralelo às leituras de absorbância, o espectrofotômetro apresenta uma imagem gráfica da medida de densidade óptica (D.O.) por comprimento de onda (nm). A Figura 2 revela que a absorbância a 260 nm foi extremamente baixa para a maioria das amostras, com picos entre 220 – 230 nm, confirmando as prováveis contaminações com sais caotrópicos ou etanol. Todos esses solventes podem degradar as enzimas e comprometer as etapas subsequentes de síntese de cDNA e as reações de PCR. Ainda assim, diversos autores já utilizaram colunas de sílica com sucesso para a extração de RNA viral em mosquitos, sugerindo que ao menos a contaminação com guanidina não deve alterar o sucesso das etapas subsequentes (Weidner et al., 2022; Gomes et al., 2023; Garcia et al., 2024).

A tabela 2 apresenta um resumo das informações de pureza e qualidade das amostras de RNA, agrupadas por método de extração e resultados obtidos. Quanto à estratégia de coleta, podemos dizer que não foram observadas diferenças no grau de pureza e concentração, seja por meio da armadilha ou de coleta manual.

Tabela 2. Quadro resumo sobre a extração de RNA.

Amostras	Coleta	Extração RNA	RNA (µg/µL)	260/280	260/230	Forma da curva (Nanodrop)	Interpretação
1, 2, 4, 8	BioAedes	QIAamp1	7–32	1.44–2.34	0.09–0.19	Pico único perto de 220 nm, caindo exponencialmente, sem pico definido em 260 nm	Possível contaminação por guanidina (coluna)
5, 10	Manual	QIAamp	12–14	2.19–2.26	0.03–0.08	Pico agudo perto de 225 nm, seguido de queda	Possível contaminação por guanidina (coluna)
6, 7	Manual / BioAedes	TRIreagent	15132 / 14730	1.30 / 1.03	1.06 / 1.03	Dois picos largos, um na faixa dos 230 nm e outro entre 260 e 280 nm	Contaminação massiva por fenol, pigmentos,
Viral C+		QIAamp	12	1.81	0.03	Pico agudo perto de 225 nm, seguido de queda	Possível contaminação por guanidina (coluna)

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Apesar das indesejáveis informações obtidas pelo NanoDrop (espectrofotômetro), optamos por seguir com o protocolo de síntese de cDNA. Após algumas tentativas sem sucesso, diluímos as amostras de RNA purificado e seguimos com o protocolo sugerido pelo fabricante do kit Transcriptor High Fideliti cDNA Kit (Roche). Considerando o interesse em amplificar tanto o cDNA de *Aedes* como do vírus DENV, optamos por incubar as amostras de RNA com *random primers* fornecido pelo kit.

Na tabela 1 também estão apresentados os dados de concentração e pureza das amostras de cDNA. Embora as razões de análise sigam o mesmo princípio da avaliação do RNA, os limiares de pureza de referência para o cDNA diferem de forma que a razão 260/280 (contaminação proteica) está na faixa de 1,7 a 1,9, sendo 1,8 considerado ótimo e a razão 260/230 (contaminação por compostos orgânicos/sais), está na faixa de 1,8 a 2,2, sendo 2,0 a 2,2 considerados ótimos (De-Souza; Brigido; Maranhão, 2016).

A quantificação das amostras de cDNA por espectrofotometria apresentaram bom rendimento, variando entre 1,6 a 12,0 µg/µL, com exceção da amostra 7, (-0,5ng/µL). Apesar

das dúvidas quanto às concentrações apresentadas pelo espectrofotômetro, optamos por não as confirmar em eletroforese, já que a reação resultava em apenas 25 uL de amostra e seriam necessárias ao menos cinco reações de PCR para o estudo completo.

De todo modo, quanto à pureza, a maioria das amostras de cDNA apresentaram razões 260/280 e 260/230 dentro ou próximas da faixa ótima. Novamente, as amostras 6 e 7 apresentaram valores questionáveis. De todo modo, a amostra 3, que foi também obtida pelo método do TRI Reagent®, demonstrou melhor pureza e excelente concentração, quando comparada às demais amostras de cDNA obtidas pelo RNA purificado em coluna (QIAamp®).

Em virtude da ampla variabilidade de concentração e pureza das amostras, optamos por seguir com a reação de PCR utilizando 5μL de cDNA como *template* para todas elas. Para amplificação que serviria como controle positivo da extração de RNA e da síntese de cDNA, utilizamos os oligonucleotídeos LCO1490 e HCO2148. Os primeiros resultados evidenciaram, para algumas amostras, bancas fracas na eletroforese em agarose, apesar do tamanho esperado. Assim, para otimizar a especificidade, realizamos um protocolo de *nested PCR*, com 3uL do produto amplificado como *template* para uma segunda reação com os mesmos oligonucleotídeos. O resultado dessa reação está apresentado na Figura 3, onde é possível conferir o local de pareamento dos oligonucleotídeos LCO1490 e HCO2148 no gene *COI* de *Aedes* (Fig. 3A), assim como o perfil da eletroforese de cada amostra (Fig. 3B).

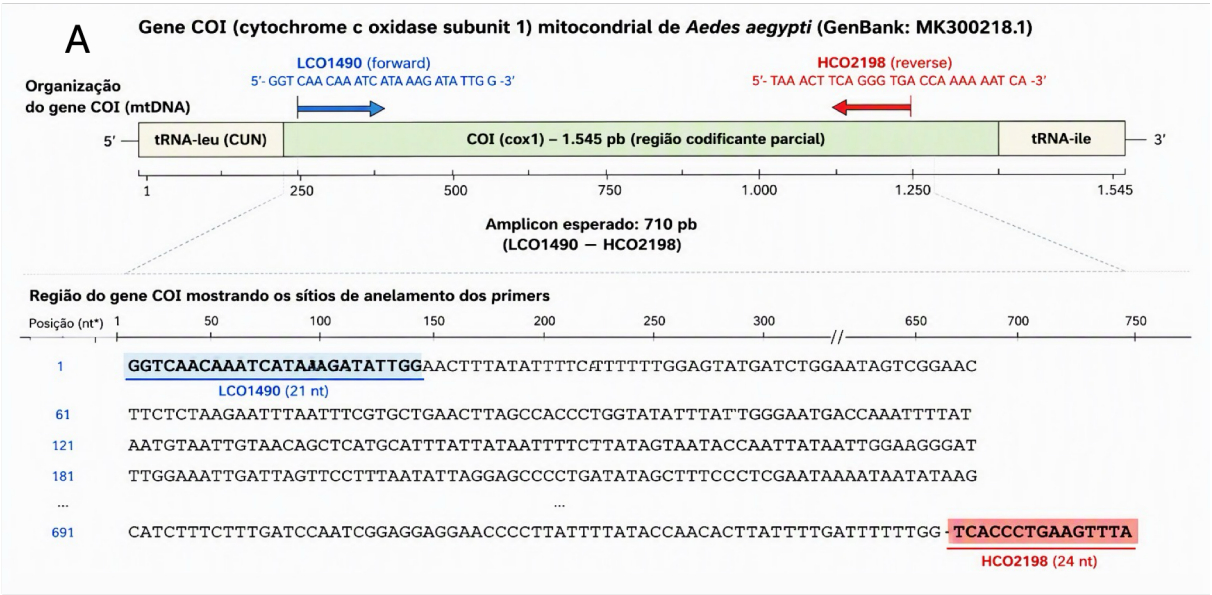
Na eletroforese, a primeira canaleta foi carregada com o marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (NEB), servindo de referência para as amostras dispostas sequencialmente (1 a 10). A análise do gel revelou que todas as amostras, com exceção da amostra 7, apresentaram amplificação positiva para o gene do mosquito. Esse resultado mostra o sucesso do protocolo de extração de RNA e da PCR, validando a eficiência de ambos os métodos para obtenção de amostras do mosquito.

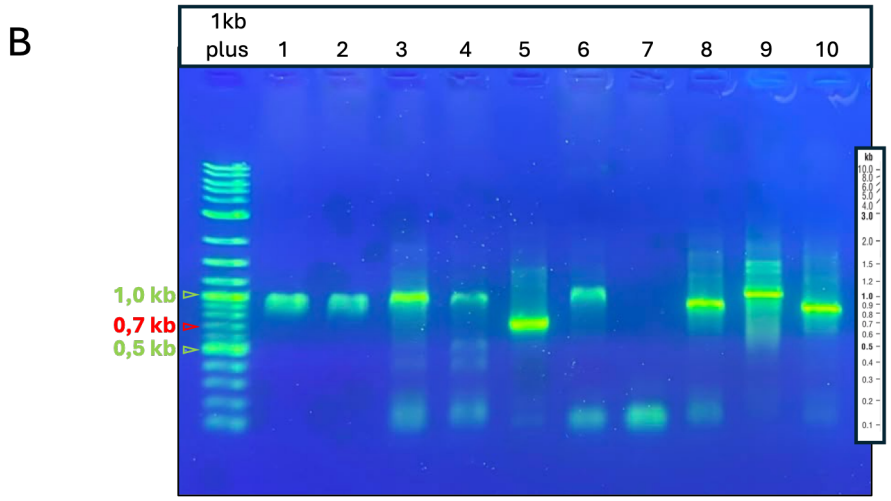
É possível também verificar que a amostra 5 foi a única que apresentou um fragmento do tamanho esperado de 710 bp (Fig. 3B - indicado pela seta vermelha). Por outro lado, a amostra 7 foi a única que não apresentou qualquer *amplicon*. A presença de uma banda mais intensa, com tamanho entre 900 e 1000 bp, além de outras bandas mais fracas e de tamanhos variados, nas amostras 3, 4, 6, 8, 9 e 10, sugerem pareamento inespecífico dos oligonucleotídeos. Vale ressaltar que para essa reação a temperatura de anelamento foi baixa (48°C) e pode ter permitido o alinhamento com cópias de pseudogenes da COI.

Corroborando com essa hipótese, Hlaing e colaboradores (2009) descreveram a existência dessas cópias truncadas e repetições do gene da citocromo c oxidase (COI) no genoma nuclear de *Ae. aegypti*. Tais sequencias são denominadas NUMTs (*nuclear mitochondrial pseudogene*) e podem representar um risco para experimentos de *barcoding*

sugeridos por Folmer et al. (1994). Nesse estudo os autores descrevem trechos de poucos a milhares de pares de bases de genes mitocondriais no genoma nuclear de *Ae. aegypti*. Em outro estudo, Moulton, Song e Whiting (2010) verificam que mesmo aumentando a especificidades dos *primers de Folmer*, não foi possível eliminar a amplificação de sequências nucleares. Em nossa amostra, por se tratar de cDNA derivado de RNA, não seria esperado encontrarmos sequências de DNA genômico de *Aedes*, no entanto, frente às dificuldades de purificação evidenciadas pelas análises em espectrofotômetro, não é improvável que haja também contaminação por DNA nas amostras de RNA.

Figura 3 – Amplificação de fragmento do gene *COI* de *Ae. aegypti*: (A) Mapa de alinhamento dos oligonucleotídeos LCO1490 e HCO2198 ao gene *COI*; (B) Eletroforese do produto amplificado a partir das amostras 1 a 10. Marcador de peso molecular – 1kb plus (*New England Biolabs*).



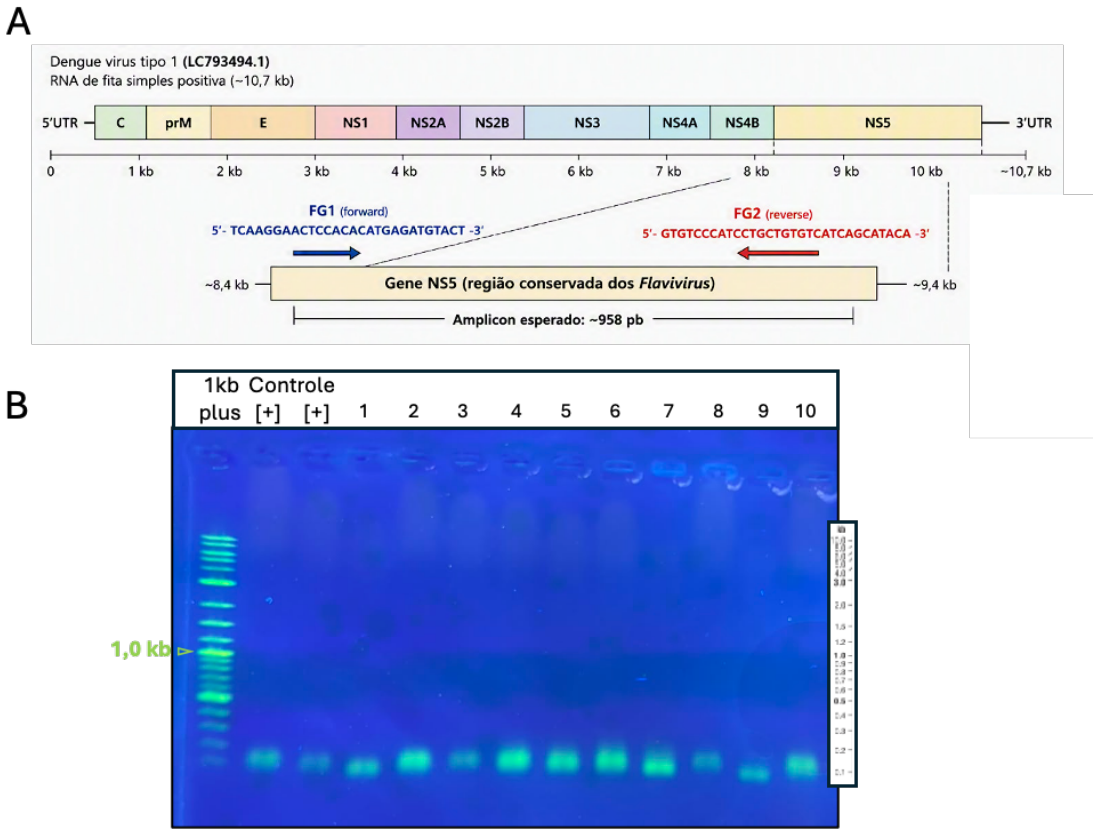


Fonte: (A) Elaborada com auxílio IA Copilot (Microsoft®); (B) Elaboradas pela autora (2026).

Uma vez confirmada a síntese de cDNA do vetor, seguimos para o objetivo final que seria a amplificação do genoma viral. Para tanto, realizou-se uma PCR utilizando os oligonucletídeos genéricos do vírus da Dengue, Fow-FG1 e Rev-FG2. A Figura 4 apresenta um esquema do gene *NS5* do vírus e da região de pareamento dos oligonucleotídeos FG1 e FG2.

Apesar de seguirmos o procedimento descrito do Bronzoni et al. (2005), incluindo a sequência dos oligonucleotídeos Fow-FG1 e Rev-FG2, não foi possível observar qualquer produto amplificado (Fig. 4B), inclusive nas duas amostras de controle positivo, seja com cDNA obtido em reação com *random primers* como pelo Rev - FG2. A amostra de cDNA obtido com o Rev-FG2 também foi testada em reação de PCR com os pares de oligonucleotídeos Fow-FG1 e os Rev- DENV-1, DENV-2, DENV-3 ou DENV-4, sem sucesso.

Figura 4 – Mapa de sequenciamento do genoma de RNA do vírus DENV e eletroforeses contendo as amostras de 1 a 10 e controles para vírus



Fonte: (A) Elaborada com auxílio IA Copilot (Microsoft®); (B) Elaboradas pela autora (2026).

A falta de amplificação de amostras virais nas amostras 1 a 10 poderia indicar mosquitos não infectados, caso o controle positivo tivesse amplificado o fragmento de 958 bp esperado para a reação. No entanto, os resultados negativos também com o controle positivo sugerem três hipóteses mais prováveis: (1) possível degradação do RNA viral da amostra controle, devido ao transporte entre os laboratórios do IMT-USP e CCBS-Mackenzie, uma vez

que o RNA é um material biológico instável e sensível à degradação térmica; (2) degradação dos oligonucleotídeos de DENV, sintetizados em estudo anterior, durante o ano de 2023; (3) ineficiência na síntese d cDNA viral a partir de amostras com abundância de RNA do vetor.

Para responder a essas questões será importante testar outros protocolos de PCR para identificação do vírus DENV a partir de amostras de *Aedes* adultos e buscar novas alíquotas de RNA viral para controle positivo, que sejam transportadas em gelo seco ou nitrogênio líquido (< -70°C).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu avaliar comparativamente os métodos de extração de RNA e diagnosticar a viabilidade do material genético obtido de *Ae. aegypti* capturados por armadilhas BioAedes Trap®. De maneira geral, houve dificuldades para obtenção de amostras de qualidade a partir de macerados de mosquitos *Aedes* adultos. De todo modo, o protocolo de extração feita pelo QIAamp® demonstrou desempenho superior ao método por extração do TRI Reagent®, garantindo amostragem com menor índice de contaminantes e melhor compatibilidade com as reações subsequentes.

A funcionalidade da síntese de cDNA e da PCR foi confirmada pela amplificação bem-sucedida do gene *COI* do vetor na maioria das amostras. Contudo, a ausência de sinal para o vírus da Dengue no controle positivo sugere falhas na preservação ou purificação do RNA viral, seja durante o transporte, seja pela abundância de RNA do vetor, ou mesmo pela perda de eficiência dos oligonucleotídeos. Novos protocolos deverão ser testados com essas amostras a fim de confirmar a viabilidade de diagnóstico molecular a partir de espécimes de *Ae. aegypti* aprisionados no cartão adesivo da armadilha BioAedes Trap ®.

6. REFERÊNCIAS

AMOS, B. A.; CARDÉ, R. T. Efficiency of CO_2 -baited CDC miniature light traps under semi-field conditions and characterizing response behaviors of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 45, n. 2, p. 180–187, 18 nov. 2020.

BRONZONI, R. V. M. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

COSTA, Z. G. A. et al**.** Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 16-16, 2011.

DE CASTRO CATÃO, R.; GUIMARÃES, R. B. Mapeamento da reemergência do dengue no Brasil-1981/82-2008. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 7, n. 13, p. 173-185, 2011.

DE-SOUZA, M.; BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Ed. UnB, 2016.

FAPESP. **Armadilha inteligente pode ajudar a monitorar e controlar a circulação do mosquito da dengue.** Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/armadilha-inteligente-pode-ajudar-a-monitorar-e-controlar-a-circulacao-do-mosquito-da-dengue/54006>.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**, v. 3, n. 5, p. 294-9, 1994.

FREITAS, F.A.G.; ANDRADE, F.A. Dengue: uma revisão narrativa da literatura. **Sociedade Científica**, v. 6, n. 1, p. 3408–3455, 21 dez. 2023.

GARCIA, C. et al. Evaluation of Multiple RNA Extraction Protocols for Chikungunya Virus Screening in *Aedes aegypti* Mosquitoes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 12, p. 6700–6700, 18 jun. 2024.

GOMES, Erika Oliveira et al. Detection of Zika virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes collected in urban forest fragments in the Brazilian Amazon. *Viruses*, v. 15, n. 6, p. 1356, 2023.

HLAING, T. et al. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. **BMC Genetics**, S.l., v. 10, artigo 11, 6 mar. 2009.

LANA, R. M. et al. Assessment of a trap based *Aedes aegypti* surveillance program using mathematical modeling. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0190673, 5 jan. 2018.

LEANDRO, A. S. et al. Citywide Integrated *Aedes aegypti* Mosquito Surveillance as Early Warning System for Arbovirus Transmission, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 701–706, abr. 2022.

LEANDRO, A. DE S. et al. Entomo-Virological *Aedes aegypti* Surveillance Applied for Prediction of Dengue Transmission: A Spatio-Temporal Modeling Study. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 4, 1 jan. 2023.

LOCATELI, V. **Brasil contabiliza cerca de 1.600 mortes por dengue em 2024; número é o mais alto desde o ano 2000.** Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/nacional/brasil-contabiliza-cerca-de-1-600-mortes-por-dengue-em-2024-numero-e-o-mais-alto-desde-o-ano-2000/>.

LOCATELI, V. **Brasil se aproxima de mil mortes por dengue em 2024**. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/nacional/brasil-se-aproxima-de-mil-mortes-por-dengue-em-2024/>.

LÖWY, I. Leaking Containers: Success and Failure in Controlling the Mosquito *Aedes aegypti* in Brazil. **American Journal of Public Health**, v. 107, n. 4, p. 517–524, abr. 2017.

MENEZES, B. C. **Monitoramento Urbano De *Aedes aegypti*: Uma Abordagem Quantitativa com a armadilha BioaedesTrap**. Orientadora: Camila Sacchelli Ramos. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) — Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2025.

MOULTON, M. J.; SONG, H.; WHITING, M. F. Assessing the effects of primer specificity on eliminating numt coamplification in DNA barcoding: a case study from Orthoptera (Arthropoda: Insecta). **Molecular Ecology Resources**, S.l., v. 10, n. 4, p. 615–627, jul. 2010.

NOGUEIRA, G. F. et al. **Doenças virais no Brasil: emergências reemergências**. São Paulo: Editora Appris, 2021.

OLIVEIRA, D.; MAFRA, S. Implementation of an Intelligent Trap for Effective Monitoring and Control of the *Aedes aegypti* Mosquito. **Sensors**, v. 24, n. 21, p. 6932, 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Metodologia para avaliar as estratégias nacionais para a prevenção e controle das arboviroses nas Américas**. Washington, D.C.: Organização Pan-Americana da Saúde; 2022. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: https://doi.org/10.37774/9789275724415.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Wolbachia contra a dengue: OPAS faz acompanhamento técnico, do início ao encerramento, de projetos em Campo Grande e Petrolina.** 18 jul. 2024. Disponível em: https://www.paho.org/pt/noticias/18-7-2024-wolbachia-contra-dengue-opas-faz-acompanhamento-tecnico-do-inicio-ao.

RAHMAN, R. U. et al. Insecticide resistance and genetic structure of *Aedes aegypti* populations from Rio de Janeiro State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0008492, 16 fev. 2021.

RAMÍREZ, A. L. et al. Metagenomic Analysis of the Virome of Mosquito Excreta. **mSphere**, v. 5, n. 5, 8 set. 2020.

RIBEIRO, Marisa O. et al. Analytical and clinical performance of molecular assay used by the Brazilian public laboratory network to detect and discriminate Zika, Dengue and Chikungunya viruses in blood. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 101542, 2021.

SILVA, J. S.; DE FÁTIMA MARIANO, Z.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 4, n. 6, p. 163-175, 2008.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867–871, jun. 2002.

WEIDNER, L.et al. Sample buffer containing guanidine-hydrochloride combines biological safety and RNA preservation for SARS-CoV-2 molecular diagnostics. **Diagnostics**, v. 12, n. 5, p. 1186, 2022.

WERMELINGER, E. D.; CARVALHO, R. W. Métodos e procedimentos usados no controle do *Aedes aegypti* na bem-sucedida campanha de profilaxia da febre amarela de 1928 e 1929 no Rio de Janeiro. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 25, p. 837-844, 2016.

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

Contatos: juliavazlisboa@gmail.com e camila.ramos@mackenzie.br

Declaração de uso de ferramentas de IA:

Eu, Julia Vaz Lisboa, discente vinculada à Universidade Presbiteriana Mackenzie responsável pela produção intitulada, declaro, para os devidos fins, que fiz uso de Sistemas de Inteligência Artificial na elaboração desta produção, conforme descrito abaixo:
1. Ferramenta(s) ou plataforma(s) de IA utilizada(s): Microsoft 365 Copilot; Consensus 2.0 (*free version*); Chat GPT (Plus)
2. Finalidade(s) do uso (assinalar as aplicáveis):
( ) Ideação e organização inicial de ideias
(X) Revisão linguística, gramatical ou estilística: tradução do resumo para idioma inglês (abstract)
( ) Sumarização ou organização de informações
(X) Apoio à programação ou análise de dados: levantamento bibliográfico para discussão dos resultados
(X) Outras (especificar): elaboração de imagens (figuras 3A e 4A)
Declaro que o uso de Sistemas de Inteligência Artificial ocorreu exclusivamente como ferramenta de apoio, tendo sido realizada revisão crítica, validação e curadoria humana integral de todo o conteúdo final, assumindo total responsabilidade por sua autoria, veracidade, originalidade e conformidade ética, em observância à Política de Uso de Inteligência Artificial da Universidade Presbiteriana Mackenzie e à legislação vigente.

São Paulo, 25 de agosto de 2026. Assinatura: Julia Vaz