

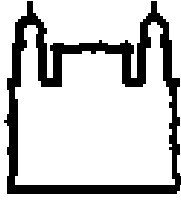
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Interação vírus-vetor: caracterização da região 3' não-codificante (NC) de vírus dengue tipo 3 (DENV-3), isolados de mosquitos e humanos, após a infecção experimental sucessiva e simultânea em mosquitos

THAÍS CHOUIN CARNEIRO

RIO DE JANEIRO

Março de 2014



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Thaís Chouin Carneiro

Interação vírus-vetor: caracterização da região 3' não-codificante (NC) de vírus dengue tipo 3 (DENV-3), isolados de mosquitos e humanos, após a infecção experimental sucessiva e simultânea em mosquitos

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

Laboratório de Flavivirus, IOC/FIOCRUZ

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

Laboratório de Transmissores de Hematozoários, IOC/FIOCRUZ

RIO DE JANEIRO

Março de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C289 Carneiro, Thais Chouin

Interação vírus-vetor: caracterização da região 3'não-codificante (NC) de vírus dengue tipo 3 (DENV-3), isolados de mosquitos e humanos, após a infecção experimental sucessiva e simultânea em mosquitos / Thais Chouin Carneiro. – Rio de Janeiro, 2014.

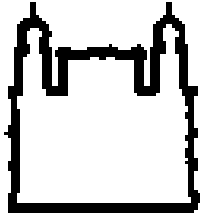
xvii, 96 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 65-79

1. DENV-3. 2. 3'NC. 3. Interação vírus-vetor. 4. *Aedes aegypti*. 5. I.
Título.

CDD 616.91852



MINISTÉRIO DA SAÚDE

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária

Thaís Chouin Carneiro

Interação vírus-vetor: caracterização da região 3' não-codificante (NC) de vírus dengue tipo 3 (DENV-3), isolados de mosquitos e humanos, após a infecção experimental sucessiva e simultânea em mosquitos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

Laboratório de Flavivirus, IOC/FIOCRUZ

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

Laboratório de Transmissores de Hematozoários, IOC/FIOCRUZ

Aprovada em: 28/03/2014.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas-IOC/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo- IOC/FIOCRUZ

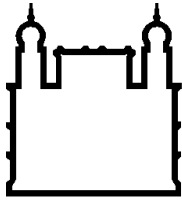
Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine- UFRJ

Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior- IOC/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Ana Bahia Nascimento-UFRJ

Rio de Janeiro

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que Thais Chouin Carneiro, sob orientação de Dr^a Flávia Barreto dos Santos, foi aprovada em 28/03/2014, em sua defesa de dissertação de mestrado intitulada: **“Interação vírus-vetor: caracterização da região 3 não-codificante (NC) de vírus dengue tipo 3 (DENV-3), isolados de mosquitos e humanos, após a infecção experimental sucessiva e simultânea em mosquitos”**, área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Rafael Maciel de Freitas – IOC/Fiocruz (presidente), Dr^a Myrna Cristina Bonaldo – IOC/Fiocruz e Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine – UFRJ; e como suplentes Dr. Ademir de Jesus Martins Junior – IOC/Fiocruz e Dr^a Ana Cristina Bahia Nascimento – UFRJ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria nº. 2720, de 20.12.89, do Ministério da Educação e Cultura, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 7 (sete) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa dura (2 cópias), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação *on line* e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.

Rio de Janeiro, 28 de março de 2014.

Coordenação do Programa de Pós-graduação
Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz

DEDICATÓRIA

Dedico a você que está lendo, pois assim alcanço o mais belo objetivo desta dissertação:
dividir e transmitir mais conhecimentos.

*“Não existem sonhos impossíveis
para aqueles que realmente
acreditam que o poder realizador
reside no interior de cada ser humano,
sempre que alguém descobre esse poder
algo antes considerado impossível se torna realidade.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À coordenação da Pós-Graduação em Biologia Parasitária- IOC/FIOCRUZ, pelo apoio durante a realização desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de estudo.

À Plataforma de Sequenciamento de DNA - PDTIS/FIOCRUZ, pela contribuição na eletroforese capilar das amostras analisadas e suporte técnico.

À Dr^a Flávia Barreto dos Santos, sou eternamente grata pela oportunidade, pela acolhida, pela amizade, pela competência, pelo incentivo e por me entender e acreditar que tudo vai dar certo, mesmo eu sendo a pessoa mais neurótica! Agradeço a Deus por ter te colocado no meu caminho!

Ao Dr. Ricardo Lourenço pela orientação, pela competência, pela confiança, pela amizade, pelo apoio e estímulo no meu desenvolvimento.

Ao Dr. Rafael Maciel de Freitas pela revisão, assim como as sugestões a mim sugeridas.

A todos os membros da banca por aceitarem o convite.

À Dr^a Rita Maria Ribeiro Nogueira pela oportunidade e pelos ensinamentos.

À Dr^a Ana Maria Bispo de Filippis, pelo apoio e sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Flavivírus, Dinair Couto, Eliane Saraiva, Simone Sampaio, Marcos César Mendonça, Alex Pauvolid, Jaqueline Bastos Santos Simões, Nieli Rodrigues da Costa Faria, Monique da Rocha Queiroz Lima, Manoela Heringer, Bianca Di Santis, Priscila Conrado Guerra Nunes, Cintia Damasceno e Liliane Conteville, José da Costa Farias Filho, Leda Maria dos Santos, Ana Lúcia Bastos, e Solange Conceição, pela amizade, incentivo e colaboração durante a realização desta dissertação.

À Dr^a Márcia Castro, pela amizade, pelo incentivo, pelos conselhos dados durante a realização desta dissertação e a todos do Lathema pelo apoio.

À Dr^a Denise Valle, pela confiança e contribuição no meu crescimento profissional e a todos do Laficave pelos ensinamentos e pelas amizades construídas.

Ao Luiz Paulo que esteve comigo nessa caminhada dividindo as preocupações e as alegrias!

À Miriam Palomino, por fazer os dias no infectório mais alegres, pelas conversas e por todo o apoio.

Ao Mauro Menezes, por toda ajuda no experimento.

Ao Gabriel Sylvetre, por me ajudar a entender estatística.

À minha mãe, pelo amor mais sincero, por ser cúmplice dos meus sonhos, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e ajudando. Obrigada por andar comigo nas ruas do centro da cidade procurando tubos de acrílico, e “implorando” tubos de papelão, para confeccionarmos as gaiolas dos mosquitos, e com o maior orgulho! Sem dúvida, os dias são mais felizes com você!

Ao meu pai, pelo apoio, pelas preces, que apesar de tudo sempre acreditou na minha capacidade, por não me deixar desistir, mesmo se o que eu estiver procurando for uma tripa suína! Achamos a Casa do Pato em Duque de Caxias!!.

Ao meu irmão, pelo amor, pelo carinho de ogro e por estarmos sempre juntos, que mesmo com as dificuldades que passamos teremos sempre um ao outro.

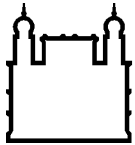
À minha Tia Márcia, por termos um relacionamento de mãe e filha, por me incentivar em todos os momentos da minha vida, por me guiar, e por sempre torcer pela minha felicidade.

Ao meu companheiro e amigo Thiago Aires, por simplesmente caminhar ao meu lado, por fazer os momentos difíceis mais felizes, pela paciência inquestionável, pelo amor, pela cumplicidade e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Às minhas amigas, Isabel de Mello, Suellen Kondo, Kamila Sarnaglia e Gabriela de Azambuja, minha sincera gratidão pela amizade verdadeira, pelas inesgotáveis conversas e pelos momentos inesquecíveis!

A Deus, por mais esse dia, pela vida, bênção e proteção.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.



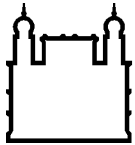
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

A dengue é considerada a mais importante das doenças virais transmitida por artrópodes que acomete o homem. O vírus dengue (DENV) é mantido na natureza através de replicação cíclica em hospedeiros vertebrados e mosquitos *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor. O seqüenciamento completo de DENV-3 isolado de *Ae. aegypti* naturalmente infectado do Rio de Janeiro em 2001 e de um caso humano em 2002, demonstrou uma similaridade de 99% com DENV-3 isolado de um caso fatal humano ocorrido no mesmo período. A análise da região 3'NC do genoma viral demonstrou uma mutação nesta região, sugerindo uma deleção de 8 nucleotídeos (nts) na inserção de 11nts, característica de DENV-3 isolados no Brasil. Neste estudo, avaliamos se as diferentes variantes de DENV-3 na interação vírus-vetor através da determinação da competência vetorial em *Ae. aegypti*. As cepas de DENV-3 BR74886 #5 (cepa representativa do vírus com inserção de 11nts na região 3'NC) e BR73356 #5 (cepa representativa do vírus com a deleção de 8 nts), apresentando títulos de 8×10^7 PFU/mL e $7,3 \times 10^7$ PFU/mL, respectivamente, mantiveram suas características na região 3'NC do genoma viral após cinco passagens em cultura celular e foram selecionadas para a infecção experimental. A estratégia de infecção consistiu na utilização de 2.925 fêmeas de *Ae. aegypti*, sendo que 2.340 da geração F1 da população de Tubiacanga (RJ) e 585 da cepa controle Paea. A população experimental se mostrou competente para transmitir as duas cepas virais de DENV-3, no entanto a disseminação viral no corpo do mosquito apresentou-se de forma heterogênea, sugerindo haver vantagens para a cepa com inserção de 11 nts, uma vez que disseminou-se mais rapidamente. Quando as fêmeas de *Ae. aegypti* foram alimentadas com ambas as cepas, a disseminação no vetor comportou-se de maneira semelhante à observada quando alimentadas com a cepa representativa da inserção de 11 nts. A análise das cepas de DENV-3 detectadas nas cabeças das fêmeas após replicação *in-vivo* por 14 dias, não identificou alterações nas características de cada cepa. No entanto, a análise desta região demonstrou uma prevalência do vírus com a inserção de 11 nts quando as fêmeas foram alimentadas com as duas cepas simultaneamente. Variações entre os títulos virais foram observados nas salivas de fêmeas infectadas com as diferentes cepas virais, sugerindo que embora ambas as cepas de DENV-3 possam ser transmitidas na natureza, a cepa com a inserção de 11 nts possui maior eficácia. Os resultados indicam que diferentes cepas virais, variantes genéticas ou mutações que ocorram em um mesmo genótipo podem impactar na competência vetorial dos mosquitos, podendo afetar diretamente o potencial epidêmico de uma cepa de vírus em particular.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Dengue is considered the most important arthropod-borne viral disease that affects humans. Dengue virus (DENV) is maintained in nature by a cyclic replication in vertebrate hosts and *Aedes* mosquitoes, with the *Aedes aegypti* as the main vector. The complete sequencing of a DENV-3 strain isolated from *Ae. aegypti* naturally infected in Rio de Janeiro in 2001 and from a human case occurred in 2002 demonstrated a similarity of 99% with a DENV-3 isolated from a human fatal case occurred in the same period. However, the analysis of the 3' Untranslated Region (UTR) of the viral genome showed a mutation in this region, suggesting a deletion of 8 nucleotides (nts) within the 11 nucleotides insertion, characteristic of DENV-3 isolated in Brazil. In this study, we evaluated whether the distinct DENV-3 variants presenting those characteristics showed differences on the virus-vector interaction by determining the vector competence of two populations of *Ae. aegypti*. The DENV-3 strain BR74886#5 (with the 11nts insert in the region 3'UTR) and the strain BR73356#5 (with an 8 nts deletion), presented titers of 8×10^7 PFU/mL and 7.3×10^7 PFU/mL, respectively, maintained its characteristics in the 3'UTR region of the viral genome after five passages in cell culture and were selected for experimental infection. The infection strategy consisted in the use of 2,925 female *Ae. aegypti*: 2,340 of a F1 generation from the Tubiacanga (RJ) population and 585 Paea control mosquitoes. The experimental population proved to be competent to transmit the two DENV-3 strains. However, the viral dissemination in the body of the mosquito presented heterogeneously, suggesting that there are advantages for the strain with 11 nts insertion in the 3'UTR, once disseminated more rapidly. When *Ae. aegypti* were fed with the both strains, the viral dissemination in the vector was similar to that observed when fed with 11 nts insertion in the 3'UTR. The analysis of the 3' UTR from the DENV-3 strains detected in the heads of females after *in-vivo* replication for 14 days, did not identify changes in the 3' UTR of each strain. However, the analysis of the females infected with two strains simultaneously detected only the presence of the strain carrying the 11 nts insertion in the 3' UTR. Viral titer differences were observed in the saliva of the experimentally infected *Ae.aegypti* females suggesting that even tough both variants are transmissible, the variant presenting the 11nts is more efficiently transmitted. The results indicate that different viral strains, genetic variants or mutations that occur in the same genotype may impact on the vector competence of mosquitoes, which can directly affect the epidemic potential of a particular virus strain.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XV
SIGLAS E ABREVIATURAS	XVI
RESUMO.....	IX
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Dengue – Antecedentes Históricos e Atualidades.....	1
1.2 A Dengue no Brasil.....	5
1.3 O vírus e sua organização genômica.....	8
1.4 Variabilidade genética dos vírus dengue	12
1.5 Replicação viral.....	13
1.6 Ciclos de transmissão do dengue	15
1.7 Vetores transmissores dos vírus dengue.....	17
1.8 Interação vírus-vetor.....	21
1.9 Competência vetorial.....	22
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivos específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Cepas de DENV-3.....	28
4.2 Obtenção de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> F1 para infecção viral	29
4.3 Infecção oral de fêmeas de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> com DENV-3.....	31
4.4 Detecção viral em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> experimentalmente infectadas para a determinação a taxa de disseminação	33
4.5 Obtenção da saliva dos mosquitos infectados experimentalmente para a detecção viral e determinação da taxa de transmissão.	35
4.6 Extração do RNA viral.....	36
4.7 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)	36
4.8 Eletroforese em gel de agarose para a análise dos produtos de amplificação por RT-PCR	39
4.9 Titulação viral por RT-PCR quantitativo, sistema <i>TaqMan</i> (qRT-PCR).....	39

4.10	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para sequenciamento da região 3'NC dos DENV-3	41
4.10.1	Purificação do DNA amplificado por RT-PCR.....	42
4.10.2	Quantificação do DNA purificado.....	43
4.10.3	Reação de sequenciamento.....	43
4.10.4	Análise das sequências	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Produção de estoques virais de cepas representativas de DENV-3 para infecção experimental de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	45
5.2	Infecção experimental de fêmeas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> por via oral com distintas variantes de DENV-3.....	48
5.3	Determinação da disseminação das cepas de DENV-3 em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> por RT-PCR.....	49
5.4	Taxa de transmissão: detecção e quantificação de DENV-3 na saliva de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> experimentalmente infectados	52
5.5	Caracterização molecular da região 3'NC do genoma de cepas DENV-3 recuperadas após a replicação em fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> 14 dpi.	54
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO	63
8	PERSPECTIVAS	64
9	BIBLIOGRAFIA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mudança na distribuição dos sorotipos de dengue no mundo em 1970 (a) e 2004 (b).....	4
Figura 2 - Casos notificados e atividade dos vírus dengue de 1986 à 2013* Fonte: SVS/MS, *até Julho de 2013.....	7
Figura 3 – (A) Micrografia eletrônica e (B) esquema representativo da partícula do vírus dengue.....	9
Figura 4 - Organização do genoma do vírus dengue. (A) Regiões 5´ e 3´ não codificantes (NC) e a fase aberta de leitura (ORF) indicando os genes estruturais (C, prM, E) e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (B) Esquema representativo dos elementos constituintes da região 3´NC dos DENV. As estruturas previstas para os três domínios estão indicados: domínio I (região variável [VR]), domínio II e domínio III (sequência conservada CS1 e 3´stem-loop [3´SL]).....	10
Figura 5: Alinhamento das sequências nucleotídicas da região 3´NC de DENV-3 dos isolados de mosquitos naturalmente infectados, comparado as cepas brasileiras isoladas de casos humanos e ao protótipo H87(GenBank accession number M93130). A inserção de 11 nucleotídeos comum às cepas brasileiras de DENV-3 Genótipo III e a deleção de 8 nucleotídeos característica dos isolados de mosquitos são demonstrados.	11
Figura 6 - Ciclo de transmissão do vírus da dengue (DENV).....	16
Figura 7 - (A) Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> e (B) fêmea de <i>Aedes albopictus</i>	17
Figura 8 - Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento do mosquito vetor <i>Ae. aegypti</i>	19
Figura 9 - Ciclo de infecção do vírus dengue no hospedeiro invertebrado.....	21
Figura 10 - Barreiras que um arbovírus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo.	23
Figura 11 - Obtenção das fêmeas adultas de <i>Ae. aegypti</i> para a infecção experimental com vírus dengue no Insetário do Laboratório de Transmissores, IOC/FIOCRUZ. (A) Aspecto da manutenção das cubas com formas imaturas; (B) Gaiolas cilíndricas de eclosão e manutenção dos adultos; (C) Copos contendo pupas e alimento açucarado dentro da gaiola cilíndrica.	30
Figura 12 - Esquema da alimentação artificial via oral das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> com DENV-3 (A e B) e triagem das fêmeas ingurgitadas pós infecção (C).	32
Figura 13 - Desenho experimental para infecção de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> controle (Paea) com as distintas cepas de DENV-3.....	33
Figura 14 - Desenho experimental para infecção de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> (população de Tubiacanga, RJ) com as distintas cepas de DENV-3..	34
Figura 15 - Estratégia de amplificação do RNA viral dos vírus dengue (DENV) por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de acordo com protocolo descrito por Lanciotti et al., 1992. A: Transcrição	

reversa e amplificação do RNA viral utilizando iniciadores consensuais. B: Tipagem dos vírus dengue utilizando iniciadores tipo-específicos.	38
Figura 16 - Quantificação do título viral das variantes de DENV-3 após três passagens em cultura celular para produção de estoque viral por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR).	45
Figura 17 - Quantificação do título viral por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) das variantes de DENV-3 após produção do estoque viral (quarta passagem).	46
Figura 18 - Alinhamento das sequências nucleotídicas das regiões 3'NC dos genomas das variantes de DENV-3 após produção de massa viral para confirmação de suas características.	47
Figura 19 - Quantificação do título viral por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) das variantes de DENV-3 após cinco passagens em cultura celular	47
Figura 20 - Proporção de pools positivos de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> de Tubiacanga, ao longo de 12 dias pós infecção com duas cepas de DENV-3 separadamente e com co-infecção. Para cada tempo, foram analisados por RT-PCR, 2 pools (5 indivíduos), correspondentes aos homogenatos de cabeça. .	50
Figura 21 - Taxa de disseminação determinada pela detecção do RNA viral na cabeça dos mosquitos por RT-PCR na população de <i>Ae. aegypti</i> de Tubiacanga oralmente expostas a duas cepas de DENV-3 e com a infecção simultânea das mesmas.....	51
Figura 22 - Porcentagem de salivas de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> com detecção do RNA viral por qRT-PCR após 14 dpi com as diferentes cepas de DENV-3... ..	53
Figura 23 - Quantificação da carga viral (cópias de RNA/ml) individual de DENV-3 detectados nas salivas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> da população de Tubiacanga ao 14 ^o dpi.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação genotípica dos vírus dengue (DENV) baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Chen & Vasilakis (2011).	13
Tabela 2 - Cepas de DENV-3 isoladas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> naturalmente infectados e de casos humanos previamente caracterizadas e selecionadas para este estudo.....	28
Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.....	37
Tabela 4 - Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), de acordo com o protocolo de Lanciotti et al (1992).	38
Tabela 5 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan) para a detecção e quantificação do DENV-3 (Johnson et al 2005).	40
Tabela 6 - Reagentes utilizados na RT-PCR em tempo real para detecção dos DENV-3 de acordo com o protocolo de Johnson et al (2005).	40
Tabela 7 - Parâmetros de termociclagem da RT-PCR em tempo real para detecção dos DENV-3 de acordo com o protocolo de Johnson et al (2005). ...	41
Tabela 8 - Reagentes utilizados na RT-PCR para amplificação e sequenciamento da região 3'NC do genoma de DENV-3	42
Tabela 9 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR para amplificação e sequenciamento da região 3'NC do DENV-3.	42
Tabela 10 - Condições de termociclagem utilizados na RT-PCR para amplificação e sequenciamento da região 3'NC do DENV-3.	42
Tabela 11 - Parâmetros de termociclagem utilizados na reação para o sequenciamento da região 3'NC dos DENV-3.	43
Tabela 12 - Percentuais das duas populações de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentadas na infecção experimental, expostas as diferentes cepas virais de DENV-3.	48
Tabela 13 - Taxas de disseminação de DENV-3 em populações de <i>Ae. aegypti</i> examinadas 14 dias após serem oralmente expostas às diferentes cepas virais.	50
Tabela 14 – Taxa de mortalidade entre as fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> ingurgitadas após infecção oral com cepas de DENV-3 observada ao longo de 21 dpi.	52

SIGLAS E ABREVIATURAS

♀	Fêmea
3'NC	3' não codificante (3' non-coding region)
3'SL	3' stem-loop
5'NC	5' não codificante (5' non-coding region)
a.C	Antes de Cristo
aa	Aminoácido
Ae.	<i>Aedes</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Proteína do capsídeo
C6/36	Cultura celular de <i>Ae. albopictus</i> clone 6 passagem 36
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	DNA complementar
CR	Complexo de replicação
CS1	Sequência conservada 1 (conserved sequence – CS1)
CS2	Sequência conservada 2 (conserved sequence – CS2)
Ct	do inglês Cycle Threshold
Dpi	Dias após a infecção
D1	Iniciador sense D1
D2	Iniciador anti-sense D2
DC-SIGN	Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de DC (DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin)
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
E	Proteína do envelope
EUA	Estados Unidos da América
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FR	Forma replicativa
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IR	Intermediário replicativo
kb	Kilobase
L-15	Leibovitz-15
M	Proteína de membrana
MEB	do inglês <i>Midgut Escape Barrier</i>
MIB	do inglês <i>Midgut Infection Barrier</i>
MS	Ministério da Saúde
NC	Não codificante
NS	Proteína Não estrutural

NS1	Proteína não estrutural 1
NS2A	Proteína não estrutural 2 ^a
NS2B	Proteína não estrutural 2B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4A	Proteína não estrutural 4 ^a
NS4B	Proteína não estrutural 4B
NS5	Proteína não estrutural 5
Nts	Nucleotídeos
ORF	do inglês <i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PAHO	Pan American Health Organization
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PFU	Unidade formadora de placa
PIE	Período de Incubação Extrínseco
PrM	Proteína de Pré-membrana
qRT-PCR	RT-PCR em tempo real
RCS2	Sequência repetida conservada
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNA(-)	RNA polaridade negativa
RNA(+)	RNA polaridade positiva
RNA _{df}	RNA dupla fita
RNA _{fs}	RNA fita simples
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SCD	Síndrome do Choque por Dengue
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
TS1	Iniciador tipo-específico para DENV-1
TS2	Iniciador tipo-específico para DENV-2
TS3	Iniciador tipo-específico para DENV-3
TS4	Iniciador tipo-específico para DENV-4
TV	Transmissão Vertical
VR	Região variável (variable region – VR)
WHO	World Health Organization
YVF	Do Inglês Yellow Fever Virus (Vírus da Febre Amarela)

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Dengue – Antecedentes Históricos e Atualidades

Os primeiros registros de uma doença semelhante à dengue estão descritos na Enciclopédia Chinesa de sintomas e remédios durante a Dinastia Chin (265-420 a.C.), Dinastia Tang (610 a.C.) e Dinastia Norte Sung (992 a.C.) (Gubler 1998). Essas descrições relatavam uma doença conhecida como “água envenenada”, devido à associação dos insetos voadores com a água. Os aspectos clínicos foram caracterizados por exantema, febre, dor nos olhos, artralgia, mialgia e manifestações hemorrágicas, incluindo sangramento de orofaringe, gengiva, intestinal e vaginal (Gubler 1997). Novos relatos apareceram apenas no século XVII, nas Antilhas Francesas, em 1635, e no Panamá, em 1699, descrevendo uma doença aguda com convalescença prolongada (Gubler 1997, 1998).

As primeiras notificações de grandes epidemias de uma doença com sintomas semelhante à dengue datam de 1779 e 1780 e ocorreram em três continentes (Ásia, África e América do Norte) (McSherry 1982). A simultaneidade e proximidade das ocorrências de epidemias indicam que o vírus e o seu vetor estão distribuídos nos trópicos há mais de 200 anos (Mahmood 2006).

A primeira descrição clínica seguramente detalhada da dengue foi realizada por Benjamin Rush ao descrever uma epidemia de “febre remitente biliar”, com a utilização do termo “febre quebra ossos” (do inglês *break-bone fever*) para descrever a epidemia de 1780 na Filadélfia (Rush 1789 apud Vasilakis et al 2010). No mesmo período, em 1779, David Bylon descreveu uma epidemia em Jakarta (Indonésia), denominada “Knokkel-koorts” ou “febre das juntas” (do inglês *Knucklefever*). Há similaridade dos relatos em relação à intensidade das dores, presença de exantema e tendência a recidivas (Bylon1780 apud Vasilakis et al 2010).

Embora a doença tenha sido conhecida com diversos outros nomes refletindo etimologias geográficas e culturais, o termo "dengue" foi universalmente adotado (Vasilakis & Weaver 2008). O nome pode ter surgido

no arquipélago africano de Zanzibar, durante uma epidemia que ocorreu em 1870, e estaria relacionada à frase nativa *Ki-denga Pepo*, que significa pancada ou golpe dado por um mau espírito, provocando ataque doloroso semelhante à cãimbra (Halstead 1971, Figueiredo & Fonseca 1996, Gubler & Kuno 1997).

O cientista cubano Carlos J. Finlay atribuiu ao *Ae. aegypti* o papel de transmissor da febre amarela em 1881. A descoberta abriu caminho para o estudo de outras doenças transmitidas por vetores (revisão em Tan & Sung, 2008). A constatação da transmissão do DENV pelo *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762) foi demonstrada em 1906 por Bancroft, após uma epidemia de dengue em Brisbane (Austrália) em 1905, e confirmada por estudos subsequentes (Siler et al 1926, Rosen et al 1954). Ashburn e Craig encontraram um agente filtrável no sangue humano em 1906, e Simmons e colaboradores transmitiram o vírus para voluntários humanos e, com isso, definiram o período de incubação em mosquitos, em 1926 e 1931, respectivamente (Simmons 1931 e Halstead 1974). Estudos realizados em Taiwan, Filipinas e no Pacífico demonstraram que *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes scutellaris*, poderiam ser eficientes vetores dos DENV (Gubler 1997).

Devido ao constante transporte de escravos oriundos da África, a partir do século XVII, o *Ae. aegypti* foi levado para os demais continentes e as epidemias de dengue tornaram-se mais frequentes e disseminadas (Holmes et al 1998).

Segundo os registros históricos, uma segunda série de pandemias de dengue, com duração de 3 a 7 anos, percorreu o mundo no período entre 1823 e 1916, da África para a Índia e da Oceania para as Américas, provavelmente causada pelo mesmo sorotipo do DENV e transportadas, através do tráfico de escravos e da atividade mercantil, entre as regiões geográficas (Gubler 1997, Weaver & Vasilakis 2009).

Em 1944, ocorreram os isolamentos das primeiras amostras dos DENV, durante a II Guerra Mundial, a partir de soros de soldados que contraíram a infecção em Calcutá (Índia), Nova Guiné e Havaí (Sabin 1952). Os vírus

provenientes da Índia, do Havai e de uma das cepas de Nova Guiné foram antigenicamente semelhantes e denominados vírus dengue 1 (DENV-1). Atualmente, a cepa Havai é considerada amostra protótipo. Outras cepas de Nova Guiné apresentaram características antigênicas diferentes, permitindo a identificação de outro sorotipo, que foi classificado como vírus dengue 2 (DENV-2), hoje considerado protótipo. Posteriormente, dois novos vírus foram isolados durante uma epidemia ocorrida em Manila (1953). Estes vírus foram designados como dengue 3 (DENV-3) e dengue 4 (DENV-4) (Hammon et al 1960) e as cepas H87 e H241, respectivamente, consideradas protótipos.

A Segunda Guerra Mundial foi um marco histórico para a dispersão do DENV e do seu vetor. Antes, as epidemias aconteciam em intervalos de 10 a 40 anos, sendo considerada uma doença benigna, de curso não fatal, proveniente dos visitantes dos trópicos. Após a Segunda Guerra Mundial, ficou evidente a mudança no comportamento da doença, ocorrendo à dispersão dos sorotipos virais. Isto ocorreu principalmente devido ao transporte dos mosquitos para áreas nas quais estes não eram encontrados, agravado pelo crescimento descontrolado da população urbana e a falta de programas eficientes de controle do vetor. Desde então, a pandemia que começou no sudeste da Ásia se espalhou pelo mundo (Halstead 1992, Gubler 1998, CDC 2008).

Atualmente, a dengue é considerada a mais importante das doenças virais transmitidas por artrópodes que acomete o homem, sendo também a mais comum e distribuída arbovirose no mundo. Ao longo das últimas décadas tornou-se um grave problema à saúde pública (Guzman et al 2010). Nas últimas décadas, a incidência da dengue no mundo tem apresentado uma tendência ascendente. As áreas geográficas em que ocorre a transmissão dos vírus se expandiram consideravelmente. Entre os anos de 1970 e 2004, ficou evidente a mudança na distribuição dos sorotipos de DENV no mundo (Figura 1; Guzman et al 2010).

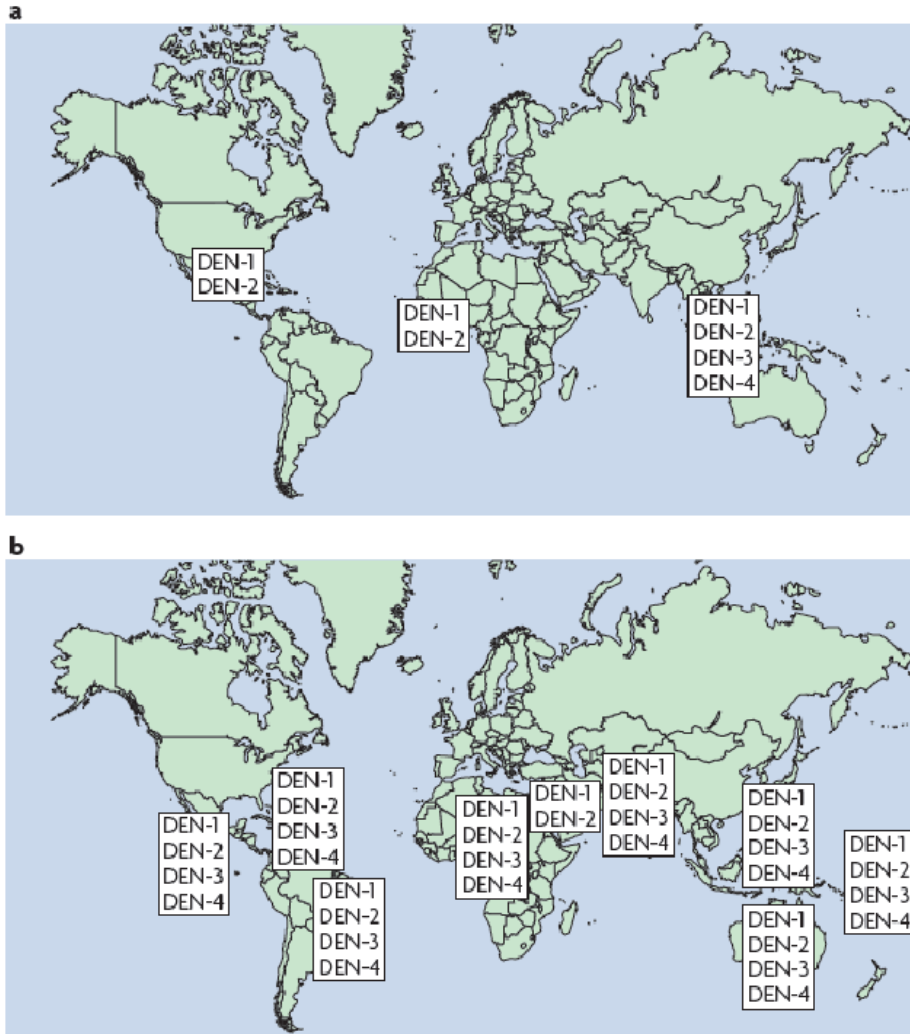


Figura 1 - Mudança na distribuição dos sorotipos de dengue no mundo em 1970 (a) e 2004 (b) (Guzman et al 2010).

Atualmente, todos os sorotipos do vírus (DENV 1-4) estão circulando na África, Sul e Sudeste da Ásia, Regiões do Pacífico Ocidental, Caribe, e Américas Central e do Sul e introduções frequentes no sudeste da América do Norte são regularmente reportadas (Rodriguez-Roche & Gould 2013).

Em todo o mundo estima-se que haja 390 milhões de infecções por dengue a cada ano, dos quais 96 milhões de casos com manifestações aparentes, ou seja, três vezes a estimativa feita pela Organização Mundial da Saúde (Bhatt 2013).

1.2 A Dengue no Brasil

Há relatos históricos de epidemias de dengue no Brasil desde 1846, entretanto, as primeiras citações na literatura científica datam de 1916 (Meira), na cidade de São Paulo, e em Niterói no ano de 1923 (Pedro, 1923). Um inquérito sorológico datado de 1953/1954 e realizado em indivíduos residentes na Amazônia brasileira encontrou soros positivos para anticorpos contra o DENV, remetendo à hipótese de que o vírus circulou nessa região (Causey & Theiler 1962).

O Brasil passou, no início do século XX, por campanhas de combate à espécie *Ae. aegypti*, vetor da febre amarela urbana e do dengue. Esta ação brasileira, que começou com Emilio Ribas, em 1903, e Oswaldo Cruz, em 1904, teve grande êxito mais tarde com apoio e coordenação da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da Fundação Rockefeller (Benchimol 2001). Assim, esta espécie de mosquito foi considerada erradicada no Brasil em 1955. No entanto, no final dos anos 1960, o *Ae. aegypti* passou a ser encontrado em alguns estados do Norte e Nordeste do Brasil (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

A primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu no início da década de 1980 na cidade de Boa Vista, Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4 (DENV-1 e DENV-4), com sete mil incidências notificadas, porém a transmissão permaneceu restrita à cidade (Osanaï et al 1983). O controle da epidemia foi realizado de forma eficaz, e os DENV não se expandiram para outras áreas e, o fato do *Ae. aegypti* ainda não estar disperso no território brasileiro, contribuiu para este controle. O combate ao vetor em poucos meses praticamente o erradicou da cidade de Boa Vista (Donalísio 1995).

No entanto, em 1986, o DENV-1 foi isolado em Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro (Schatzmayr et al 1986). O intenso fluxo de pessoas e a proximidade aos grandes centros urbanos facilitaram a rápida dispersão do vírus, causando uma epidemia explosiva com 92 mil casos reportados (Nogueira et al 1999). Estima-se que, durante o ano seguinte aos primeiros

isolamentos do DENV-1, ocorreram mais de dois milhões de casos (Nogueira et al 1988).

Em 1990, um novo surto ocorreu na Região Metropolitana do estado do Rio de Janeiro, na cidade de Niterói, onde o DENV-2 foi isolado pela primeira vez no Brasil e quando foram notificados os primeiros casos de FHD/SCD (Nogueira et al 1990, 1991, 1993).

A circulação do DENV-3 foi identificada em 2000, no município de Nova Iguaçu (Rio de Janeiro), sendo este sorotipo isolado de mosquitos *Ae. aegypti* e de humanos (Nogueira et al 2001, Lourenço-de-Oliveira et al 2002). Em 2002, esse sorotipo foi responsável pela maior e mais grave epidemia do país, que registrou 771.551 casos de dengue (Nogueira et al 2005), correspondendo a 80% dos casos ocorridos nas Américas (Wilson & Chen 2002).

Os anos de 2004 e 2005 foram considerados como interepidêmicos (Araújo et al 2006). No final de 2005, houve a prevalência do DENV-3, e no ano de 2006, observou-se uma maior atividade deste sorotipo comparada ao ano anterior (Nogueira et al 2007). No entanto, a partir de abril de 2007, observou-se a emergência do DENV-2, que causou uma grave epidemia no ano de 2008, com um total de 259.392 casos no estado do Rio de Janeiro, 35% dos 734.384 casos notificados no Brasil (SVS/MS 2009). O padrão inicial de casos de dengue clássica afetando adultos jovens apresentou marcadas alterações com o aumento das formas graves, em especial durante o período entre 2007 e 2009, quando foi observada uma migração dos casos graves para crianças (Brasil, 2009; Teixeira et al 2008, Cavalcanti et al 2011). Na segunda metade do ano de 2009, o DENV-1 substituiu o DENV-2 como sorotipo predominante no país, ocasionando uma grande epidemia, com mais de 1 milhão de casos no ano de 2010 (Brasil 2009; SVS/MS 2010).

O risco da introdução do DENV-4 no país era iminente, uma vez que este sorotipo circulava em países vizinhos, como a Venezuela e a Colômbia (Guzman & Kouri 2002). Em julho de 2010, no estado de Roraima, o DENV-4 reemergiu cerca de 30 anos após a sua primeira detecção no país. Foram confirmados, neste estado, ao longo do segundo semestre de 2010, menos de 20 casos de DENV-4, e os primeiros registros da dispersão do vírus foram

detectados em janeiro de 2011 no Amazonas e Pará. Posteriormente, em março, o vírus foi detectado nos estados nordestinos do Piauí, Pernambuco, Bahia e Ceará, e na região sudeste nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Os primeiros casos de DENV-4 detectados no Rio de Janeiro ocorreram no município de Niterói, localizado na região metropolitana, apenas 15 km distante da capital (Nogueira & Eppinghaus 2011).

Em 2013, até a 42ª semana epidemiológica, foram registrados 1.476.917 casos notificados de dengue no Brasil, com predominância do DENV-4, que corresponde a 60% dos casos. Neste período, foram confirmados 6.566 casos graves e 573 óbitos. A região Sudeste, responsável por 63,4% dos casos com 936.500 registros, tem o maior número de casos (Rede Dengue, FIOCRUZ).

Nos últimos 27 anos, extensas epidemias de dengue resultantes da introdução e emergência dos diferentes sorotipos em humanos susceptíveis vêm ocorrendo no Brasil, onde mais de oito milhões de casos já foram notificados (Figura 2, SVS/MS 2013, Silva Jr 2013).

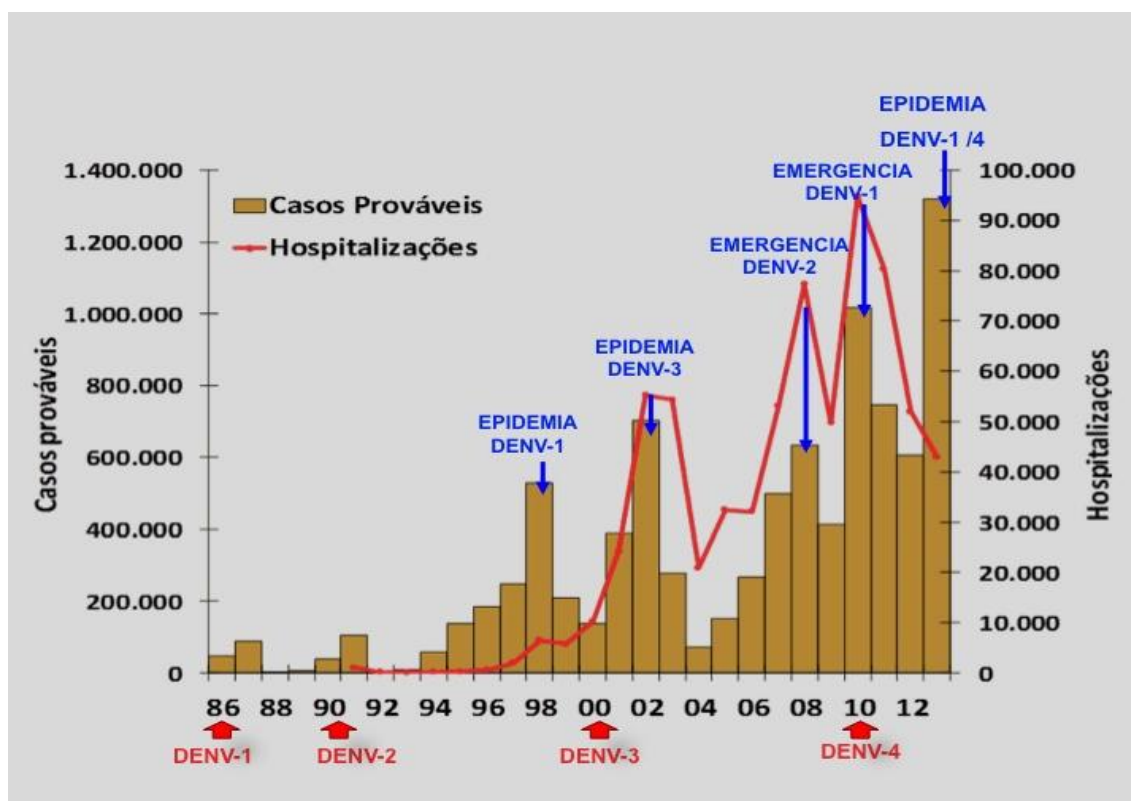


Figura 2 - Casos notificados e atividade dos vírus dengue de 1986 à 2013*
 Fonte: SVS/MS, *até Julho de 2013.

1.3 O vírus e sua organização genômica

Os DENV estão taxonomicamente classificados na família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que compreende mais de 70 vírus distintos. Além do DENV, diversos membros do gênero *Flavivirus* são de importância médica, tais como o vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite transmitido por Carrapato (TBEV) (Calisher et al 1989). Contudo, os DENV são os responsáveis pelas maiores taxas de doença e mortalidade dentre todos os membros desse gênero (Burke et al 2001).

Devido as suas propriedades antigênicas distintas, através de reações de soroneutralização, os DENV foram classificados em quatro sorotipos designados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Sabin 1952, Hammon et al 1960, Westaway et al 1985). Estudos recentes indicam o isolamento e a caracterização de um novo sorotipo de dengue de transmissão silvestre em Sarawak, Malásia, detectado em humanos e associado inclusive a casos graves da doença (Vasilakis et al 2013). A infecção com um sorotipo confere imunidade permanente apenas contra este sorotipo, não conferindo imunidade cruzada para os outros. Desse modo, indivíduos que vivem em áreas endêmicas de dengue podem se infectar com mais de um sorotipo ao longo da vida (Gubler 1998).

O vírus apresenta morfologia esférica com 40 a 60 nm de diâmetro, contendo um core de simetria icosaédrica elétron denso envolto por envelope lipídico (Figura 3). O genoma viral é constituído por RNA de fita simples com aproximadamente 11.000 pares de base, polaridade positiva e uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês “open reading frame”), que irá codificar uma poliproteína única, que será clivada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína pré-M/M associada à membrana e proteína E do envelope e, sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 4 A). As proteínas estruturais são componentes da partícula viral madura e as proteínas NS são expressas somente na célula hospedeira infectada e não são empacotadas em níveis detectáveis nas partículas maduras (Miller et al 2010).

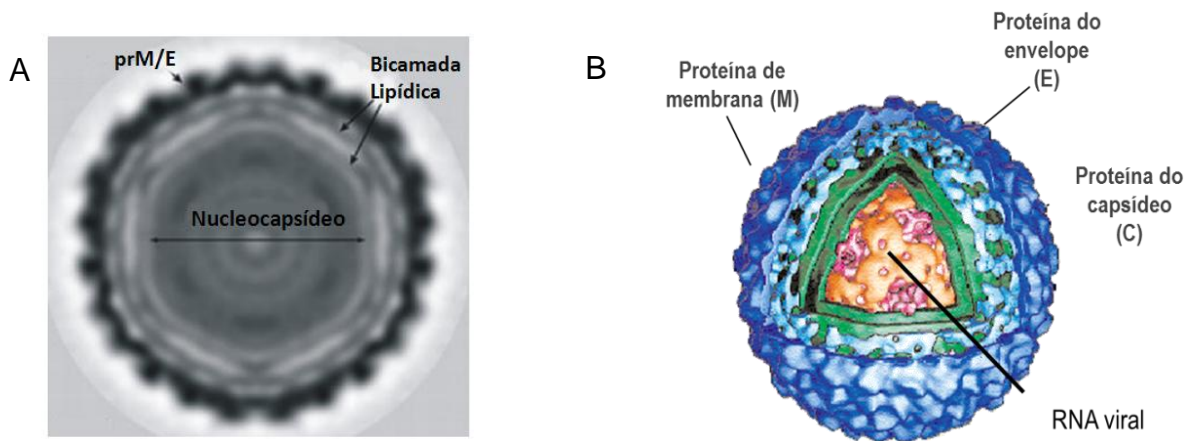


Figura 3 – (A) Micrografia eletrônica e (B) esquema representativo da partícula do vírus dengue (Adaptado de Yu et al 2009 e Perera & Kuhn 2008).

A região codificante é flanqueada por regiões não codificadoras (5' e 3'NC) com aproximadamente 100 e 450 nucleotídeos, respectivamente, importantes para a replicação e viabilidade viral (Cahour et al 1995, You & Padmanabhan 1999, Yu & Markoff 2005) (Figura 4 A). Essas regiões são responsáveis pela ciclização do RNA viral, requerida para a atividade da RNA polimerase viral dependente de RNA (RpRd). Elas formam estruturas secundárias em forma de “stem-loop” (SL), que interagem com outras proteínas virais e fatores específicos de tradução e replicação da célula hospedeira. Estudos demonstraram que as sequências de ciclização (CS) das regiões 5' e 3' UTR, presente em todos os flavivírus transmitidos por mosquitos, bem como as seqüências 5' e 3' UAR (anterior ao códon AUG de iniciação de tradução), são essenciais para a formação do complexo RNA-RNA (Alvarez et al 2005).

A região 5'NC é relativamente curta (95-132 nucleotídeos [nts]), enquanto a região 3'NC é geralmente mais longa (aproximadamente 450 nts) e demonstra extensiva heterogeneidade no tamanho e na seqüência entre espécies virais diferentes e mesmo entre cepas diferentes da mesma espécie (Mandl et al 1993, Wallner et al 1995). De acordo com as estruturas secundárias previstas, a região 3'NC dos DENV pode ser dividida em três domínios (Figura 4B). O domínio I, que está localizado imediatamente após o códon de terminação do gene NS5, é considerado a região mais variável (VR). Sua heterogeneidade é devida a mutações em sua seqüência nucleotídica, tornando esta região um bom marcador para estudos evolutivos dos DENV (Shurtleff et al 2001, Klungthong et al 2008, Pankhong et al 2009). Mutações e

deleções dentro desta região podem alterar a infectividade, reduzir a eficiência na replicação viral (Men et al 1996, Mandl et al 1998, Shi et al 2002) e influenciar na virulência e patogenicidade dos DENV (Leitmeyer et al 1999, Cologna e Rico-Hesse 2003, Clyde et al 2006, Silva et al 2008).

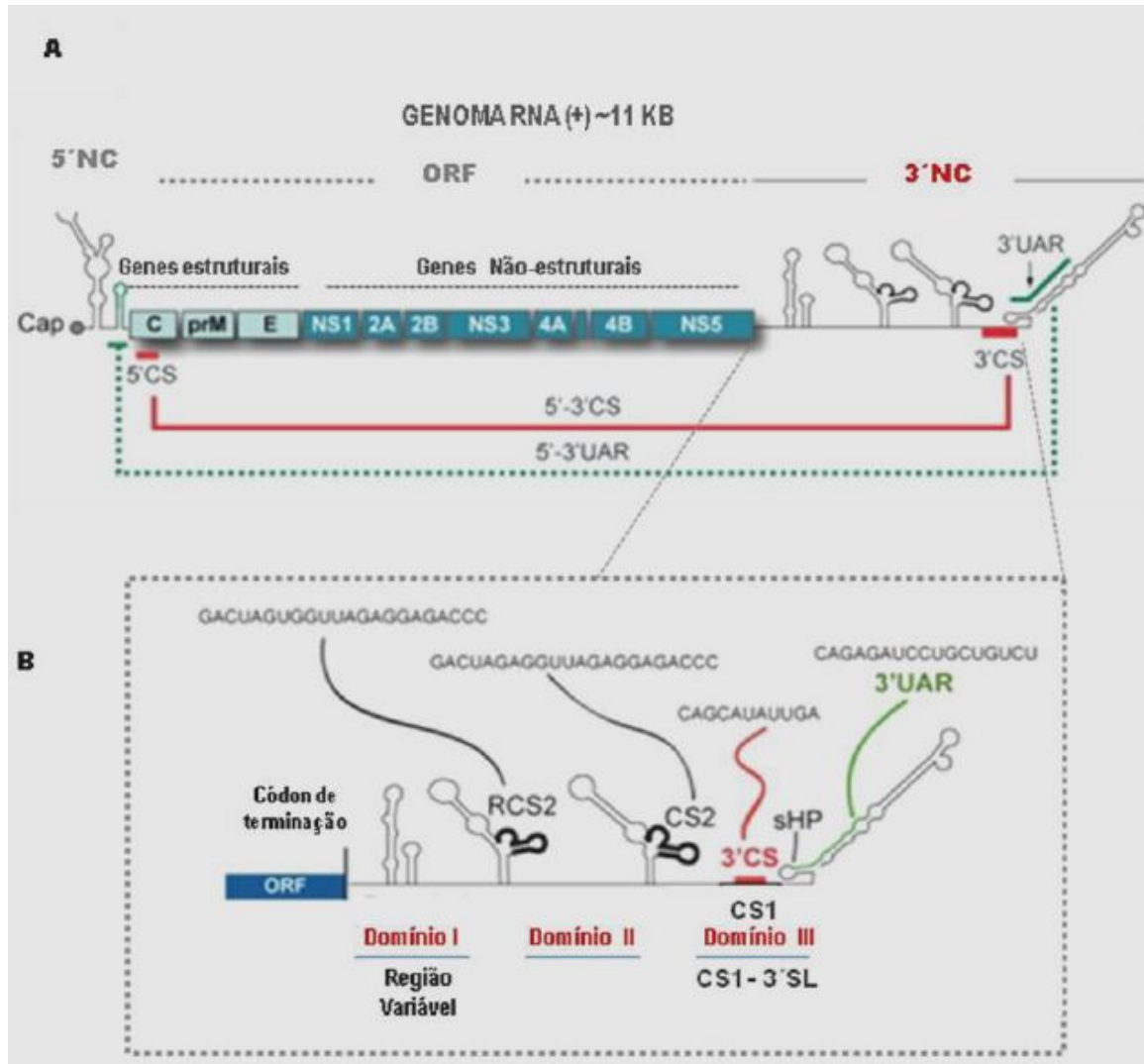


Figura 4 - Organização do genoma do vírus dengue. (A) Regiões 5' e 3' não codificantes (NC) e a fase aberta de leitura (ORF) indicando os genes estruturais (C, prM, E) e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (B) Esquema representativo dos elementos constituintes da região 3'NC dos DENV. As estruturas previstas para os três domínios estão indicados: domínio I (região variável [VR]), domínio II e domínio III (sequência conservada CS1 e 3' stem-loop [3'SL]). Adaptado de Gebhard et al 2011.

Estudos prévios já demonstraram deleções e variações nucleotídicas dentro da VR de cepas de um mesmo sorotipo (Aquino et al 2006, Vasilakis et al 2008). O domínio II é moderadamente conservado, contendo vários hairpins ou grampos onde estão localizadas as sequências altamente conservadas (CS1 e CS2) e a sequência repetida conservada (RCS2). O domínio III é a região mais conservada da região 3'NC, compreendendo uma CS1 seguido de um stem-loop (3'SL) terminal (Hahn et al 1987, Proutski et al 1997, Shurtleff et al 2001, Zhou et al 2006, Silva et al 2008, Gamarnik 2010, Iglesias & Gamarnik 2011, Gebhard et al 2011) (Figura 4 B). Uma sequência específica no domínio III da região 3'NC no genoma do DENV-2, essencial para a replicação viral em células de mosquitos mas não em células de mamíferos, foi descrita (Villordo e Gamarnik 2013).

O sequenciamento completo de DENV-3 circulantes no Brasil isolados de mosquitos e humanos identificou uma mutação na região 3'NC, localizado no Domínio I, sugerindo uma deleção de 8 nucleotídeos na inserção de 11 nucleotídeos, previamente descrita e característica de DENV-3 isolados em humanos (Figura 5; Castro et al 2013).

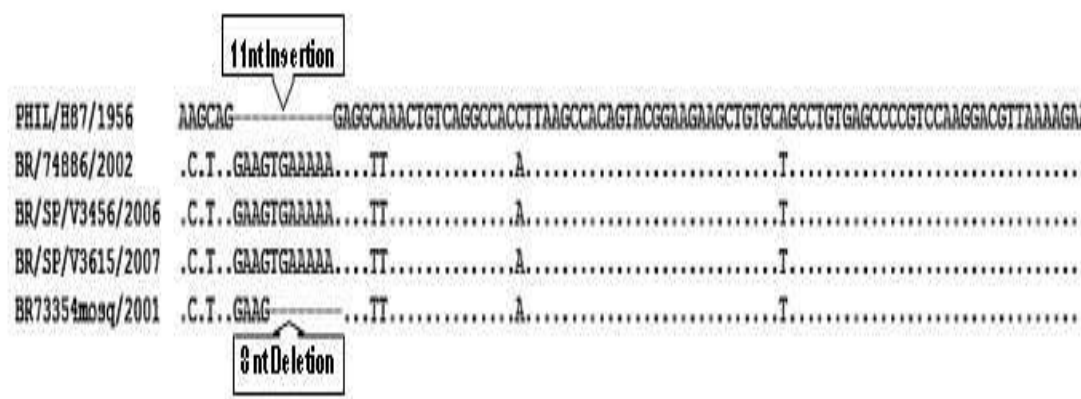


Figura 5: Alinhamento das sequências nucleotídicas da região 3'NC de DENV-3 dos isolados de mosquitos naturalmente infectados, comparado as cepas brasileiras isoladas de casos humanos e ao protótipo H87(GenBank accession number M93130). A inserção de 11 nucleotídeos comum às cepas brasileiras de DENV-3 Genótipo III e a deleção de 8 nucleotídeos característica dos isolados de mosquitos são demonstrados (Adaptado de Castro et al 2013).

1.4 Variabilidade genética dos vírus dengue

Os DENV apresentam alta variabilidade genética devido à falta do mecanismo de correção da RNA polimerase viral durante a replicação, às rápidas taxas de replicação, ao grande tamanho populacional e pressão frente à reposta imunológica do hospedeiro (Homes & Twiddy 2003).

Na década de 80, baseado na técnica de “fingerprinting” do RNA, o termo “topotipo” foi utilizado para definir cinco variantes genéticas dentro do DENV-2 (Repik et al 1983, Trent et al 1990).

Nos anos 90, a utilização de métodos de sequenciamento do genoma viral e análise filogenética permitiram a classificação dos DENV em grupos geneticamente distintos de cada sorotipo e o termo “genótipo” foi determinado para grupos de vírus que apresentam uma divergência em sua sequência nucleotídica menor que 6% dentro de uma determinada região do genoma viral (Rico-Hesse 1990, Lewis et al 1993, Lanciotti et al 1994).

Em uma revisão sobre a evolução dos DENV, analisando seqüências parciais do gene E, Rico-Hesse (2003) descreveu cinco genótipos para DENV-1, quatro para DENV-2 e DENV-3 e três genótipos para DENV-4.

Análises filogenéticas mais recentes baseadas no sequenciamento completo do gene E determinaram cinco genótipos para os DENV-1 e DENV-3, seis genótipos para os DENV-2 e quatro genótipos para os DENV-4 (Weaver & Vasilakis 2009, Chen & Vasilakis 2011; Tabela 1). É importante ressaltar que a classificação dos DENV em genótipos dentro de cada sorotipo está sendo constantemente revisada, uma vez que o sequenciamento e análises evolutivas são aperfeiçoados e os bancos de dados de genomas expandem. Atualmente, não há um consenso na utilização das diferentes classificações descritas para os genótipos de DENV.

Métodos utilizados para inferir as taxas de evolução dos DENV determinaram que as estimativas de evolução para estes vírus foram de $6-8 \times 10^4$ substituições/sítio/ano (Zanotto et al 1996, Lanciotti et al 1997, Wang et al 2000). Taxas estimadas para os quatro sorotipos de DENV variam de $4,55 \times 10^4$ para DENV-1 a $11,58 \times 10^4$ para o DENV-3. Além disso, comparações

estatísticas sugerem que o DENV-3 está evoluindo mais rapidamente do que os DENV-1 e DENV-2 (Weaver & Vasilakis 2009).

Tabela 1 - Classificação genotípica dos vírus dengue (DENV) baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Chen & Vasilakis (2011).

Sorotipo	Genótipos	Distribuição geográfica
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Leste da África
	II	Tailândia (1950-1960)
	III	Malásia (cepas selvagens)
	IV	Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália
	V*	Américas, Oeste da África, Ásia
DENV-2	Asiático I	Malásia, Tailândia, Camboja, Myanmar, Vietnã e Austrália
	Asiático II	China, Taiwan, Sri Lanka, Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	Americano	América Latina, Caribe (1950-1960), Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico
	Sudeste Asiático/Americano*	Tailândia, Vietnã, Américas (últimos 20 anos)
	Selvagem	Oeste Africano e Sudeste Asiático (cepas isoladas em humanos, mosquitos silvestres ou macacos sentinelas)
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas, Cingapura, Taiwan e Sul da Ilhas do Pacífico, Brasil
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III*	Sri Lanka, Índia, África, Samoa, Tailândia (1962)
	IV	Porto Rico, Américas Latina e Central, Taiti (1965)
	V	Filipinas (1956), Japão (1973), China (1980), Brasil (2002-2004)
DENV-4	I*	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka, Japão e Brasil (provenientes do Sudeste Asiático)
	II*	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (cepas recentes)
	IV	Malásia (cepas selvagens)

* genótipos circulantes no Brasil

1.5 Replicação viral

Assim como em outras arboviroses, o DENV é mantido na natureza através de replicação cíclica em hospedeiros vertebrados e invertebrados. A partícula viral se liga às células hospedeiras por meio de receptores celulares específicos para a proteína do envelope viral, seguindo-se o processo de endocitose (Chambers 1990).

Nos hospedeiros vertebrados, os DENV podem ser encontrados em várias células do sistema imune, tais como células dendríticas (CDs), macrófagos e monócitos. Acredita-se que os macrófagos e as CDs sejam os sítios iniciais da replicação viral. Os vírus entram na célula hospedeira por ligação específica da proteína E com receptores celulares, como DC-SIGN (ICAM-3) (Lozach et al 2005) e receptores de manose (Miller et al 2008).

Logo após a partícula viral ser internalizada pela célula hospedeira, ocorre acidificação da vesícula endossomal, que promove a dissociação dos dímeros da proteína E, e a reassociação irreversível dos monômeros na forma de trímeros. Essa mudança conformacional na proteína expõe o peptídeo de fusão que promove a junção das membranas virais e do endossoma. Em seguida, o nucleocapsídeo é liberado e desmontado no citoplasma celular, onde ocorre a tradução e replicação simultânea do RNA viral (Modis et al 2004).

A replicação dos DENV ocorre no citoplasma das células infectadas, nas estruturas de membranas induzidas pelo vírus. Essas membranas rearranjadas, que contêm proteínas específicas do DENV, RNA viral, e alguns fatores da célula hospedeira envolvidos na produção do RNA progênico, são chamadas de complexo de replicação (CR). Aparentemente, após a infecção por DENV, o RNA genômico se associa com os ribossomos no retículo endoplasmático durante a tradução viral (Lindenbach et al 2007, Welsch et al 2009, Miller et al 2010). O RNA viral é replicado via uma molécula de RNA intermediário de polaridade negativa, o qual serve como molde para a síntese de várias cópias do RNA genômico de polaridade positiva (Miller 2010).

A montagem do vírion ocorre pela associação das fitas de RNA com proteínas C do nucleocapsídeo, localizadas na superfície das membranas do retículo endoplasmático (Rodenhuis-Zybert et al 2010). Após vários ciclos de tradução, proteínas estruturais são sintetizadas em níveis elevados. Estas proteínas são arranjadas juntamente com o RNA viral, dando origem à progênie de vírions, que são transportados pelo complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem dos peptídeos pr e M, a dissociação do heterotrímero e a conversão da partícula viral imatura em partícula viral infecciosa madura, e

então secretados posteriormente pelo processo de exocitose. A duração deste ciclo pode variar de quatro a sete dias, período que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas na infecção humana (Urcuqui-Inchima et al 2010).

1.6 Ciclos de transmissão do dengue

O homem, os primatas não-humanos e os mosquitos do gênero *Aedes* são os hospedeiros naturais do DENV, sendo o homem o único a desenvolver a forma clínica da doença (Gubler 1998).

Os quatro sorotipos do DENV são mantidos na natureza por dois ciclos distintos: silvestre e humano (Figura 6). O ciclo silvestre é ecologicamente e evolutivamente distinto do ciclo de transmissão entre humanos e *Aedes aegypti*. O ciclo silvestre, que ocorre em regiões da África ocidental e no sudeste Asiático é mantido por primatas não-humanos e mosquitos silvestres de três subgêneros do gênero *Aedes* (*Stegomyia*, *Finlanya* e *Diceromyia*) (Gubler & Kuno 1997; Wang et al 2000; Cardoso et al 2009; Hanley et al 2013).

O comportamento alimentar oportunista dos mosquitos vetores arbóreos poderia facilitar a transferência de DENV silvestre das florestas para ambientes peridomiciliares. Por certo, em áreas rurais da África e Ásia, onde os vetores atingem altas densidades, muitas vezes, o DENV é detectado entre primatas não-humanos e humanos. As savanas úmidas que circundam ambientes silvestres em áreas rurais da África e Ásia são definidas como "zona de emergência" (Chen & Vasilakis, 2011).

Embora se acredite que os ciclos silvestre enzoótico/epizoótico e urbano sejam independentes, em 2008, foi evidenciada a infecção de humanos com uma cepa de DENV silvestre na Malásia (Cardoso et al 2009, Hanley et al 2013) e em 2010, na África Ocidental (Franco et al 2011). Esses dados sugeriram que DENV de origem silvestre podem emergir num ciclo de transmissão urbana, suburbana ou rural, sem que haja pré-adaptação aos seres humanos (Hanley et al 2013).

No continente americano, a infecção é mantida através do contato entre homem infectado – mosquito *Ae. aegypti* - homem susceptível, em aglomerados urbanos e suburbanos (Halstead 2008, Hanley et al 2013). Até a presente data, não existem evidências do ciclo de transmissão de DENV silvestre nas Américas (Gubler & Kuno 1997, Hanley et al 2013). No entanto, anticorpos contra DENV já foram detectados em animais silvestres que frequentam o ambiente modificado pelo homem na Guiana Francesa e RNA compatível com o de DENV-1 foi encontrado em mosquito silvestre no Brasil (Thoisy et al 2004, Thoisy et al 2008, Lavergne et al 2009).

No ciclo humano, o mosquito *Ae. aegypti* é o principal vetor do DENV, enquanto outras espécies, como *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis* servem como vetores secundários ou locais. Embora o *Ae. albopictus* possa ter sido o vetor original para transmissão humana em parte do Velho Mundo, o DENV utiliza o elevado hábito antropofílico do *Ae. aegypti* para sustentar a transmissão em humanos (Figura 6; Chen & Vasilakis, 2011).

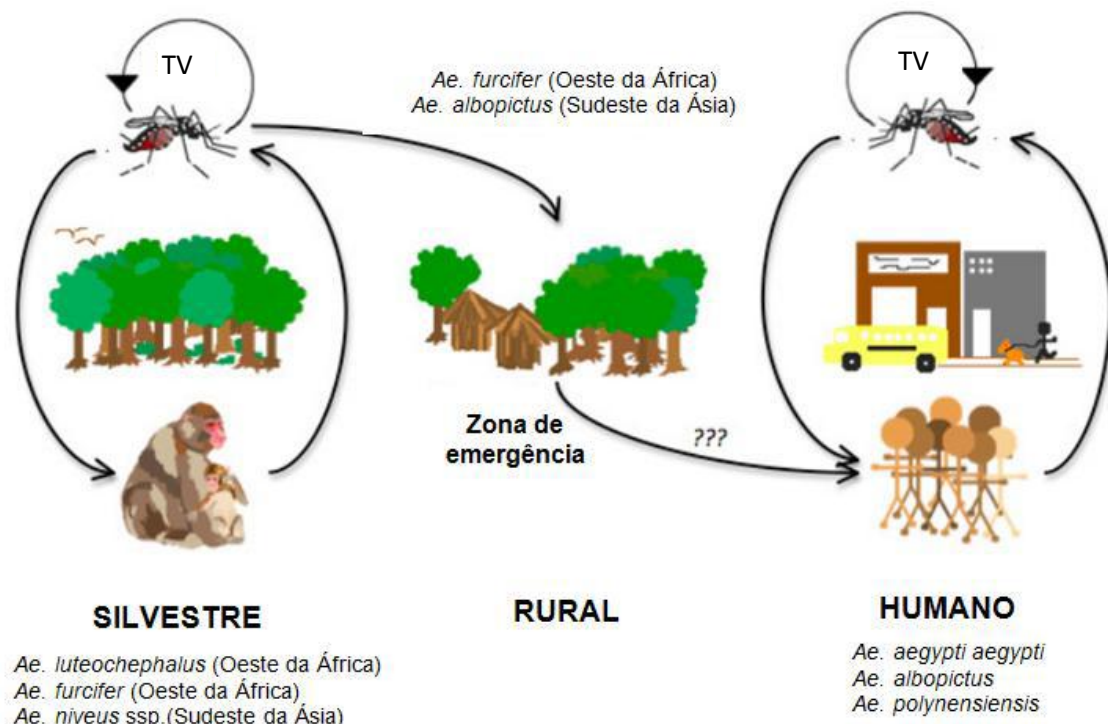
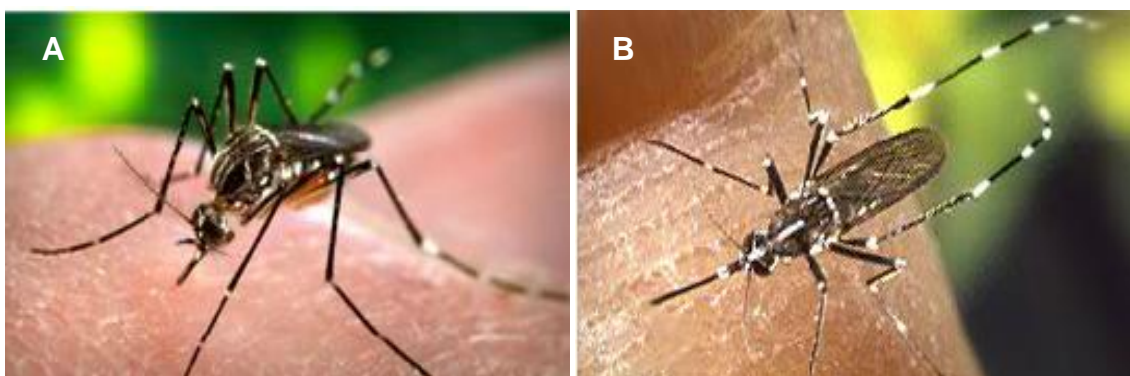


Figura 6 - Ciclo de transmissão do vírus da dengue (DENV). Adaptado de Chen & Vasilakis, 2011. TV: transmissão vertical

A transmissão vertical (TV) também tem sido sugerida como um mecanismo de manutenção dos DENV em ambos os ciclos de transmissão, especialmente durante períodos interepidêmicos ou períodos prolongados de seca (Chen & Vasilakis 2011). Evidências demonstram que o *Ae. albopictus* é mais eficiente na TV do que o *Ae. aegypti*, podendo ser um candidato para manutenção do DENV durante períodos interepidêmicos (Castro et al 2004). Dado o elevado número de casos assintomáticos de dengue, também é possível que a transmissão silenciosa em humanos por um número reduzido de vetores mantenha a transmissão do DENV entre epidemias (Kyle & Harris 2008).

1.7 Vetores transmissores dos vírus dengue

Os mosquitos - família *Culicidae* - representam um dos maiores grupos de artrópodes de importância médica e veterinária, e estão agrupados em três subfamílias: *Toxorhynchitinae*, *Culicinae* e *Anophelinae*. A subfamília *Culicinae* reúne cerca de 3.000 espécies distribuídas em 34 gêneros, sendo que 18 destes ocorrem no Brasil, dentre eles o gênero *Aedes* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Este possui aproximadamente 900 espécies distribuídas em 44 subgêneros, sendo um dos mais importantes o *Stegomyia*, do qual fazem parte o *Aedes (Stegomyia) aegypti* e o *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Santos 2008) (Figura 7).



**Figura 7 - (A) Fêmea de *Aedes aegypti* e (B) fêmea de *Aedes albopictus*.
Fonte: PHIL/CDC. Fonte: <http://phil.cdc.gov>**

No Brasil, as populações de *Ae. aegypti* são muito suscetíveis aos DENV e ao YFV (Lourenço-de-Oliveira et al 2004). A espécie *Ae. albopictus* ainda não foi incriminada como vetor natural do dengue no país (Degallier et al 2003), apesar de já ter sido comprovado que, em condições de laboratório, tais populações têm a capacidade de se infectar e transmitir verticalmente DENV e o YFV (Miller & Ballinger 1988, Lourenço-de-Oliveira et al 2003, Castro et al 2004). O *Ae. albopictus* é considerada a segunda espécie vetora de importância mundial na transmissão do DENV para humanos (Lounibos 2002), sendo a primeira o *Ae. aegypti* (Alto et al 2007).

O *Ae. aegypti* foi introduzido no Brasil provavelmente na época do tráfico de escravos, no período colonial, adaptando-se, portanto, com facilidade em áreas tropicais e subtropicais, principalmente, dentro de zonas isotermiais de 20 ° C (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). A sua distribuição está associada aos ambientes alterados pelo homem, sendo, essencialmente, um mosquito do peridomicílio e domicílio humano (Christophers 1960). É um mosquito essencialmente diurno, com picos de atividade hematofágica ao amanhecer e no crepúsculo. Nos ambientes urbanos, este culicídeo passou a ter preferência por se desenvolver em criadouros artificiais, que podem ser tanto aqueles abandonados pelo homem a céu aberto quanto os de uso doméstico, como pneus usados, garrafas, latas, potes, vasos de planta e reservatórios (caixas d'água, cisternas, tonéis), contendo água parada (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

O *Aedes albopictus*, um mosquito originário da Ásia, tem sido uma das espécies animais que mais se disseminaram mundialmente ao longo das últimas duas décadas (Benedict et al 2007). Também conhecido como "Tigre Asiático", o *Ae. albopictus* foi introduzido de maneira independente no Brasil e nos EUA em meado dos anos 1980 (Lounibos 2002). Sua distribuição também está associada à presença humana, contudo, é uma espécie que coloniza os ambientes urbano, suburbano e rural, demonstrando grande plasticidade ecológica e biológica (Braks et al 2003, Maciel-de-Freitas et al 2006). Esta característica potencializa a possibilidade de veiculação de arbovírus de origem silvestre em ambientes urbanos (Lourenço-de-Oliveira et al 2003, 2004b).

Assim como as demais espécies de mosquitos, o *Ae. aegypti* é holometabólico, ou seja, desenvolve-se através de metamorfose completa. O seu ciclo vital compreende 4 estágios: ovo, larva (4 estágios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Figura 8). O desenvolvimento do mosquito até a forma adulta pode levar um período de 10 dias, dependendo da temperatura, disponibilidade de alimentos e competição inter e intra-específica no ambiente larvar (Marquardt 2004).

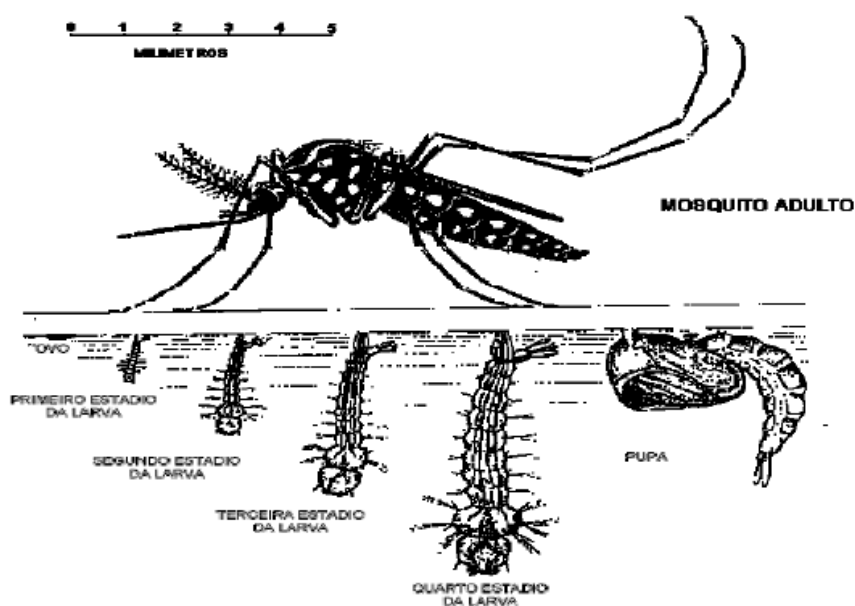


Figura 8 - Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento do mosquito vetor *Ae. aegypti*.

Fonte: (www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/CA/DENGUE/AEDES2.gif)

Os machos são exclusivamente fitófagos, enquanto as fêmeas, além de ingerirem seiva vegetal, são hematófagas, necessitando de nutrientes presentes no sangue de vertebrados para a maturação de seus ovos. Geralmente, cerca de 3- 4 dias após o repasto sanguíneo, as fêmeas iniciam a busca por um sítio de oviposição, possuindo preferência por locais com água parada ou pouco movimento, depositando seus ovos individualmente na parede úmida dos recipientes (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Estes ovos podem resistir à dessecação e eclodir até 450 dias após a postura, ao serem submersos na água (Rezende et al 2008). Esta peculiaridade permite

que os ovos sejam transportados por grandes distâncias em recipientes secos, tornando-se assim a principal via de dispersão do vetor (FNS 2001). Quando colocados em contato com a água, desencadeiam o processo de eclosão das larvas dando início ao ciclo de desenvolvimento larval (Forattini 2002).

A fase larvária é o período de alimentação e crescimento na etapa imatura. As larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se de matéria orgânica depositada ou em suspensão na água do criadouro (FNS 2001). Em condições ótimas, o período entre a eclosão do ovo e a formação da pupa pode não exceder cinco dias, ou, em condições mais adversas, com baixas temperaturas ou alimentação insuficiente, pode se estender por várias semanas (Silva Junior & Pimenta Junior 2008).

A pupa é o último estágio da fase imatura, no qual não se alimenta, correspondendo à fase em que ocorre a metamorfose para a fase alada. Este estágio dura de dois a três dias (FNS 2001).

A fase alada tem como função precípua a reprodução e dispersão (Forattini 2002). Em média, 24 horas após emergirem, machos e fêmeas estão aptos para o acasalamento (FNS 2001). Após a cópula, os espermatozoides são armazenados nas espermatecas e serão utilizados pouco a pouco para fecundar os ovos durante o processo de postura (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Normalmente, as fêmeas do *Ae. aegypti* encontram-se aptas para a postura de ovos três dias após o repasto sanguíneo, quando há digestão do sangue com consequente maturação dos ovários e ovogênese (Christophers 1960). Contudo, *Ae. aegypti* apresenta frequentemente discordância gonotrófica, quando mais de um repasto sanguíneo é necessário para que a fêmea se torne grávida, aumentando, assim, as suas chances de contrair e veicular o DENV (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

1.8 Interação vírus-vetor

Uma grande variedade de patógenos é mantida na natureza por ciclos de transmissão que envolve o hospedeiro humano e um inseto hematófago. Dentre os patógenos que são mantidos neste ciclo hospedeiro-vetor, podem-se destacar os arbovírus, como os DENV, YFV, vírus Chikungunya, Encefalites equinas, dentre outros (Higgs & Beaty 2005).

No ciclo de transmissão dos DENV, o mosquito se infecta ao ingerir sangue de um indivíduo em fase virêmica da infecção. O período de incubação extrínseco (PIE), que possui duração de 8 -12 dias, compreende o período decorrido entre a ingestão do sangue infectado pelo mosquito e o aparecimento das partículas virais infectantes na saliva. Após, o inseto torna-se apto a transmitir o vírus para um novo hospedeiro vertebrado (Hardy et al 1983, Beerntsen et al 2000, Tabachnick 2013). Este período no vetor é requerido para que ocorra a replicação e disseminação viral (Figura 9).

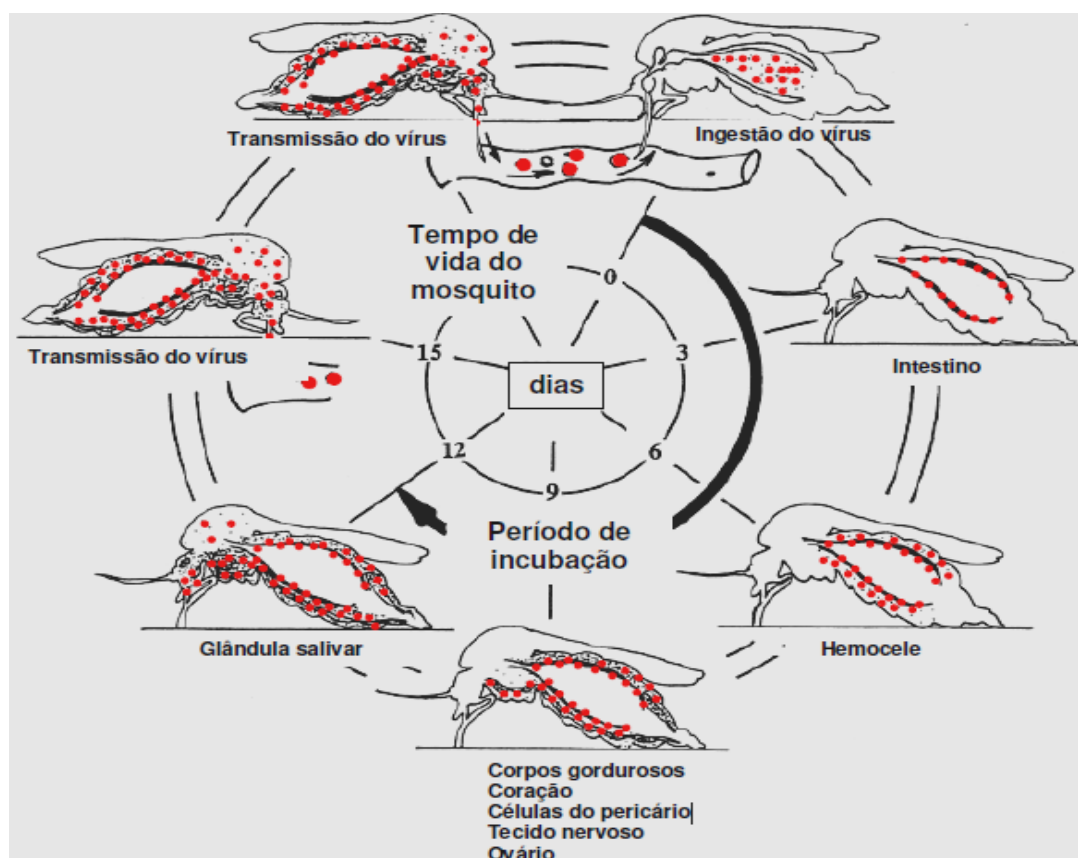


Figura 9 - Ciclo de infecção do vírus dengue no hospedeiro invertebrado. Adaptado de Gubler (1998).

O DENV se liga a receptores celulares em células-alvo no epitélio do intestino médio do inseto para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, replicar-se nas células epiteliais intestinais. A matriz peritrófica não parece constituir uma barreira física para a adesão do vírus dengue, uma vez que esta estrutura só estará completamente formada mais de um dia após a ingestão do sangue, quando a maioria dos vírus já aderiu às células epiteliais (Yazi-Mendoza et al 2002, Lourenço-de-Oliveira 2005).

Em um mosquito susceptível, após a replicação, o vírus atravessa a lâmina basal do epitélio e escapa através da hemocele e se espalha através da hemolinfa. O vírus irá replicar em vários tecidos e órgãos do mosquito, como os tecidos nervosos, os ovários e o corpo gorduroso, ocorrendo sua disseminação no organismo do inseto. Por fim, é necessário estabelecer a infecção nas glândulas salivares para que assim seja capaz de transmitir partículas virais infectantes, as quais serão inoculadas juntamente com a saliva durante um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (Woodring et al 1996, Black IV et al 2002, Gubler et al 2007). Uma vez possuindo partículas virais nas glândulas salivares, o mosquito transmite o vírus durante toda a sua vida (Halstead 2008).

O PIE é dependente da amostra viral, do título viral e da quantidade de sangue que o inseto se alimenta (Halstead 2008). Além disso, os fatores ambientais, principalmente a temperatura, e fatores intrínsecos do vetor como a competência vetorial e o genótipo viral envolvido podem influenciar na disseminação do vírus para as glândulas salivares do mosquito (Black IV et al 2002).

1.9 Competência vetorial

A competência vetorial é a habilidade intrínseca do vetor de transmitir o agente infeccioso. No caso do DENV, inclui a suscetibilidade à infecção, a duração do PIE e a eficiência na transmissão (Bosio et al 1998, Bosio et al 2000). Fatores específicos, especialmente aspectos genéticos dos vírus, a genética de populações de mosquitos e o meio ambiente, interferem na competência vetorial e, consecutivamente, na capacidade na transmissão do DENV (Hardy et al 1983, Kramer et al 1983, Failloux et al 2002).

Barreiras próprias do inseto, capazes de impedir que o vírus se replique e dissemine para as glândulas salivares, podem afetar consideravelmente a competência vetorial. Dentre essas barreiras se destacam a barreira de infecção do intestino (“midgut infection barrier”- MIB), barreira de escape do intestino (“midgut escape barrier” - MEB) e a barreira de transmissão ou barreira de infecção das glândulas salivares (Black IV et al 2002) (Figura 10).

A susceptibilidade à infecção, ou seja, a permissividade do que se acredita ser a principal barreira, a MIB, seguida da disseminação do vírus para o restante do organismo do hospedeiro invertebrado, é determinada geneticamente (Bennett et al 2002, Black et al 2002).

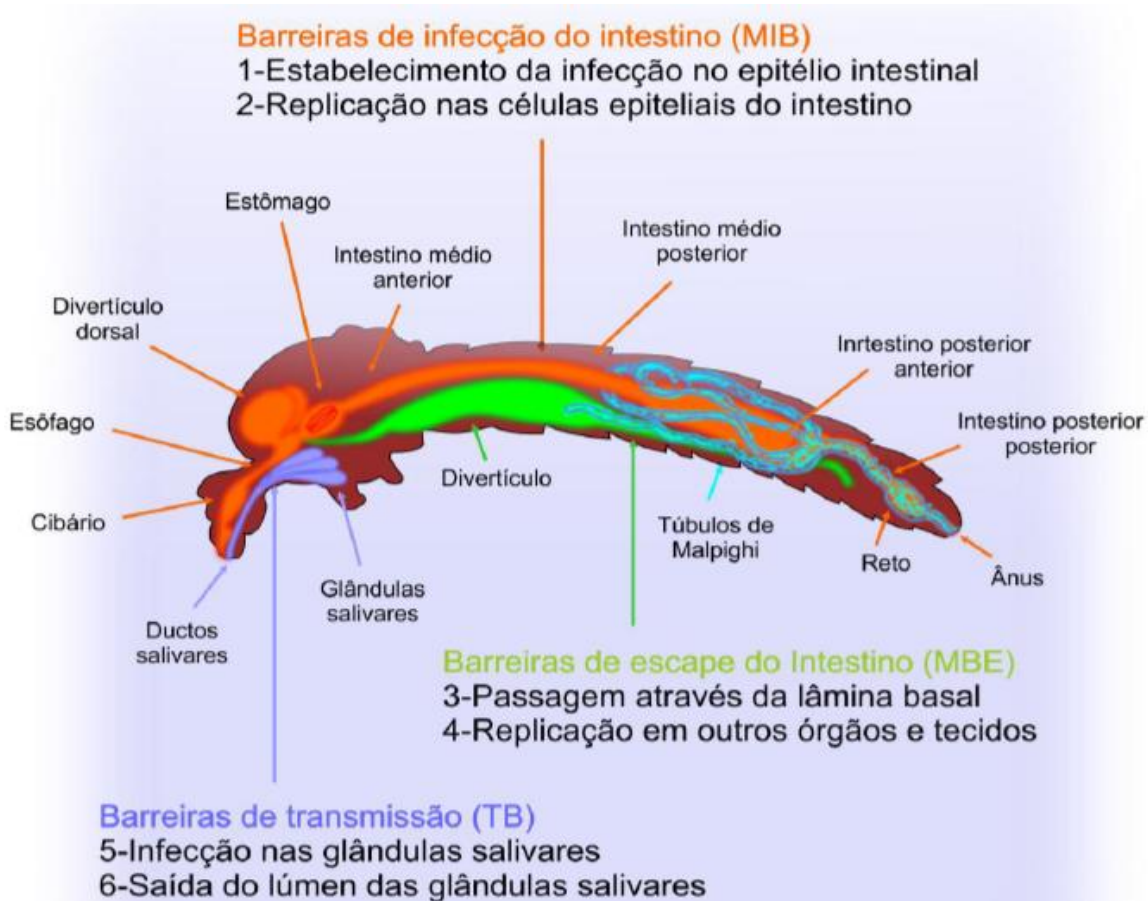


Figura 10 - Barreiras que um arbovírus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo. MIB= barreira de infecção no intestino, MEB = Barreira de escape do intestino, TB = barreira de transmissão. Adaptado de Black et al (2002).

Sabe-se que uma estreita combinação entre genótipos dos mosquitos e genótipos virais é decisiva na determinação desse fenótipo (Bosio et al 2000, Lambrechts et al 2012). Variações genéticas intraespecíficas em populações do mosquito vetor influenciam os vários sistemas de barreiras supracitados, impedindo ou permitindo a infecção de diversas células e tecidos e a disseminação do vírus. Essas barreiras são controladas geneticamente e podem ser expressas em várias proporções em uma população de mosquitos, afetando a epidemiologia da dengue (Hardy et al 1983).

2 JUSTIFICATIVA

A evolução da infecção dos DENV é determinada por complexas interações que vão do nível molecular e celular ao populacional do mosquito. Sabe-se que o mosquito *Ae. aegypti* tem resposta imune inata contra a infecção pelos arbovírus, inclusive aos DENV, e que este mecanismo de defesa, por sua vez, modula a infecção, inibindo a replicação e a intensidade da infecção de alguns tecidos ao longo do período de incubação extrínseco (Sánchez-Vargas et al 2009). O vírus é transmitido ciclicamente através de passagens em tecidos de vertebrados susceptíveis (humanos) e artrópodes (*Aedes aegypti*), podendo mudar geneticamente como resultado da pressão seletiva durante esta transmissão.

As mutações que ocorrem ao longo do genoma durante o processo replicativo, assim como mutações nas proteínas virais estruturais e não estruturais e 3'NC, já foram implicadas como marcadores moleculares de virulência (Hurrelbrink et al 2003). As variações em sequências nucleotídicas em um genótipo de DENV podem ser responsáveis pelo aparecimento de cepas que se replicam com mais eficiência em humanos e/ou em mosquitos, e produzem altas viremias. Tal fato tende a facilitar a transmissão viral pelos vetores, ou ainda, produzir elevada taxa de replicação viral no mosquito alcançando com rapidez as glândulas salivares, aumentando a competência vetorial dos mosquitos. No entanto, a extensão da variação genética nos DENV quando estes se replicam em mosquitos, e como essas variações atuam durante a transmissão entre humanos e mosquitos ainda são pouco conhecidos.

A substituição de uma alanina (Ala) por uma valina (Val), no gene do envelope (E1) do vírus Chikungunya aumentou a sua infectividade para o *Ae. albopictus* (Vazeille et al 2007, Tsetsarkin et al 2007). Evidências de especificidades genéticas nas interações entre genótipo do vetor e genótipo dos DENV e de que esta interação rege a competência vetorial em população de *Ae. aegypti* já foram demonstradas (Lambrechts et al 2009).

O seqüenciamento completo de DENV-3 isolado de *Ae. aegypti* naturalmente infectado proveniente do Rio de Janeiro, em 2001, após a introdução deste sorotipo no país, demonstrou uma similaridade de 99% ao nível de nucleotídeos com DENV-3 isolado de um caso fatal humano ocorrido no mesmo período, confirmando a circulação do Genótipo III (Subcontinente Indiano). Contudo, a análise da região 3'NC do genoma viral demonstrou uma mutação nesta região, sugerindo uma deleção de 8 nucleotídeos na inserção de 11 nucleotídeos, previamente descrita e característica de DENV-3 isolados em humanos (Castro et al 2013). Estudos prévios já demonstraram a importância da região 3'NC durante o processo replicativo do vírus no hospedeiro (Gamarnik 2010).

A infecção do mosquito por um sorotipo de DENV pode reduzir a replicação de outro sorotipo (Pepin et al 2008), e já foi demonstrado que, diferentes genótipos de um mesmo sorotipo de DENV podem replicar com intensidades diferentes e disseminar com distinta eficiência até a glândula salivar. Uma seleção de populações ou genótipos virais, com distintos sucessos na infecção do vetor é sugerida (Hanley et al 2008). Portanto, neste estudo visamos avaliar se as mutações observadas na região 3'NC de populações distintas de DENV-3 impactam a interação vírus-vetor.

3 OBJETIVOS

Investigar aspectos virológicos e entomológicos da interação mosquito vetor- DENV-3 pela infecção experimental de mosquitos *Ae. aegypti*.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar a competência vetorial do vetor *Ae. aegypti* para duas cepas de DENV-3 geneticamente distintas, isoladas de mosquitos e de caso humano naturalmente infectados, através da determinação das taxas de infecção, disseminação e transmissão viral;

Realizar a caracterização da região 3'NC das cepas de DENV-3 pós-infecção no mosquito para a avaliação de possíveis variações nucleotídicas ocorridas durante o processo de replicação *in-vivo* no vetor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas de DENV-3

Inicialmente, foram selecionadas nove cepas de DENV-3 isoladas de casos humanos recebidas no Laboratório de Flavivírus, IOC /FIOCRUZ (CEP 274/05) e de mosquitos *Ae. aegypti* coletados pela equipe do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, IOC/FIOCRUZ, previamente caracterizadas com a presença de 11nts ou deleção de 8 nts na região 3'NC (Tabela 2).

Tabela 2 - Cepas de DENV-3 isoladas de mosquitos *Ae. aegypti* naturalmente infectados e de casos humanos previamente caracterizadas e selecionadas para este estudo.

Cepa	Estado de origem	Ano de isolamento	Fonte	Número de acesso Genbank	Característica da região 3'NC	Referência
BR73354/01	RJ	2001	Mosquitos	FJ177308	Deleção de 8 nts	Castro et al., 2013
BR73356/01	RJ	2001	Mosquitos	JN383345	Deleção de 8 nts	
BR81200/06	RJ	2006	Mosquitos	JN383344	Inserção de 11nts	
BR74947/02	RJ	2002	Sorohumano	JN380904	Inserção de 11nts	
BR74916/02	RJ	2002	Sorohumano	JN380901	Inserção de 11nts	
BR77515/03	RJ	2003	Sorohumano	JN380900	Inserção de 11nts	
BR78969/04	RJ	2004	Sorohumano	JN380905	Inserção de 11nts	
BR80740/05	RJ	2005	Sorohumano	JN380906	Inserção de 11nts	
BR74886/02	RJ	2002	Fígado de caso fatal	AY679147	Inserção de 11nts	Miagostovich et al., 2006

Todos os estoques das amostras virais foram produzidos em cultura de células de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36 (Igarashi 1978) e tituladas após sucessivas passagens.

Para tal, as cepas originais foram inicialmente passadas em cultura de células de mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 para a recuperação dos vírus em tubos contendo 2 ml de cultura celular. Sucessivas passagens das amostras virais foram realizadas em garrafas de 75cm² (Costar, EUA) contendo uma monocamada de células C6/36 e 20 ml de meio L-15 Leibovitz (Sigma, EUA), e 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen, EUA), para a produção do estoque viral.

Resumidamente, após a formação da monocamada, o sobrenadante foi retirado e a suspensão viral inoculada nas respectivas garrafas. Durante 1 hora, a intervalos de 10 minutos, o meio contendo o DENV foi homogeneizado sobre a monocamada de células a partir de leves movimentos para adsorção do vírus. Para a manutenção da cultura inoculada, 30 ml de meio L-15 contendo 2% de SFB foram adicionados às garrafas. Estas foram incubadas em estufa a 28°C, sendo observadas diariamente em microscópio invertido (Zeiss - Deutschland, Alemanha), com aumento de até 400 vezes, por um período de 10 a 14 dias. Posteriormente, após vigorosa agitação, as células foram removidas da garrafa e o sobrenadante aliquoteado para a quantificação viral.

O título viral de cada passagem em cultura celular foi estabelecido por RT-PCR quantitativa (Johnson et al 2005). As cepas com maior título e representantes das duas variáveis genéticas de DENV-3 (com inserção de 11 nts e deleção de 8 nts) foram selecionadas para infecção: cepas BR73356 e BR74886.

4.2 Obtenção de fêmeas de *Aedes aegypti* F1 para infecção viral

Para a realização da infecção experimental via alimentação oral de fêmeas de *Ae. aegypti* com as duas cepas de DENV-3 isoladas do Rio de Janeiro, foram utilizados mosquitos da geração F1 nascidos em laboratório a partir de ovos coletados com ovitrampas também no Rio de Janeiro, neste caso na localidade de Tubiacanga, na Ilha do Governador. Como controle, usamos mosquitos da cepa Paea, de comprovada e elevada susceptibilidade aos DENV, originária da Polinésia Francesa (Vazeille-Falcoz et al 1999). A cepa Paea, foi gentilmente cedida pelo Instituto Pasteur, Paris-França, e vem sendo

mantida no insetário do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, IOC/Fiocruz, desde 2003.

Em condições de biossegurança, os ovos foram submersos em água sem cloro. As larvas recém-eclodidas foram distribuídas em cubas plásticas com tampa coberta por filó, cada uma contendo 100 larvas (Figura 11 A). As larvas foram alimentadas com levedo de cerveja e a água de criação trocada a cada 2-3 dias. Foram utilizados 60 recipientes, totalizando 6.000 larvas. As pupas eram retiradas diariamente dos recipientes, manualmente, com pipetas, e transferidas para potes com água desclorada, os quais eram colocados dentro de gaiolas cilíndricas de papelão (17 x 17 cm) (Figura 11 B), cobertas por filó e com o fundo forrado por um papel de filtro, onde emergiam os adultos. No interior de cada gaiola continha um frasco contendo solução açucarada (sacarose a 10%), acessível aos mosquitos através de um chumaço de algodão (Figura 11 C). Essa fonte alimentar era mantida permanentemente dentro das gaiolas e diariamente renovada. A criação dos mosquitos foi realizada de acordo com Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).



Figura 11 - Obtenção das fêmeas adultas de *Ae. aegypti* para a infecção experimental com vírus dengue no Insetário do Laboratório de Transmissores, IOC/FIOCRUZ. (A) Aspecto da manutenção das cubas com formas imaturas; (B) Gaiolas cilíndricas de eclosão e manutenção dos adultos; (C) Copos contendo pupas e alimento açucarado dentro da gaiola cilíndrica.

As fêmeas assim obtidas eram mantidas juntamente com machos até o momento da triagem, que ocorria na véspera da infecção, decorridos 5-7 dias da emergência do primeiro adulto. Os mosquitos foram alimentados com

solução açucarada até a véspera da infecção, quando eram triados segundo o sexo. A triagem dos mosquitos foi realizada sobre banho de gelo, e depois de anestesiados pelo frio, os machos eram desprezados e as fêmeas eram separadas, identificadas e contadas. Na infecção experimental, utilizaram-se 45 lotes de 65 fêmeas/lote, as quais foram dispostas em gaiolas cilíndricas de plástico teladas na parte superior (12 x 6,5 cm) e com fundo móvel.

4.3 Infecção oral de fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* com DENV-3

As fêmeas utilizadas para infecção oral encontravam-se aproximadamente 24 horas de jejum no momento da alimentação infectante. O sistema de alimentação consistia de aparato fabricado em vidro temperado (Rutledge et al 1964, Degallier 2001), composto de duas câmaras sem comunicação entre elas: uma central, com aberturas superior e inferior, e uma periférica, com aberturas laterais para circulação de água mantida a 37°C por um Banho Maria circulante (Figura 11 A). A abertura inferior da câmara central foi coberta por tripa suína dessalgada para conter o sangue infectante que foi oferecido às fêmeas (Figura 11 B).

A alimentação infectante consistia de suspensões virais correspondente a cada variante de DENV-3, na proporção de 1 mL do sobrenadante da cultura de células infectadas para 1 mL de hemácias de coelho lavadas cinco vezes com PBS a 7,2 pH e 150 uL de ATP a 0.1M (fagoestimulante). O tempo médio de exposição dos mosquitos ao repasto infectante foi de 20 minutos. O mesmo procedimento e equipamentos foram usados para alimentar simultaneamente os mosquitos da cepa Paea (Lourenco-de-Oliveira et al 2004, Maciel-de-Freitas et al 2011).

Após o repasto sanguíneo infectante, as gaiolas contendo as fêmeas expostas ao vírus foram colocadas em uma câmara de biossegurança, onde todo o restante do procedimento foi realizado. Primeiramente, as fêmeas foram anestesiadas em banho de gelo e transferidas para placa de Petri mantida fria para a seleção das fêmeas ingurgitadas (Figura 11 C). Em seguida, as fêmeas

que não se alimentaram até a repleção foram sacrificadas e descartadas do estudo. As fêmeas ingurgitadas foram agrupadas segundo as cepas virais as quais foram expostas, contadas e transferidas para gaiolas cilíndricas pequenas de papelão devidamente teladas e identificadas. Cada gaiola recebia alimentação açucarada através de um chumaço de algodão embebido em solução de sacarose 10% previamente autoclavada. Em seguida, as gaiolas eram mantidas em uma câmara de incubação, com temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade de $80\pm 10\%$ UR. Para a verificação do título da cepa viral, após a alimentação artificial, amostras do repasto foram recolhidas ao término do processo e congeladas à -70°C .



Figura 12 - Esquema da alimentação artificial via oral das fêmeas de *Ae. aegypti* com DENV-3 (A e B) e triagem das fêmeas ingurgitadas pós infecção (C).

4.4 Detecção viral em fêmeas de *Ae. aegypti* experimentalmente infectadas para a determinação a taxa de disseminação

As gaiolas contendo as fêmeas expostas aos vírus foram colocadas em freezer e mortas à baixa temperatura (-20°C), de acordo com os dias pós-infecção (dpi). Os desenhos experimentais utilizados para infecção oral de fêmeas de *Ae. aegypti* geradas a partir de ovos de mosquitos controles colonizados em laboratório (cepa Paea) e de uma população de campo (Tubiacanga, Rio de Janeiro) com duas cepas de DENV-3 estão apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

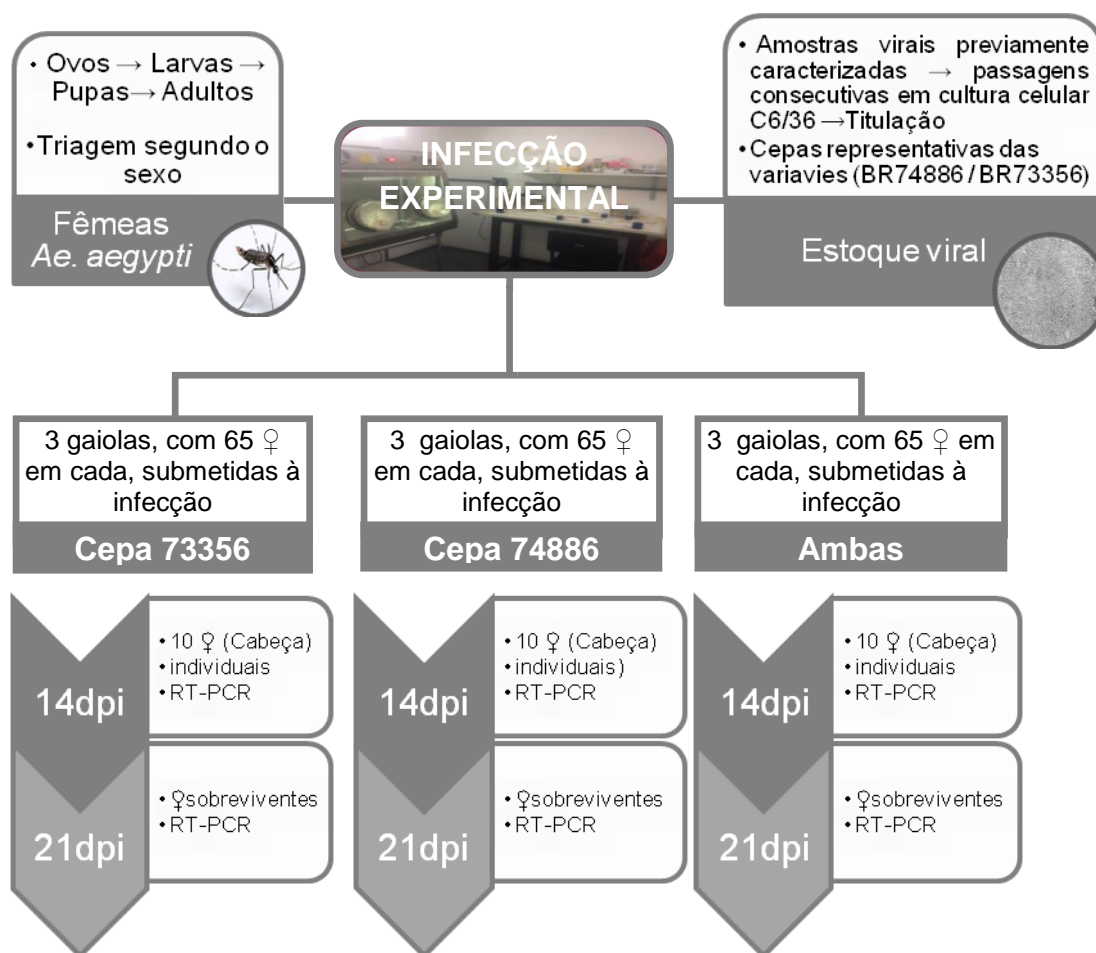


Figura 13 - Desenho experimental para infecção de fêmeas de *Ae. aegypti* controle (Paea) com as distintas cepas de DENV-3. ♀: fêmeas, dpi: dias após infecção, RT-PCR: transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase, Cabeça: detecção do RNA viral na cabeça dos mosquitos expostos ao vírus.

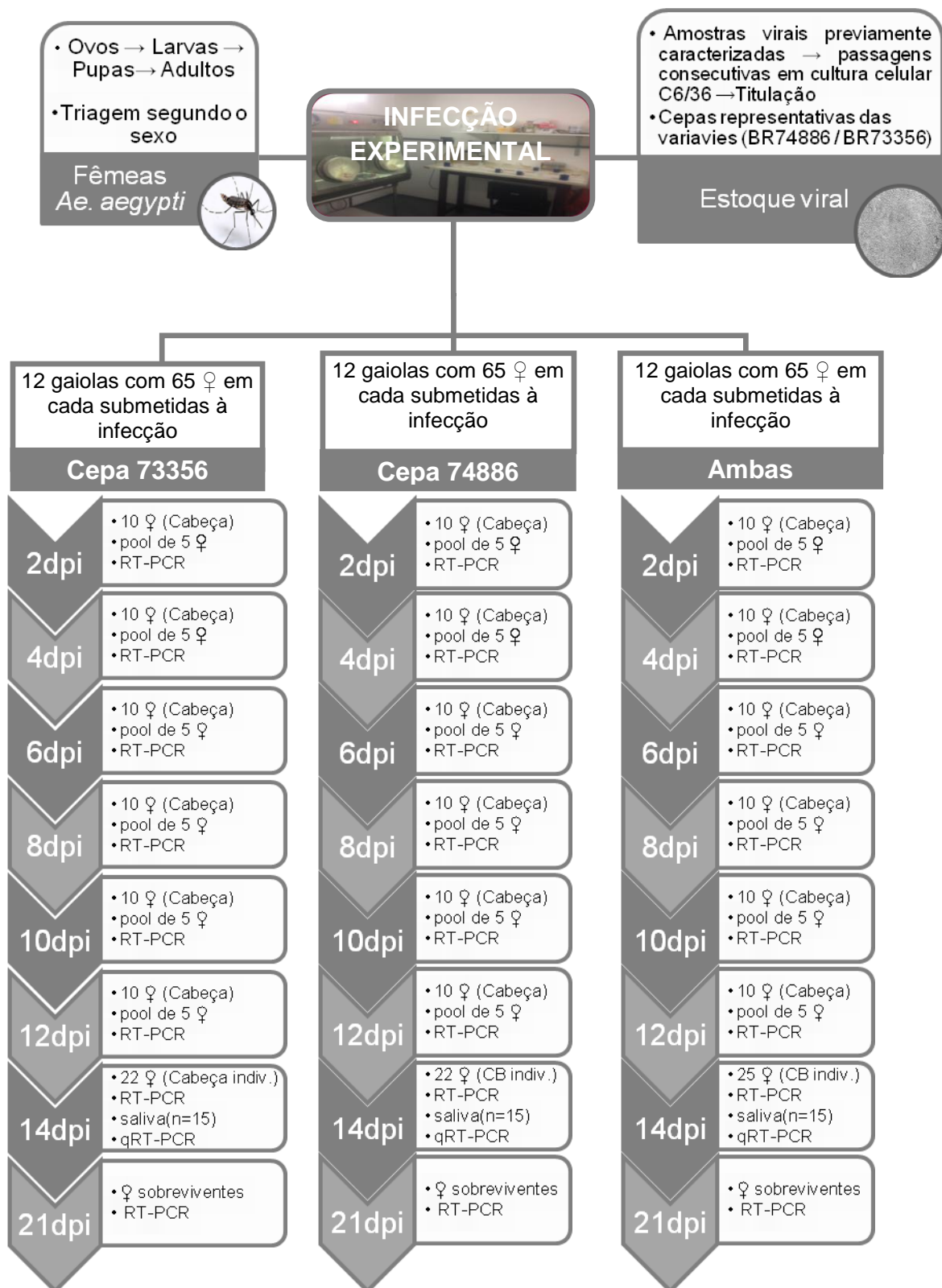


Figura 14 - Desenho experimental para infecção de fêmeas de *Ae. aegypti* (população de Tubiacanga, RJ) com as distintas cepas de DENV-3. ♀: fêmeas, dpi: dias após infecção, RT-PCR: transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase, qRT-PCR: transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase quantitativa, Cabeça: detecção do RNA viral na cabeça dos mosquitos expostos ao vírus.

Após este procedimento, a cabeça de cada mosquito foi cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi e transferida individualmente para um tubo tipo Eppendorf, devidamente identificado, contendo 250 µl de meio L-15 e suplementado com Anfotericina e 4% SFB. Seguiu-se a maceração por 30 segundos com auxílio de um pistilo plástico e centrifugação a 10.000 rpm/5 min a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante e congelando-o a – 70° C.

A determinação da taxa de disseminação do DENV-3 foi realizada a partir da detecção do RNA viral na cabeça dos mosquitos expostos ao vírus por via oral, através da técnica de RT-PCR (Lanciotti et al 1992). A cinética da disseminação viral foi feita em lotes de 10 fêmeas de *Ae. aegypti* da população de Tubiacanga escolhidas aleatoriamente cada 2 dias, ao longo de 12 dpi, examinadas em dois pools, com cinco fêmeas cada. No 14º dpi, fêmeas expostas aos vírus, sejam da população experimental ou controle, foram examinadas individualmente para a determinação da taxa de disseminação.

A taxa de disseminação foi calculada segundo a porcentagem de mosquitos com detecção viral na cabeça (RT-PCR) dentre os mosquitos expostos oralmente à infecção viral.

4.5 Obtenção da saliva dos mosquitos infectados experimentalmente para a detecção viral e determinação da taxa de transmissão.

A obtenção da saliva foi realizada através da salivação forçada, segundo o método descrito por Hurlbur (1966), com modificações. Para tal, após 14 dpi, as fêmeas foram separadas e anestesiadas, em gelo, e imediatamente, suas asas e pernas foram removidas e descartadas em condições de biossegurança. Os mosquitos foram colocados, individualmente, sobre uma placa de Petri, e sua probóscida foi inserida dentro de uma micropipeta, contendo 10 µl de óleo mineral, conforme descrito em Castro et al (2004). As fêmeas foram deixadas por 15 minutos salivando dentro do óleo mineral. Após, a micropipeta foi retirada cuidadosamente e seu conteúdo transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml contendo 140µl de SFB. Em seguida,

centrifugava-se este material a 1.500 rpm, por 3 minutos para a separação do óleo. Os tubos foram identificados de acordo com a fêmea correspondente e armazenados a -70°C. A saliva, assim preservada, foi posteriormente, utilizada para a detecção e quantificação viral por qRT-PCR (Johnson et al 2005). A taxa de transmissão representa a porcentagem de mosquitos com partículas virais detectadas na saliva através da técnica de qRT-PCR dentre os que foram expostos aos vírus.

4.6 Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído a partir de 140µL do sobrenadante de macerado de cabeça de mosquito (pools ou individualmente) e das salivas, respectivamente, utilizando-se o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

Para remoção de produtos amplificados (amplicons) inespecíficos potencialmente gerados durante a reação de amplificação por RT-PCR, foi realizado o tratamento dos macerados de mosquitos utilizando a enzima DNase I Amplification Grade, cat. no. 18068-015 (Invitrogen, Califórnia, EUA), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

4.7 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)

Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al (1992), que permite a detecção dos quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento semi-nested, gerando amplicons com tamanhos específicos em pares de base para cada sorotipo dos DENV.

Em uma primeira etapa, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) consensuais (D1 e D2) para os quatros sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM. No procedimento semi-

nested, foram utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.

Oligonucleotídeo iniciador (Sentido)	Seqüência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])
D1 (+) D2 (-)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3' 5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC- 3'	134-161 616-644	} 511
TS1 (-) TS2 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3' 5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	568-586 232-252	482 (D1 + TS1) 119 (D1 + TS2)
TS3 (-) TS4 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3' 5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	400-421 506-527	290 (D1 + TS3) 392 (D1 + TS4)

O RNA extraído foi transcrito reversamente em cDNA (42°C/60 minutos) em uma primeira etapa (Figura 15 A) e as condições de termociclagem para a amplificação do DNA consistiram de 30 ciclos subseqüentes de desnaturação (94°C/35 segundos), anelamento (56°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos) utilizando os reagentes descritos na Tabela 4.

Em uma segunda etapa (etapa semi-nested, Figura 15 B) para a tipagem dos DENV, os produtos obtidos na primeira etapa foram diluídos (1/100) em água livre de DNase e RNase (UltraPure™ DNase/RNase-FreeDistilledWater, Invitrogen, California, EUA) e submetidos a 18 ciclos de desnaturação (94°C/30 segundos), anelamento (56°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e extensão final (72°C/5 minutos) utilizando os reagentes descritos na Tabela 4. Após a semi-nested PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% acrescido de 5µL de solução de brometo de etídeo 10 mg/mL (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) por 60 minutos e visualizados em luz ultravioleta em captador de imagem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA).

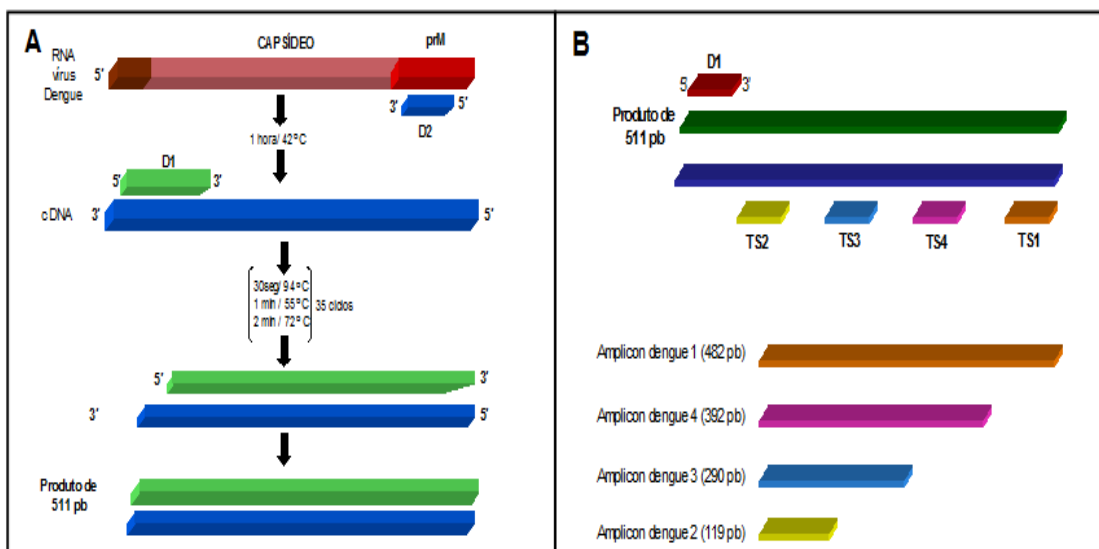


Figura 15 - Estratégia de amplificação do RNA viral dos vírus dengue (DENV) por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de acordo com protocolo descrito por Lanciotti et al., 1992. A: Transcrição reversa e amplificação do RNA viral utilizando iniciadores consensuais. B: Tipagem dos vírus dengue utilizando iniciadores tipo-específicos.

Tabela 4 - Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), de acordo com o protocolo de Lanciotti et al (1992).

MIX 1 - MISTURA PARA A PRIMEIRA ETAPA DA RT-PCR				MIX 1 - MISTURA PARA A PRIMEIRA ETAPA DA RT-PCR			
Reagente	Fabricante	Concentração	μL/tubo	Reagente	Fabricante	Concentração	μL/tubo
ddH2O	Promega	-	9,8	ddH2O	Promega	-	3,7
PCR Master Mix	Promega	2X	25,0	PCR Master Mix	Promega	2X	25
Primer D1	Invitrogen	10μM	1,3	Primer D1	Invitrogen	10μM	1,3
Primer D2	Invitrogen	10μM	1,3	Primer TS1-TS4	Invitrogen	20μM	2,5
DTT	Sigma-Aldrich	100Mm	2,5				
AMV-RT	Promega	2,5U/μL	0,1				

4.8 Eletroforese em gel de agarose para a análise dos produtos de amplificação por RT-PCR

Em um frasco Erlenmeyer, foi dissolvido 1,5g de agarose em 100mL de Tris-ácido bórico – EDTA (TBE 0,5X), aquecendo-se a solução no forno de microondas (potência máxima) por 1 minuto, seguido de homogeneização manual e aquecimento posterior de mais 1 minuto. A solução foi resfriada e 5 μ L de brometo de etídio (10 mg/mL) foi adicionado dentro da capela de exaustão, onde o gel foi transferido para um molde de acrílico nivelado, colocando-se pente para geração dos poços, permanecendo desta forma por ~15 minutos para a solidificação. Após endurecimento o gel foi acondicionado em cuba de eletroforese contendo TBE 0,5X. As amostras diluídas 1:5 em azul de bromofenol foram aplicadas nos poços. Em cada gel era sempre aplicado um marcador de peso molecular (100pb DNA ladder, Gibco BRL, Gaithersburg, USA). Além disso, eram incluídos também um controle positivo e negativo, correspondentes a produto de PCR de amostra de RNA extraído de cultura de uma cepa de referência de DENV-3 e água, respectivamente. A eletroforese foi realizada a 100 V por ~60minutos.

4.9 Titulação viral por RT-PCR quantitativo, sistema *TaqMan* (qRT-PCR)

A concentração de RNA viral foi estimada pela quantificação absoluta do DNA complementar, realizada pela técnica de RT-PCR em uma única etapa, segundo o sistema TaqMan, onde, primeiramente ocorre a transcrição do RNA viral em DNA complementar e, posterior, amplificação deste cDNA. Utilizamos os iniciadores e a sonda marcada com os corantes 3' TR e 5'BHQ-2 (Tabela 5), específicos para DENV-3, conforme descritos por Johnson et al (2005).

Tabela 5 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan) para a detecção e quantificação do DENV-3 (Johnson et al 2005).

Oligonucleotídeos Iniciadores	Sequência	Posição no genoma
DENJ3-R	GGACTGGACACACGCACTCA	740
DENJ3-F	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	813
DENJ2-P	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	762

A reação foi realizada conforme indicação do fabricante, com concentrações ideais dos iniciadores e sonda determinadas de acordo com o protocolo descrito por Johnson et al (2005). Numa microplaca óptica (PE Applied Biosystems – Foster City, Califórnia, EUA), de 96 micropoços, primeiramente, foram adicionados 20 µl da mistura reagente (Tabela 6), contendo os iniciadores, sonda, água e o kit SuperScript III Platinum One-StepQuantitative RT-PCR (Invitrogen, EUA) em cada poço. Logo após, acrescentavam-se 5 µl do RNA extraído, obtendo-se, assim, um volume final de 25 µl/ reação. Cada amostra e controles foram aplicados em duplicata. Após a montagem da placa, um filme plástico (*Optical Adhesive Cover*, PE Applied Biosystems – Foster City, Califórnia, EUA) foi colocado sobre a placa para selagem. As placas foram lidas no aparelho para a reação de RT-PCR em tempo real Line Gene 9600 (Bioer), seguindo-se aos parâmetros de ciclagem disponíveis Tabela 7.

Tabela 6 - Reagentes utilizados na RT-PCR em tempo real para detecção dos DENV-3 de acordo com o protocolo de Johnson et al (2005).

Reagente	Concentração	µL/tubo
Reaction Mix (Invitrogen)	2X	12,5
H ₂ O (Promega)	--	3,25
MgSO ⁴ (Invitrogen)	5 mM	1,0
Sonda DENJ3-P (Sigma)	9 µM	0,75
Primer DEN3-F (Sigma)	50 µM	1,0
Primer DEN3-R (Sigma)	50 µM	0,5
Super Script III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen)	--	0,5

Tabela 7 - Parâmetros de termociclagem da RT-PCR em tempo real para detecção dos DENV-3 de acordo com o protocolo de Johnson et al (2005).

Etapas de termociclagem	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
RT	50	15 min	1
Ativação da Enzima (Amplitaq)	95	2 min	1
Desnaturação	95	15 seg	40 ciclos
Anelamento/Extensão	60	1 min	

O resultado das reações de qRT-PCR foi determinado através da aferição da intensidade de fluorescência captada no sistema TaqMan™, o qual usa sondas duplamente marcadas por corantes fluorescentes distintos, degradadas pela enzima Taq polimerase durante o curso da PCR, separando os fluoróforos e propiciando a liberação da fluorescência. A fluorescência emitida é captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde o software faz a análise final dos dados. A quantidade de vírus presente nas amostras foi calculada pelos valores de Ct (do inglês “CycleThreshold”) das amostras quando comparados aos valores de Ct da curva padrão. Por sua vez, as curvas-padrão foram feitas empregando-se uma série de diluições de amostras-padrão de RNA de DENV-3 já tituladas, sendo duas amostras de cada uma das seguintes diluições: 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 . Os valores Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo presente na amostra. Portanto, quanto mais alta for a quantidade inicial do alvo, mais cedo o produto acumulado é detectado no processo de PCR, e mais baixo é o valor do Ct. Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo software Line Gene 9660 da Bioer.

4.10 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para sequenciamento da região 3'NC dos DENV-3

A técnica de RT-PCR para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Miagostovich et al (2006). Os reagentes utilizados estão descritos na Tabela 8. Para o sequenciamento de DNA, foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de fragmentos, com aproximadamente 500 pb ao longo da região 3'NC do genoma do DENV-3 (Tabela 9). O RNA extraído foi transcrito em cDNA e amplificado através da

RT-PCR para sequenciamento utilizando o Kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em tubo tipo eppendorf de 0,2 mL, foram acrescentados 45µL da mistura de reagentes e 5 µL do RNA extraído. A transcrição reversa do RNA e a amplificação do cDNA foram realizadas seguindo-se os parâmetros de termociclagem apresentados na Tabela 10, no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, Califórnia, EUA)

Tabela 8 - Reagentes utilizados na RT-PCR para amplificação e sequenciamento da região 3'NC do genoma de DENV-3 .

Reagente	Concentração	Volume
Access Quick™ RT-PCR Mix	2X	25µL
Primer (sense)	10µM	2,5µL
Primer (anti-sense)	10µM	2,5µL
AMV-RT	5U	1µL

Tabela 9 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR para amplificação e sequenciamento da região 3'NC do DENV-3.

Oligonucleotídeo	Sequence (5'-3')	TM (°C)	Posição de acordo com a cepa GenBank # AF317645
Iniciador			
D3-62i	GTTGGAAACTAAAGGAGTGGGA	55	9502-9522
D3-40	CTGTTGGATTGCTGTGAGTAT	55	10151-10171
D3-63i	GACTACAGAAGACATGCTTACT	57	9976-9997
D3-42	CCTTTGATTCAACAGCACCA	57	10672-10692

Tabela 10 - Condições de termociclagem utilizados na RT-PCR para amplificação e sequenciamento da região 3'NC do DENV-3.

Etapas de termociclagem	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
RT	42	60 min	1
Desnaturação	94	35 seg	40
Anelamento	56	1 min	
Extensão	72	2 min	
Extensão final	72	10 min	1
Temperatura final	4	∞	-

4.10.1 Purificação do DNA amplificado por RT-PCR

O produto de DNA amplificado foi purificado utilizando o Kit comercial “PCR Purification” (Qiagen, Califórnia, EUA) na presença fragmento

amplificado único. Os protocolos foram realizados de acordo com as instruções descritas pelo fabricante.

4.10.2 Quantificação do DNA purificado

Os produtos purificados foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com 5µL de brometo de etídio (10mg/mL) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) utilizando marcador “Low Mass DNA” (Invitrogen, California, EUA).

4.10.3 Reação de sequenciamento

Os fragmentos de cDNA amplificados e purificados foram seqüenciados em ambas direções, utilizando-se o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems®, California, EUA). Os parâmetros de termociclagem para a reação de sequenciamento estão apresentados na Tabela 11. Após a reação do sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando-se colunas Centri-Sep Spin Columns (Princeton Separation, New Jersey, EUA) ou DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, California, EUA), e armazenados a 37°C por 24 horas para secagem. O DNA foi ressuspensão em 10 µL de formamida e transferido para placa de 96 orifícios (MicroAmpOptical 96 WellReaction Plate – Applied Biosystems®, California, EUA). A placa foi enviada para a Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde os produtos passaram por eletroforese capilar em analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems®, California, EUA).

Tabela 11 - Parâmetros de termociclagem utilizados na reação para o sequenciamento da região 3'NC dos DENV-3.

Etapas de termociclagem	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação	94	1 min	35
Anelamento	56	2 min	
Extensão	72	3 min	
Temperatura final	4	∞	-

4.10.4 Análise das seqüências

Para a análise dos produtos seqüenciados utilizou-se o programa Chromas® 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>) ou BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A identidade da seqüência foi determinada através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando o software CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

5 RESULTADOS

5.1 Produção de estoques virais de cepas representativas de DENV-3 para infecção experimental de fêmeas de *Ae. aegypti*

Com o objetivo de produzir estoques virais para a infecção de fêmeas de *Ae. aegypti*, nove cepas disponíveis de DENV-3 ($n=9$) previamente caracterizadas com a presença de 11 nts ou deleção de 8 nts na região 3'NC (Tabela 2), foram inicialmente inoculadas em tubos contendo cultura de células de mosquito *Ae.albopictus* clone C6/36 para recuperação viral. O DENV-3 foi confirmado por RT-PCR como o sorotipo infectante em todas as cepas inoculadas.

Após a recuperação dos vírus e três passagens consecutivas, a quantificação do título viral foi realizada por qRT-PCR, determinando que as cepas BR73354 #3 (terceira passagem) e BR73356 #3 (terceira passagem) apresentaram os mais elevados títulos, correspondendo a $9,3 \times 10^6$ PFU/mL e $4,8 \times 10^5$ PFU/mL, respectivamente, sendo as cepas selecionadas como representantes da variante de DENV-3 com deleção de 8 nts na região 3'NC. As cepas BR74886 #3 (terceira passagem) e BR77515 #3 (terceira passagem), representantes da variante de DENV-3 com inserção de 11 nts na região 3'NC do genoma apresentaram maiores títulos (2×10^6 PFU/mL e $7,4 \times 10^5$ PFU/mL, respectivamente) e sendo as selecionadas para a produção do estoque viral (Figura 16).

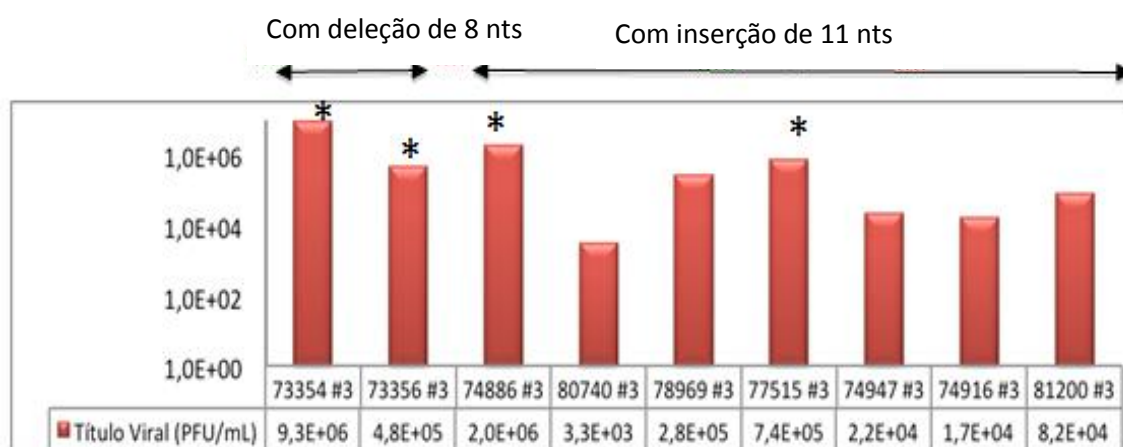


Figura 16 - Quantificação do título viral das variantes de DENV-3 após três passagens em cultura celular para produção de estoque viral por RT-PCR

quantitativo (qRT-PCR). (*) Cepas representativas de cada variante selecionadas.

As cepas selecionadas da terceira passagem, de ambas as variantes de DENV-3, foram inoculadas para a produção do estoque viral (quarta passagem-#4) e tituladas. A manutenção das características de suas regiões 3'NC foram confirmadas pelo sequenciamento genômico. O estoque viral das cepas BR73354 #4 e BR73356 #4, representantes da variante de DENV-3 com a deleção de 8 nts na região 3'NC, apresentaram títulos de $9,9 \times 10^5$ e $5,8 \times 10^7$ PFU/mL, respectivamente. Já os estoques das cepas BR74886 #4 e BR77515 #4, representantes das variantes de DENV-3 com a inserção de 11 nts na região 3'NC, apresentaram títulos de 5×10^6 e $1,9 \times 10^6$ PFU/mL, respectivamente (Figura 17).

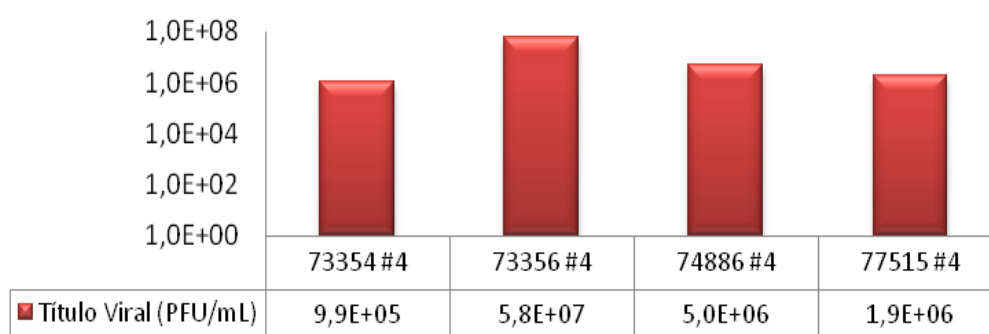


Figura 17 - Quantificação do título viral por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) das variantes de DENV-3 após produção do estoque viral (quarta passagem).

Ficou demonstrado que, mesmo após quatro passagens em cultura celular, as cepas variantes de DENV-3 mantiveram suas características na região 3'NC do genoma viral, quando sequências de vírus de alíquotas dos respectivos estoques virais foram comparadas com aquelas das amostras originalmente isoladas e caracterizadas (Figura 18).

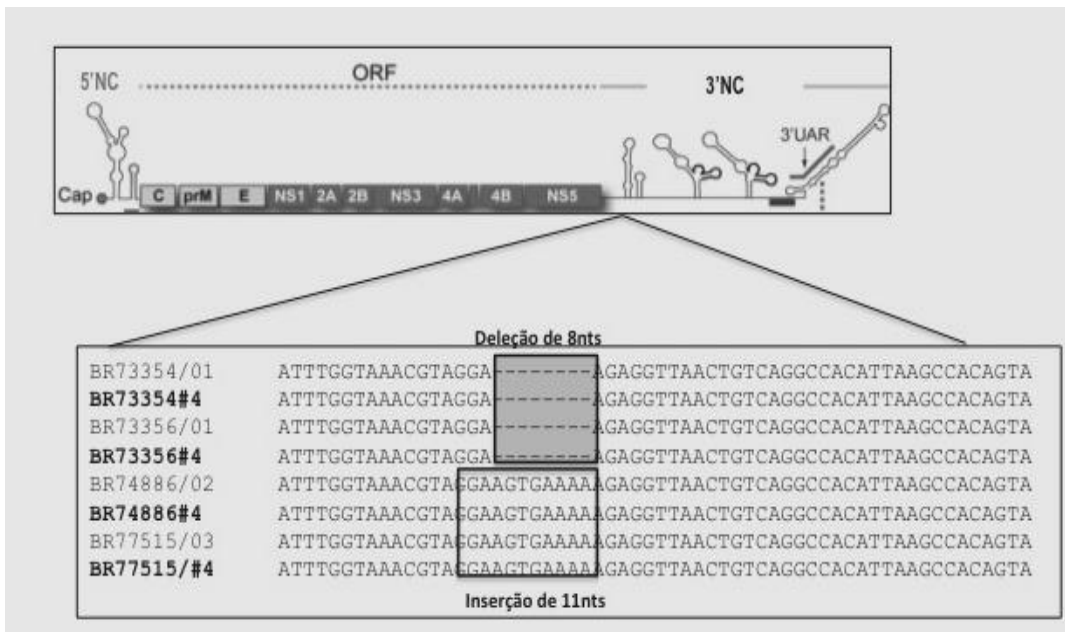


Figura 18 - Alinhamento das sequências nucleotídicas das regiões 3'NC dos genomas das variantes de DENV-3 após produção de massa viral para confirmação de suas características.

Finalmente, com a finalidade de se obterem maiores títulos virais foi realizada uma quinta passagem (passagem #5) das cepas previamente selecionadas. As cepas BR74886 #5, representante da variante com inserção de 11 nts na região 3'NC, e BR73356 #5, representante da variante com deleção de 8 nts, que apresentaram títulos de 8×10^7 PFU/mL e $7,3 \times 10^7$ PFU/mL, respectivamente, foram selecionadas para a infecção experimental em vista de seu mais elevado título (Figura 19).

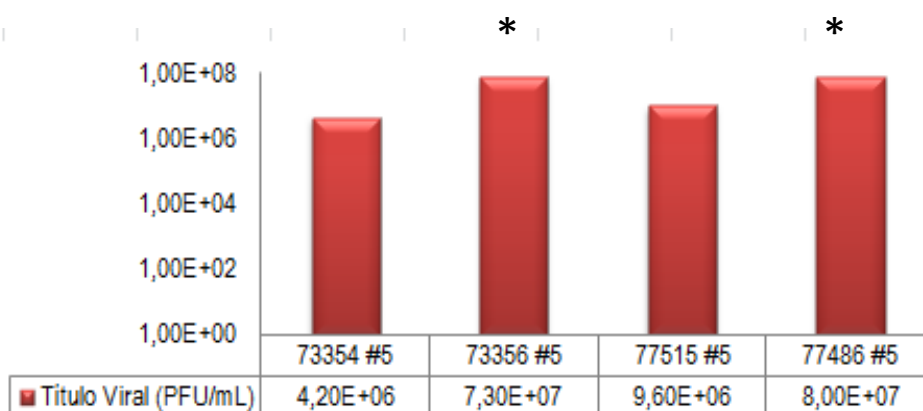


Figura 19 - Quantificação do título viral por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) das variantes de DENV-3 após cinco passagens em cultura celular (*) Cepa representativa de cada variante selecionada.

Ficou demonstrado que, mesmo após cinco passagens em cultura celular, as cepas variantes de DENV-3 também mantiveram suas características na região 3'NC do genoma viral.

5.2 Infecção experimental de fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* por via oral com distintas variantes de DENV-3

A estratégia de infecção consistiu na utilização de 2.925 fêmeas de *Ae. aegypti*, sendo que 2.340 da geração F1 da população de Tubiacanga e 585 da cepa Paea, distribuídas em gaiolas contendo 65 fêmeas em cada. Para cada desafio, 780 fêmeas foram submetidas à alimentação artificial na população de *Ae. aegypti* Tubiacanga e 195 no grupo controle (*Ae. aegypti* cepa Paea), Tabela 12.

Tabela 12 - Percentuais das duas populações de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas na infecção experimental, expostas as diferentes cepas virais de DENV-3.

Espécie	Cepas de DENV-3		
	BR74886#5	BR73356#5	Ambas as cepas
Percentuais de fêmeas que se alimentaram até a repleção (Positivos/Testados)			
<i>Ae. aegypti</i> (Tubiacanga)	12,1 (94/780)	15,1 (118/780)	15,4 (120/780)
<i>Ae. aegypti</i> (Paea)	18,5 (36/195)	16,9 (33/195)	17,4 (34/195)

Na infecção experimental, ao comparamos a proporção das fêmeas alimentadas com as cepas de DENV-3 individualmente e com as alimentadas com uma mistura das duas cepas, seja na população de Tubiacanga, seja na cepa Paea, observamos que os percentuais de fêmeas que se alimentaram até a repleção apresentaram baixa divergência no padrão alimentar.

5.3 Determinação da disseminação das cepas de DENV-3 em fêmeas de *Ae. aegypti* por RT-PCR

Na população de fêmeas de *Ae aegypti* de Tubiacanga, a cada 2 dias ao longo de 12 dpi, retiraram-se dez mosquitos que foram, posteriormente analisados em pools de 5 para a detecção viral nas cabeças por RT-PCR (Figura 20).

A população testada mostrou-se suscetível as duas cepas virais de DENV-3. No entanto, a velocidade da disseminação viral no corpo do mosquito apresentou-se heterogênea, sugerindo que a cepa com inserção de 11 nts (BR74886 #5) dissemina-se mais rapidamente que a cepa com deleção de 8 nts (BR73356 #5).

Não foi detectada disseminação viral nas fêmeas de *Ae. aegypti* de Tubiacanga analisadas no 2º dpi. Porém, quando avaliadas no 4º, 6º, 8º dpi a proporção de pools positivos diferiram entre as cepas analisadas. No 4º dpi, houve a detecção viral em 50% dos pools de cabeças de fêmeas alimentadas com a cepa BR74886 #5 (inserção de 11 nts), que atingiu 100% de positividade do 6º dpi até o 12º dpi. Por outro lado, quando os mosquitos foram alimentados com a cepa BR73356 #5 (deleção de 8 nts) a detecção viral em 50% dos pools analisados só foi alcançada no 8º dpi, atingindo 100% de positividade apenas no 10º dpi e no 12º dpi. Ao analisarmos os pools, correspondentes aos homogenatos de cabeças dos mosquitos alimentados com uma mistura de quantidades equivalentes de vírus das duas cepas, observamos um padrão similar ao verificado quando os mosquitos foram alimentados somente com a cepa BR74886 #5 (inserção de 11 nts), ou seja positividade em 50% dos pools analisados no 4º dpi e de 100% a partir do 8º dpi, exceto por não se ter detectado RNA viral no 6º dpi (Figura 20).

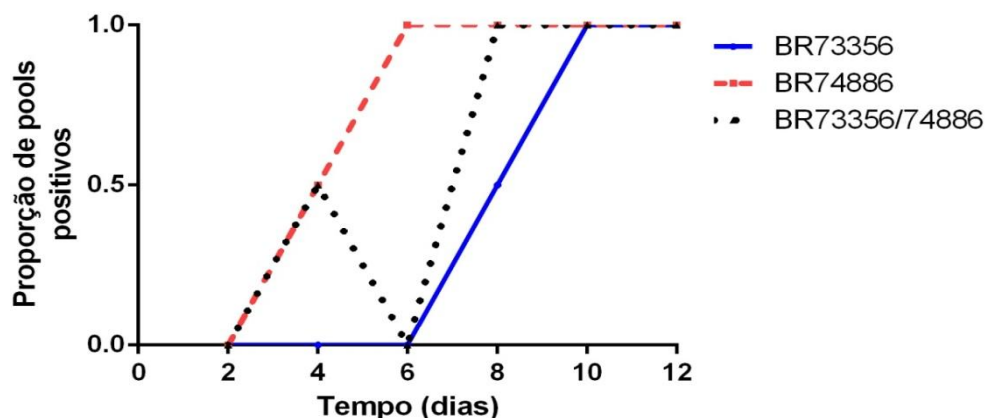


Figura 20 - Proporção de pools positivos de fêmeas de *Ae. aegypti* de Tubiacanga, ao longo de 12 dias pós infecção com duas cepas de DENV-3 separadamente e com co-infecção. Para cada tempo, foram analisados por RT-PCR, 2 pools (5 indivíduos), correspondentes aos homogenatos de cabeça. Cepas: BR74886 #5 (com inserção de 11 nts) e BR73356 #5 (com deleção de 8nts).

No 14^o dpi, foram analisadas, individualmente, 99 fêmeas de *Ae. aegypti* (Tubiacanga e Paea) dentre as oralmente expostas às duas cepas de DENV-3. As taxas de disseminação na cepa controle de *Ae. aegypti* Paea foram ligeiramente maiores e mais homogêneas para os diferentes desafios com as cepas de DENV-3 quando comparadas com as observadas para as fêmeas de *Ae. aegypti* de Tubiacanga (Tabela 13).

Tabela 13 - Taxas de disseminação de DENV-3 em populações de *Ae. aegypti* examinadas 14 dias após serem oralmente expostas às diferentes cepas virais.

Cepa de DENV-3	Taxa de disseminação* (Positivos/Testados)	
	Tubiacanga	Cepa controle Paea
BR74886 #5 (inserção de 11nts)	77,3 (17/22)	80 (8/10)
BR73356 #5 (deleção de 8nts)	59,1 (13/22)	70 (7/10)
BR73356 #5+BR74886 #5	68 (17/25)	80 (8/10)

*porcentagem de mosquitos com vírus detectado em amostras de cabeça dentre aqueles expostos oralmente ao DENV-3 através de RT-PCR.

Observou-se que as taxas de disseminação em fêmeas de *Ae. aegypti* de Tubiacanga variaram entre 59,1% quando alimentadas com a cepa BR73356 #5 (representante da cepa de DENV-3 com a deleção de 8 nts) a 77,3% quando alimentadas com a cepa BR74886 #5 (representante da cepa de DENV-3 com inserção de 11nts), obtendo-se um valor intermediário quando estas fêmeas foram desafiadas com a mistura das duas cepas (68%) (Figura 21). Em suma, as taxas de disseminação ao 14^o dpi foram mais altas quando os mosquitos de Tubiacanga ou a cepa controle foram alimentados com a cepa contendo a inserção de 11 nts isoladamente. Quando o repasto infectante continha esta cepa misturada àquela com deleção de 8 nts, as taxas de disseminação foram maiores de quando alimentadas somente esta última cepa (Tabela 13; Figura 21).

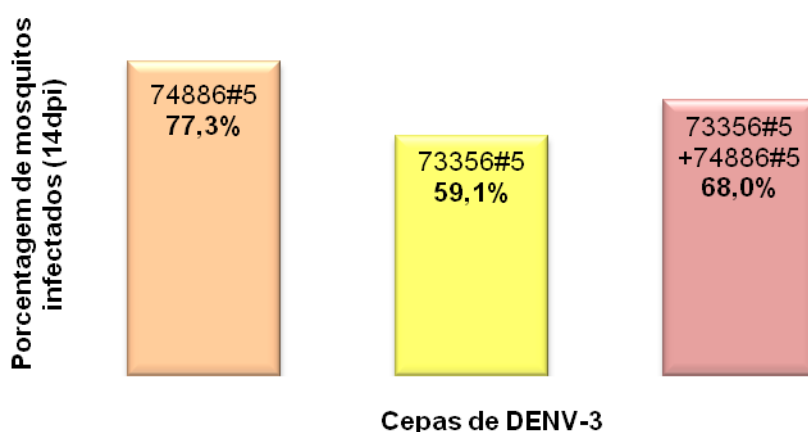


Figura 21 - Taxa de disseminação determinada pela detecção do RNA viral na cabeça dos mosquitos por RT-PCR na população de *Ae. aegypti* de Tubiacanga oralmente expostas a duas cepas de DENV-3 e com a infecção simultânea das mesmas. Cepas: BR74886 #5 (com inserção de 11 nts) e BR73356 #5 (com deleção de 8 nts).

Os mosquitos sobreviventes ao 21^o dpi foram analisados em pools de homogenatos de cabeças através da técnica de RT-PCR. Embora o número de pools analisados tenha sido diferente entre as variáveis em virtude do fato de que a quantidade de mosquitos disponíveis neste momento diferia a disseminação foi a mesma (100%) independentemente da cepa com que os mosquitos foram desafiados ou com a mistura das duas (BR73356 #5,

BR74886 #5 e BR73356 #5 + BR74886 #5). Assim, sugere-se que, em 21 dpi não há diferença na disseminação viral entre as cepas analisadas.

A mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* ao longo dos 21 dias após a alimentação infectante acha-se resumida na Tabela 14.

Tabela 14 – Taxa de mortalidade entre as fêmeas de *Ae. aegypti* ingurgitadas após infecção oral com cepas de DENV-3 observada ao longo de 21 dpi.

Cepas/ característica da região 3'NC	Taxa de mortalidade entre populações de <i>Ae. aegypti</i> Nº de fêmeas mortas naturalmente/ Nº de fêmeas ingurgitadas			
	<i>Ae. aegypti</i> (Tubiacanga)	% de ♀ mortas naturalmente	<i>Ae. aegypti</i> (Paea)	% de ♀ mortas naturalmente
BR74886 #5 (com inserção de 11 nts)	5/94	5,3	12/36	33,3
BR73356 #5 (com deleção de 8 nts)	12/118	10,2	15/33	45,5
BR74886 #5 + BR73356 #5	21/120	17,5	22/34	64,7

♀: fêmeas

De forma geral, nota-se que as fêmeas de *Ae. aegypti* da cepa controle Paea apresentaram maiores taxas de mortalidade que as de Tubiacanga. As fêmeas alimentadas ao mesmo tempo com as duas cepas de DENV-3 (BR73356 #5 + BR74886#5) apresentaram taxas mais elevadas de mortalidade que quando alimentadas com somente uma das cepas, tanto na população de Tubiacanga, quanto na cepa Paea (Tabela 14). Foi observada uma maior taxa de mortalidade entre as fêmeas, de ambas populações de *Ae. aegypti*, desafiadas com a cepa de DENV-3 que apresenta a deleção de 8 nts na região 3'NC.

5.4 Taxa de transmissão: detecção e quantificação de DENV-3 na saliva de fêmeas de *Ae. aegypti* experimentalmente infectados

Com o objetivo de detectar a presença do DENV-3 na saliva das fêmeas experimentais de *Ae. aegypti* (Tubiacanga) e determinar o título viral, utilizou-se a técnica de qRT-PCR em salivas coletadas após a salivacção induzida em 15

fêmeas alimentadas com a cepa BR73356 #5 (com a deleção de 8 nts), de 15 fêmeas alimentadas com a cepa BR74886 #5 (com a inserção de 11 nts) e de 15 fêmeas alimentadas simultaneamente com ambas as cepas, no 14^o dia pós infecção experimental. As taxas de transmissão foram idênticas para os mosquitos alimentados apenas com a cepa BR74886 #5 e quando esta foi oferecida simultaneamente com a cepa BR73356 #5 (33,3%). Contudo, a taxa de transmissão nas fêmeas alimentadas apenas com a cepa BR73356 #5 foi quase três vezes menor, ou seja, 13,3% (Figura 22).

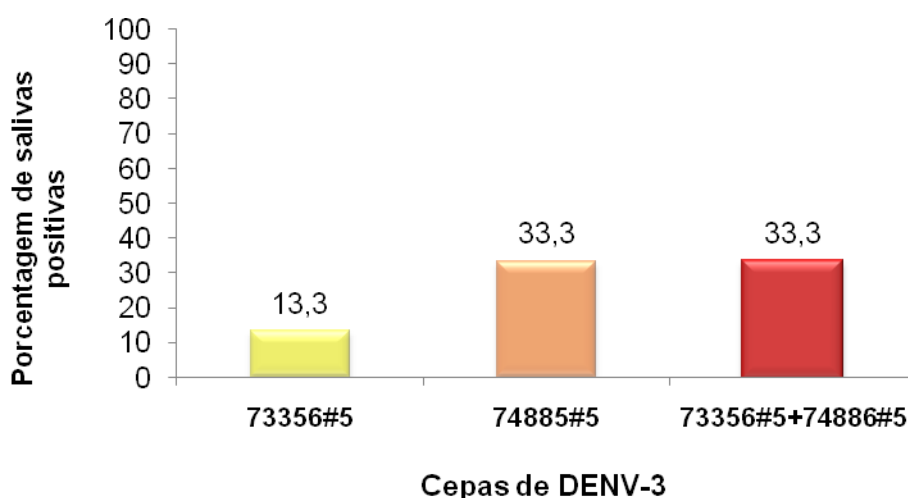


Figura 22 - Porcentagem de salivas de fêmeas de *Ae. aegypti* com detecção do RNA viral por qRT-PCR após 14 dpi com as diferentes cepas de DENV-3. Cepas: BR74886 #5 (com inserção de 11 nts) e BR73356 #5 (com deleção de 8nts).

Através da técnica de qRT-PCR foi possível a quantificação da carga viral em cópias de RNA/ml presentes nas salivas das fêmeas infectadas pelos DENV-3. Os valores individuais variaram consideravelmente, quando as fêmeas foram alimentadas com a cepa de DENV-3 BR74886#5, caracterizada por uma inserção de 11 nts, assim como quando alimentadas com ambas variantes virais misturadas ao repasto sanguíneo, sendo os seguintes os valores mínimos e máximos detectados, respectivamente: BR74886 #5 = $4,4 \times 10^3$ e $1,13 \times 10^6$ cópias de RNA/ml; BR73356 #5 + BR74886 #5 = $7,7 \times 10^2$ e $1,2 \times 10^8$ cópias de RNA/ml. As duas fêmeas com saliva positiva dentre as alimentadas somente com a cepa de DENV-3 BR73356 #5, que apresenta a deleção de 8 nts na região 3'NC, apresentaram títulos mais homogêneos: 2,14

x 10^4 cópias de RNA/ml e $2,24 \times 10^4$ cópias de RNA/ml. Este resultado pode ser devido ao menor número de salivas positivas nesta combinação (n=2).

A mediana da carga viral foi de 10^4 cópias de RNA/ml nas salivas das fêmeas alimentadas separadamente com as cepas BR74886 #5 e BR73356 #5 e de 10^5 cópias de RNA/ml nas salivas das alimentadas com ambas as cepas simultaneamente (Figura 23).

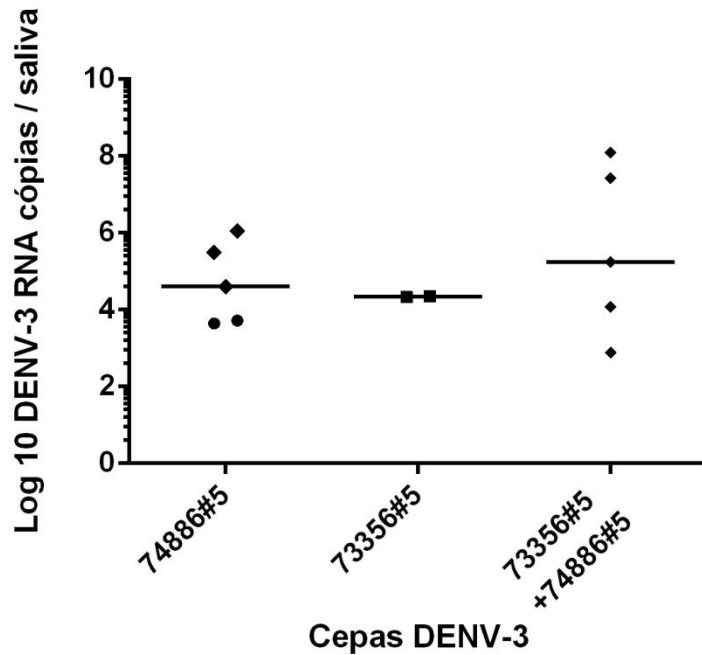


Figura 23 - Quantificação da carga viral (cópias de RNA/ml) individual de DENV-3 detectados nas salivas de mosquitos *Ae. aegypti* da população de Tubiacanga ao 14^o dpi. Cepas: BR74886 #5 (com inserção de 11 nts) e BR73356 #5 (com deleção de 8nts).

5.5 Caracterização molecular da região 3'NC do genoma de cepas DENV-3 recuperadas após a replicação em fêmeas de *Ae. aegypti* 14 dpi.

Visando avaliarmos possíveis alterações nucleotídicas ocorridas durante o processo de replicação das cepas de DENV-3, *in-vivo* no vetor, realizou-se o sequenciamento genômico dos vírus detectados em cabeças individuais, maceradas após o 14^o dpi. Para tal, foram selecionadas cinco cabeças individuais positivas através de análise por RT-PCR de cada grupo de

mosquitos desafiados com cada cepa de DENV-3 e com as duas simultaneamente.

Ao realizarmos o alinhamento da região 3'NC das amostras selecionadas não foram verificadas variações nucleotídicas, mantendo a inserção de 11 nts e a deleção de 8 nts, quando as fêmeas foram alimentadas com a cepa BR74886 #5 e BR73356 #5, respectivamente. Entretanto, ao analisarmos o seqüenciamento das amostras de fêmeas que foram alimentadas ao mesmo tempo com ambas as cepas, observamos apenas a inserção de 11 nucleotídeos, sugerindo que existe a prevalência desta cepa sobre a BR73356 #5 (deleção de 8 nts).

6 DISCUSSÃO

Nos últimos 50 anos, a dispersão global dos quatro sorotipos de DENV e, conseqüentemente, o aumento da transmissão viral tem possivelmente aumentado seu potencial adaptativo resultando na dispersão e manutenção de genótipos, linhagens e cepas mais virulentos, que podem estar associados a uma doença mais grave (Kyle e Harris 2008).

O DENV-3, genótipo III ou Subcontinente Indiano, foi introduzido na região das Américas proveniente do Sudeste Asiático, e possui um fenótipo de elevada virulência, com alta capacidade de replicação em células humanas e envolvimento na patogênese da doença (Rico-Hesse 2003).

A introdução deste genótipo no Brasil foi caracterizada pela sua capacidade de rápida disseminação pelo país, associada a epidemias graves desde a sua introdução, em 2000, no Rio de Janeiro (Nogueira et al 2005, Siqueira et al 2005).

Dos cinco genótipos descritos para o DENV-3, os genótipos I, II e III (GI, GII e G III) têm sido responsáveis pela maioria das infecções em humanos e associados a casos de dengue clássico e casos graves no Sudeste da Ásia, Subcontinente Indiano, Pacífico Sul, Leste Africano e Américas, enquanto que os genótipos IV e V (GIV e GV) não têm sido associados a casos graves e são representados por vírus recentemente circulantes nas Américas, Pacífico Sul e Ásia (Lanciotti et al 1994, Wittke et al 2002, King et al 2008, Araújo et al 2009). Neste contexto, a potencial emergência de cepas associadas com um quadro mais grave ressalta a necessidade da vigilância virológica nos hospedeiros humanos e vetores de modo a se detectar precocemente a introdução ou o aparecimento de linhagens e/ou mutantes.

Este estudo representa o primeiro trabalho quantitativo e comparativo que investiga se cepas de DENV-3 contendo distintas sequências nucleotídicas na região 3'NC comportam-se distintamente quanto a aspectos da competência vetorial de população do vetor *Aedes aegypti* procedente da mesma área geográfica, Rio de Janeiro. Esta investigação visa avaliar se uma cepa de DENV-3 isolada de mosquitos, com uma deleção de 8 nts dentro da

inserção de 11 nts na região 3'NC (Castro et al 2013) apresentaria vantagem replicativa no mosquito em comparação com uma cepa contendo essa inserção completa. Esta característica é descrita no GIII de DENV-3 das regiões Latino-Americanas/ Caribenhas e do Sri Lanka (Peyrefitte et al 2003, Miagostovich et al 2003, Silva et al 2008).

As sequências e estruturas secundárias das regiões 5'e 3'NC dos flavivírus desempenham funções importantes na replicação viral. Desse modo, diferenças nestas regiões podem influenciar na virulência da cepa viral (Leitmeyer et al 1999, Cologna e Rico-Hesse 2005, Clyde e Harris 2006, Silva et al 2008). Além disso, mutações e deleções dentro destas regiões podem alterar a infectividade e reduzir a eficiência da replicação viral (Menet al 1996, Mandl et al 1998).

Portanto, com o intuito de compararmos a eficiência da infecção das duas cepas e caracterizar possíveis variações nucleotídicas durante a replicação *in vivo* no vetor, foi realizada a infecção experimental oral de mosquitos de uma população experimental e outra controle de *Ae. aegypti* a amostras de DENV-3 isoladas respectivamente de mosquitos e humano, previamente caracterizadas com a deleção de 8 nts e com a inserção de 11 nts na região 3'NC. Entre as nove amostras inicialmente selecionadas para a realização dos experimentos, foram escolhidas representantes de cada variável que possuíam maiores títulos virais, as quais foram correspondentes a quinta passagem em cultura celular.

Na infecção experimental, como em outros estudos sobre competência vetorial (Bennet et al 2002; Lozano-Fuentes et al 2009; Richardson et al 2006; Salazar et al 2007, Sylla et al 2009), utilizamos títulos virais que estão dentro do valores observados em humanos no período virêmico, que podem variar de 10^2 a 10^7 PFU/mL ou 10^3 a 10^8 TCID₅₀/ml (Murgue et al 2000, Salazar et al 2007, Vaughn et al 2000). No entanto, ainda não está totalmente elucidado a importância do título viral na taxa de disseminação no vetor. Bennett et al (2002) demonstraram que o título viral influencia significativamente a taxa de infecção do intestino, sendo que para títulos maiores de DENV ocorrem maiores taxas de infecção do intestino. No entanto, não encontraram nenhuma

relação entre o título e a taxa de disseminação. Em outros experimentos, Bosio et al (1998) também não encontraram nenhuma correlação entre o título de DENV-2 no intestino e a taxa de disseminação. Seus resultados sugerem que as barreiras à infecção e disseminação são determinadas geneticamente e regulam a competência do vetor para o DENV-2, independentemente do título do vírus ingerido. Porém, os mesmos autores concluíram, mais tarde, que tanto a dose infecciosa quanto as barreiras (determinadas por *quantitative trait loci* [QTL]) podem determinar se os mosquitos *Ae. aegypti* serão infectados quando se alimentarem em um ser humano infectado pelos DENV (Bosio et al 2000).

Os mecanismos que governam a infecção, disseminação e a transmissão dos arbovírus nos insetos vetores não são ainda bem conhecidos (Lamberchts & Failloux 2012). Entretanto, sabe-se que as características genéticas, tanto da cepa do vírus quanto da população de mosquitos influenciam no processo de infecção (Lamberchts et al 2012). A competência vetorial de um artrópode refere-se à permissividade deste à infecção, replicação e transmissão de patógenos específicos, sendo um fator importante para a compreensão do processo de interação vírus-vetor na transmissão das arboviroses (Black IV et al 2002). Como já descrito na literatura, a competência vetorial não é restrita ao processo de interação vetor-patógeno, que é controlada por fatores genéticos e está associada com o número de barreiras anatômicas que determinam a eficiência da infecção no vetor (Beerntsen et al 2000).

Com efeito, a competência vetorial também pode ser influenciada por condições do ambiente, que por sua vez podem interferir na diversidade genética tanto do vírus quanto do vetor. A elucidação do tropismo viral em *Ae. aegypti* recentemente colonizados pode prover melhor conhecimento sobre o potencial de transmissão e sobre as interações vírus-vetor que condicionam a epidemiologia da dengue e o seu potencial epidêmico (Salazar et al 2007).

Numerosos trabalhos avaliam a competência vetorial em populações de mosquitos *Aedes sp.* ao DENV. Um estudo interessante sobre a avaliação da competência vetorial de populações de *Ae. aegypti* para o DENV foi realizado por Bennett et al (2002). Neste estudo foi analisada a variação da competência

vetorial de 24 populações de *Ae. aegypti* do México e Estados Unidos para o DENV-2, mostrando que estas populações apresentam uma variação significativa em suas competências para transmitir o DENV. Alguns estudos demonstraram que a competência vetorial pode variar tanto entre espécies diferentes como entre diferentes populações da mesma espécie. Populações de *Ae. aegypti*, estudadas em diferentes locais variam quanto à competência em transmitir o DENV (Bennet et al 2002, Lourenço de Oliveira et al 2004, Diallo et al 2008, Sylla et al 2009).

No presente estudo, foram utilizados mosquitos *Ae. aegypti* da primeira geração, cuja geração parental foi capturada em campo, no bairro de Tubiacanga, Ilha do Governador, uma localidade do Rio de Janeiro com histórico de intensa transmissão de dengue. Esta população foi escolhida por estar na mesma área geográfica de onde foram também isoladas as cepas testadas, de modo a tentarmos entender como cada par se comportaria no que concerne à competência vetorial. Usamos mosquitos *Ae. aegypti* da cepa Paea, mantida por várias gerações em condições de laboratório, cujas características genéticas são potencialmente bem distintas, uma vez que é originária do Pacífico. Já foi demonstrado que *Ae. aegypti* de diferentes regiões geográficas e continentes são bastante diferenciados geneticamente e apresentam distintas competências para veicular arbovírus, como dengue (Tabachnick & Powell 1979, Tabachnick 2013, Powell & Tabachnick 2013).

Os nossos resultados revelaram diferenças na disseminação das cepas virais de DENV-3 nos mosquitos *Ae. aegypti* de Tubiacanga, sugerindo que a cepa de DENV-3 característica do GIII deste sorotipo, ou seja com a inserção de 11 nts na região 3'NC, apresentaram uma disseminação mais eficiente. Nesta população de mosquitos, a detecção viral foi observada na metade do tempo, ao compararmos como ocorrido nas fêmeas alimentadas com a cepa de DENV-3 com a deleção de 8 nts na região 3'NC. Notou-se também que as fêmeas alimentadas simultaneamente com ambas as cepas ou somente com a cepa com a inserção de 11 nts na região 3'NC exibiram taxa de disseminação mais elevadas que as observadas que a encontrada para a cepa de DENV-3 com a deleção de 8 nts nessa região.

Embora tenha havido heterogeneidade nas taxas relativas à competência vetorial quando os mosquitos foram desafiados oralmente com as duas cepas, demonstramos que a população de *Ae. aegypti* de Tubiacanga testada mostrou-se suscetível às duas cepas virais de DENV-3. A presença do vírus nos tecidos nervosos da cabeça (Salazar et al 2007) e a relação positiva entre a presença de DENV nos tecidos secundários e na saliva (Lambrechts et al 2012, Nguyen et al 2013), sugerem que ambas as cepas de DENV-3 são capazes de serem transmitidas pela picada de *Ae. aegypti* fluminenses. No entanto, diferentes tempos pós-infecção e eficiências foram observados. Com efeito, a cepa característica do GIII de DENV-3 (com inserção de 11 nts) que mostrou vantagens no desenvolvimento no mosquito é a mais frequentemente isolada no Rio de Janeiro e Brasil (Castro et al 2013).

Ressaltamos a importância que o PIE potencialmente menor em *Ae. aegypti* quando infectados com a cepa contendo a inserção de 11 nts (BR74886 #5), uma vez que PIE mais curtos podem influenciar sobremaneira a dinâmica da transmissão da infecção na natureza. De fato, a taxa de sobrevivência diária e a longevidade dos mosquitos de uma população influenciam diretamente na capacidade vetorial (Luz et al 2003, Maciel-de-Freitas et al 2007). E, a infecção por vírus dengue pode influenciar negativamente na longevidade dos mosquitos infectados (Maciel-de-Freitas et al 2013). Assim, uma cepa de DENV cujas partículas virais conseguem se disseminar mais rapidamente tem maiores chances de ser transmitida na natureza. Além disso, como mosquitos infectados e com o vírus nas glândulas salivares são capazes de transmiti-lo durante toda a sua vida, em teoria, quanto mais cedo o vírus disseminar, mais eficientemente será transmitido. Isto significa dizer que quanto menor o PIE maior será o tempo que o vetor será capaz de transmitir o vírus para um hospedeiro vertebrado, aumentando consideravelmente as chances de ser disseminado na população humana.

No 14^o dia pós-infecção, observamos variações nas taxas de disseminação, sendo a menor taxa observada quando as fêmeas de *Aedes* foram alimentadas com a cepa BR73356 #5 contendo a deleção de 8 nts (59,1%), ao compararmos com as cepas BR74886 #5 que apresentou a maior

taxa de disseminação (77,3%) e com ambas as cepas que exibiu um valor intermediário (68%).

As taxas de disseminação correspondentes para a cepa Paea apresentaram percentuais semelhantes: 70% quando alimentadas com a cepa BR73356 #5 e com ambas as cepas, e 80% quando alimentadas com a cepa BR74886 #5. Foram taxas ligeiramente maiores ao compararmos com aquelas exibidas pela população de mosquitos de Tubiacanga. Tais diferenças podem ser devidas à maior susceptibilidade dessa cepa de mosquito colonizada e concordam com observações anteriores, em que a taxa de disseminação de DENV em *Ae. aegypti* da geração F1 foi comparada àquela exibida pela cepa Paea (Lourenço-de-Oliveira et al 2004)

Contudo, ao analisarmos as taxas de transmissão, observamos que foram idênticas em mosquitos desafiados somente com a cepa BR74886 #5, contendo a inserção de 11 nts, e com ambas as cepas misturadas no repasto, porém inferior (13,3%) quando as fêmeas foram alimentadas com a cepa de DENV-3 com a deleção de 8 nts, BR73356 #5. No entanto, tal diferença pode ser devida, entre outros fatores, ao manuseio na obtenção da saliva ou à ausência da salivação, necessitando de futuras avaliações.

Através da técnica de qRT-PCR, que permite a determinação do número de cópias de RNA viral com alta sensibilidade e especificidade, foi possível comparar as cargas virais presentes nas salivas das fêmeas infectadas com as diferentes cepas, após 14 dias pós infecção. Tal ferramenta molecular tem sido padronizada para estudar as interações vírus-vetor por vários autores (Richardson et al 2006, Zhang et al 2010, Carvalho-Leandro et al 2012). Observamos variações entre os títulos obtidos, em cópias de RNA/ml, nas salivas das fêmeas alimentadas com as diferentes cepas, sendo os valores máximos observados nas salivas de mosquitos desafiados com a cepa com inserção de 11 nts ou quando esta foi oferecida juntamente com a cepa contendo a deleção de 8 nts. Ainda se desconhece qual a quantidade de partículas virais infectantes na saliva de um mosquito seria capaz de infectar humanos. Por outro lado, é possível que a carga viral inoculada possa exercer influência no curso da infecção e da doença (Nguyen et al 2013).

Alguns autores têm verificado haver correlações positivas entre o número de cópias de RNA e números de PFU em células C6/36 e em corpo de *Ae. aegypti* inoculados. Sem dúvida, há uma diferença entre o número de cópias de RNA viral e o de PFU devido a existência de partículas virais defeituosas, partículas virais “imaturas” ou inativadas, ou RNA viral livre a partir de células infectadas no material examinado. Portanto, o número de cópias de RNA viral avaliado por qRT-PCR pode estar superestimado em ~2-3 vezes (em log) com relação ao número de PFU por ml (Richardson et al 2006, Salazar et al 2007).

Visando avaliar possíveis variações nucleotídicas ocorridas durante o processo de replicação *in-vivo* no vetor, realizamos o sequenciamento e análise do alinhamento nucleotídico da região 3'NC das amostras selecionadas. A análise não revelou quaisquer alterações nas sequências destas regiões dos vírus recuperados após a replicação no vetor, ou seja, as características de inserção de 11 nts e da deleção de 8 nts das cepas BR74886 #5 e BR73356 #5, respectivamente, foram mantidas após a infecção do epitélio do estômago e disseminação para tecidos secundários, como o cérebro. A análise de sequências de vírus obtidos na saliva dos mosquitos infectados com as diferentes cepas, ainda não realizado neste estudo, é de interesse, uma vez que se acredita haver uma barreira de infecção da glândula salivar (Bennett et al 2002, Black et al 2002), que pode, em teoria, selecionar subpopulações virais. Interessantemente, ao analisarmos o sequenciamento das amostras dos vírus recuperados de fêmeas que foram alimentadas simultaneamente com ambas as cepas de DENV-3, observamos que em todas as amostras pôde-se detectar somente o vírus caracterizados pela inserção de 11 nts, característico da cepa BR74886 #5.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que diferentes cepas virais, como as variantes de um mesmo sorotipo, genótipo ou linhagem podem impactar na taxa de transmissão e na competência vetorial dos mosquitos, o que pode afetar diretamente o potencial epidêmico de um vírus em particular.

7 CONCLUSÃO

A população de *Ae. aegypti* testada mostrou-se suscetível às duas cepas virais de DENV-3, porém a disseminação viral no corpo do mosquito foi heterogênea, sugerindo que a cepa representativa do vírus com inserção de 11 nucleotídeos na região 3'NC dissemina-se mais rápido do que a cepa com deleção de 8 nucleotídeos.

Quando as fêmeas de *Ae. aegypti* foram alimentadas com ambas as cepas, a disseminação no vetor comportou-se de maneira semelhante à observada quando alimentadas com a cepa representativa da inserção de 11 nts na região 3'NC (BR74886 #5).

Os títulos virais detectados nas salivas dos mosquitos fluminenses sugerem que ambas as cepas de DENV-3 podem ser transmitidas na natureza, porém a cepa com a inserção de 11 nts na região 3'NC com maior eficácia.

O alinhamento da região 3'NC das amostras selecionadas, não demonstrou variações nucleotídicas ocorridas durante o processo de replicação *in-vivo* no vetor. Contudo, a análise desta região demonstrou uma prevalência do vírus com a inserção de 11 nts (BR74886 #5) quando as fêmeas foram alimentadas com ambas as cepas.

Finalmente, o conjunto de resultados para cada par mosquito-cepa de DENV-3 aqui testados sugere que a deleção de 8 nts na região 3'NC não parece ser uma mutação vantajosa no que concerne à eficiência na transmissão pelo vetor em relação a cepa majoritária circulante no Brasil.

8 PERSPECTIVAS

Realizar novas infecções experimentais com o objetivo de aumentar o n amostral para análise individual da competência vetorial em diferentes dias pós-infecção.

Avaliar o papel das diferentes barreiras de infecção no vetor, analisando diferentes órgãos e a saliva uma vez a glândula salivar (Bennett et al 2002, Black et al 2002), pode, em teoria, selecionar subpopulações virais.

Analisar as taxas de transmissão vertical em fêmeas alimentadas com as diferentes cepas virais.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Alto BW, Lounibos LP, Moraes CN, Reiskind MH. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proc. R. Soc. B.* 2008; 275, 463–471.
2. Alvarez, DE, Lodeiro, MF.; Ludeña, SJ.; Pietrasanta, LI.; Gamarnik, AV. Long-range RNA–RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* 2005; v. 79, p. 6.631–43.
3. Aquino VH, Anatriello E, Goncalves PF, Silva EV, Vasconcelos PFC, Vieira DS, Batista WC, Bobadilla ML, Vazquez C, Moran M, Figueiredo LTM. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; v.75, n.4, p.710-15.
4. Araújo FM, Nogueira RMR, Araújo JMG, Ramalho IL, Roriz ML, Melo ME, Coelho IC. Concurrent infection with dengue vírus Type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101: 925-928.
5. Araújo JMG, Bello G, Schatzmayr HG, dos Santos FB, Nogueira RMR. Dengue vírus type 3 in Brazil: A phylogenetic perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 526-29.
6. Beerntsen BT, James AA and Christensen BM. "Genetics of Mosquito Vector Competence." *Microbiol Mol Biol.* 2000; Rev 64(1): 115-137.
7. Benchimol JL. Febre Amarela: a Doença e a Vacina, Uma História Inacabada. ed. Rio de Janeiro: [Editora Fiocruz]; 2001.
8. Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7(1): 76–85.
9. Bennett KE, Olson KE, Muñoz ML, Fernández-Salas I, Farfán JA, Higgs S, Black WC and 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.
10. Black WC IV, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barrilas-Mury CV, Fernandez-Salas I, Munoz ML, Farfan-Ale JÁ, Olson KE and Beaty BJ. "Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*." *Archives of Medical Research.* 2002; 33: 379–388.
11. Bosio CF, Beaty BJ and Black WC 4th. "Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59(6): 965-970.
12. Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ and Black WC. "Quantitative Trait Loci That Control Vector Competence for Dengue-2 Virus in the Mosquito *Aedes aegypti*." *Genetics.* 2000; 156: 687–698.

13. Braks MAH, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida, USA. *J Med Entomol.* 2003; 40:785-794.
14. BRASIL. Guia de vigilância epidemiológica 7ed. Brasília, Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. MS. 2009.
15. Burke, D. S. & Monath, T. P. in *Fields Virology* (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001; 1043–1125
16. Cahour A, Pletnev A, Vazielle-Falcoz M, Rosen L, And Lai CJ. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology.* 1995; v. 207, p. 68–76.
17. Calisher C H, Karabatsos N, Dalrymple J M, Shope R E, Porterfield J S, Westaway E G & Brandt W E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross- neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology.* 1989; 70, 37-43.
18. Cardoso J, Ooi MH, Tio PH, Perera D, Holmes EC, Bibi K and Manap ZA. "Dengue Virus Serotype 2 from a Sylvatic Lineage Isolated from a Patient with Dengue Hemorrhagic Fever." *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(4): e423.
19. Carvalho-Leandro D, Ayres CFJ, Guedes DRD, Suesdek L, Melo-Santos MAV, Oliveira CF, Cordeiro MT, Regis LN, Marques ET, Gil LH and Magalhaes T. "Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2." *Acta Tropica.* 2012; 124: 113– 119.
20. Castro MG, de Nogueira FB, Nogueira RM, Lourenço-de-Oliveira R, Dos Santos FB. Genetic variation in the 3' untranslated region of dengue virus serotype 3 strains isolated from mosquitoes and humans in Brazil. *J. Virol.* 2013;10(1):3.
21. Castro MG, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenço-de-Oliveira R. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 809-814.
22. Causey OR; Theiler M. Virus antibody survey on sera of residents of the Amazon valley in Brazil. *Revista Serviços Especiais de Saúde Pública.* 1962; v.12, n.1, p.91-101.
23. Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17 (1): 132-4.

24. Centers for Disease Control and Prevention. Division of Vector-Borne Infectious Diseases. Dengue Fever. Atlanta: CDC, 2008. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/dengue/> >. Acesso em: 6 jan 2014.
25. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol.* 1990; v.44, p.649-688.
26. Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses.* 2011; 3(9):1562-608.
27. Christophers SR. *Aedes aegypti* (L): The Yellow Fever Mosquito. Cambridge University Press, London.1960; 739pp.
28. Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.* 2006; 80(5):2170-82.
29. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006; v.80, n.23, p.11418-31.
30. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005; 79: 853-859.
31. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J. Virol.* 2003, 77, 3929–3938.
32. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro. 1994; 228 pp.
33. Degallier N. "Estudos Experimentais sobre Competência Vetorial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para os Vírus da Dengue e Febre Amarela." Informe Epidemiológico do SUS.2001; 10((Supl. 1)): 9-11.
34. Degallier N, Teixeira JMS, Soares S da Silva, Pereira RD, Pinto SCF, Chaib, A de Jesus M, Vasconcelos PFC, Oliveira E. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. *Rev. Saude Publ.* 2003; 37:386-387.
35. Diallo M. et al. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* London. 2008; v. 102, n. 5, p. 493-498.
36. Donalísio MRC O enfrentamento de epidemias: as estratégias e perspectivas do controle do dengue. Campinas. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas.1995.
37. Failloux AB, Vazeille MandRodhain F. "Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*." *J Mol Evol.*2002; 55: 653-663.

38. Figueiredo LTM, Fonseca BAL. Dengue. In R Veronesi, R Focaia, (organizadores), Tratado de Infectologia, Atheneu. Editora São Paulo. 1996, p. 231-404.
39. Filomatori CV, Iglesias NG, Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik AV. RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *J Biol Chem*. 2011 Mar 4; 286(9): 69229 – 39.
40. FNS, Fundação Nacional de Saúde. Dengue - Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor: Manual de Normas Técnicas. MS, Brasília, 3 edição, Abril(2001).
41. Forantinni OP. Culicidologia médica. 2. ed. Edusp : São Paulo. 2002. 864 p.
42. Franco L, Palacios G, Martinez JA, Vazquez A, Savji N, De Ory F, Paz M, Martin D, Lipkin WI and Tenorio A. "First Report of Sylvatic DENV-2-Associated Dengue Hemorrhagic Fever in West Africa." *PLoS Negl Trop Dis.*, 2011; 5(8): e1251.
43. Gamarnik AV. In *Frontiers in Dengue Virus Research* (Hanley KA, Weaver SC eds) Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2010; pp. 55–78.
44. Gebhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*. 2011 Sep; 3(9): 1739 – 56.
45. Gubler DJ. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11(3): 480.
46. Gubler DJ, Kuno G (eds). *Dengue and dengue and hemorrhagic fever*, CAB International, New York. 1997; 478 pp.
47. Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(3): 442-449.
48. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8 (Suppl.): S7-S16.
49. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vasquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis*. 2002; v.6, p.118-24.
50. Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno, L, Strauss EG, Strauss JH. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol*. 1987; v.198, p.33-41.
51. Halstead SB. Dengue Virus-Mosquito Interactions. *Annu Rev Entomol*. 2008; 53: 273 -91.
52. Halstead SB. Epidemiological aspects of dengue and chikungunya infections. *Proceedings of the Conference on the Pathogenesis of Arboviral infections*. 1971; Vol1: 33-67.

53. Halstead, SB. The XXth Century Dengue Pandemic: need for surveillance and research. *World Health statistics Quarterly*. 1992; 45: 292-298.
54. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg*. 1974; 23(5):974-82.
55. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960; 131(3407):1102-3.
56. Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL and Vasilakis N. "Fever versus Fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus." *Infect Genet Evol* Article in press. 2013.
57. Hanley KA, Nelson JT, Schirtzinger EE, Whitehead SS, Hanson CT. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. *BMC Ecol*. 2008; 8:1.
58. Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD and Reeves WC. "Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses." *Ann Rev Entomol*. 1983; 28: 229-262.
59. Higgs S, Beaty BJ. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: Marquardt, W.C. (Ed.). *Biology of disease vectors*. Waltham: Elsevier Academic, 2005. p. 167-185.
60. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003; 3(1): 19 - 28.
61. Holmes EC. Molecular epidemiology of dengue virus – the time for big science. *Trop Med Int Health*. 1998; 3(11): 855-6.
62. Hulbur HS 1966. Mosquito salivation and virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 15(6):989-999.
63. Hurrelbrink RJ, McMinn PC. Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation. *Adv Virus Res*. 2003; 60:1-42. Review. PubMed PMID: 14689690.
64. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*. 1978; 40(3):531-44.
65. 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.
66. King C, Chao D, Chien L, Chang G, Lin T, Wu Y, Huang J. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *J Virol*. 2008; 5:63.

67. Klungthong C, Putnak R, Mammen MP, Li T, Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J Virol Methods*. 2008 Dec; 154 (1-2): 175-81.
68. Kramer LD, Hardy JL and Presser SB. "Effect of temperature of extrinsic incubation on the vector competence of *Culex tarsalis* for western equine encephalomyelitis virus." *Am J Trop Med Hyg*. 1983; 32(5): 1130-1139.
69. Kyle J, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*. 2008; 62:71-92.
70. Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, Scott TW. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BCM Evol. Biol*. 2009; 9: 160.
71. Lambrechts L, Failloux AB. Vector biology prospects in dengue research. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec; 107 (8):1080-2.
72. Lambrechts L, Thanyalak F, Pongsiri A, Thaisomboonsuk B, Klungthong C, Richardson JH, Ponlawat A, Jarman RG and Scott TW. "Dengue-1 Virus Clade Replacement in Thailand Associated with Enhanced Mosquito Transmission." *J Virol*. 2012; 86(3): 1853–1861.
73. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(3):545-51.
74. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*. 1997; v.78, p.2279-86.
75. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent, D. W. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. 1994; v.75, p.65-75.
76. Lavergne A, Lacoste V, Germain A, Matheus S, Dussart P, Deparis X and Thoisy B. "Infection par le virus de la dengue de mammifères sauvages en région néotropicale: hôtes accidentels ou réservoirs potentiels?" *Med Trop*. 2009; 69: 345-350.
77. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, De Chacon-Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J Virol*. 1999; v.73, p.4738-47.
78. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS et al. - Phylogenetic relationship of dengue-2 viruses. *Virology*. 1993; 197: 216-224.
79. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101-33.
80. Lounibos LP. Invasions by insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol*. 2002; 47: 233- 266.

81. Lourenço-de-Oliveira R, Castro MG, Braks M, Lounibos LP. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J Vect Ecol.* 2004; 29: 94-100.
82. Lourenço-de-Oliveira R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias, pp. 75-97. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Volume I.* Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2005; 1132pp.
83. Lourenço-de-Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, Silva WC, Leite PJ, Nogueira RMR. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, state of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 799-800.
84. Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69 (1):105-14.
85. Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004b; v. 98, n. 1, p. 43-54.
86. Lozach PH, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Despres P, Arenzanas de los Angeles F, Amara A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)- mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *Biol Chem.* 2005; 280: 23698-23708.
87. Lozano-Fuentes S et al. The Neovolcanic Axis Is a Barrier to Gene Flow among *Aedes aegypti* Populations in Mexico That Differ in Vector Competence for Dengue 2 Virus. *PLoS neglected tropical diseases, San Francisco.* 2009; v. 3, n. 6, p. e468.
88. Luz PM, Codeço CT, Massa E, Struchiner CJ. Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Oct; 98(7):871-8.
89. Maciel-de-Freitas R, Brocki-Neto RW, Gonçalves JM, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R. Movement of dengue vectors between human modified environment and an urban Forest in Rio de Janeiro. *J Med Entomol.* 2006, 43: 1112-1120.
90. Maciel-de-Freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Apr; 76(4):659-65.

91. Maciel-de-Freitas R, Koellab JC, Lourenco-de-Oliveira R. "Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2011; 105: 452-458.
92. 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 Jun 3; 8(6):e65252.
93. Mahmood S. Dengue: an epidemic is largely a failure in public health administration! The Role of Dhaka City Corporation, DCC of Bangladesh. World Health & Population, 2005. Disponível em: <http://www.longwoods.com/product.php?productid=17900> Acessado em: 05/03/2014.
94. Mandl CW, Holzmann H, Kunz C, Heinz FX. Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. Virology. 1993; v.194, p.173-84.
95. Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, Heinz FX. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. J Virol. 1998 Mar; 72 (3): 2132 – 40.
96. Marquardt, W. C. Biology of disease vectors. 2nd. ed.: Academic press (st). 2004.
97. McSherry JA. Some medical aspects of the Darien scheme: was it dengue? Scottish Med J. 1982; 27: 183- 4.
98. Men R, Bray M, Clark D, Chanock R, Lai C. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: Analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. J Virol. 1996; 70: 3930–3937.
99. Miagostovich M, dos Santos F, Fumian T, Guimarães F, da Costa E, Tavares F, et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(3):307-13.
100. Miagostovich MP, Serqueira PC, dos Santos FB, Maia A, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Harris E, Riley LW. Molecular typing of dengue virus type 2 in Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2003; 45(1): 17 – 21.
101. Miller BR, Ballinger ME. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: Vector competence for yellow fever and dengue viruses. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1988; 82(3): 476-477.
102. Miller JL, deWet BJM, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. Plos Pathog. 2008 Feb 8; 4(2): e17.

103. Miller S, Romero-Brey I, Bartenschlager R. The Dengue Virus Replication Complex. In: Hanley KA, Weaver SC, editors. *Frontiers in Dengue Virus Research*. 1^a ed: Caister Academic Press; 2010. p. 35-53.
104. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004; v.427, p.313-9.
105. Murgue, B. et al. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *Journal of Medical Virology Honolulu*. 2000; v. 60, n. 4, p. 432-438.
106. Nguyen NM , Kien DTH, Tuan TV, Quyen NTH, Tran CNB, Thi LV, Thi DL, Nguyen HL , Farrar JJ, Holmes EC , Rabaa MA, Bryant JE, Nguyen TT , Nguyen HTC, Nguyen LTH, Pham MP, Nguyen HT, Luong TTH, Wills B, Nguyen CVV , Wolbers M and Simmons CP. "Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(22): 9072–9077.
107. Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(3):255-6.
108. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990; 85(2):253.
109. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect*. 1993.
110. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, de Souza LJ, Guimarães FR, de Araújo ES, De Simone TS, et al: Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11:1376–1381.
111. Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MF, Farias Filho JD. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988; 83(2):219-25.
112. Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991; 86(2):269.
113. Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007; 22:358-363.

114. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 925-926.
115. Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, De Souza LJ, Guimaraes FR, De Araujo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira JR, Miagostovich MP. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. Emerg Infect Dis. 2005; v.11, n.9, p.1376-81.
116. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Araújo ESM, Santos FB, Filippis AMB, et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986–1998. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(3):297–304.
117. Osanai CH, Travassos-da-Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos ADC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Ver Inst Med Trop de São Paulo. 1983; 23: 53-54.
118. PAHO. Number of reported cases of dengue & dengue haemorrhagic fever (DHF), region of the Americas 2002 (by country and subregion) [Internet]. PAHO. 2002. [cited 2003]. Available from: <http://www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2002.htm>.
119. Pankhong P, Weiner DB, Ramanathan MP, Nisalak A, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Attatipaholkun W. Molecular genetics relationship of the 3' untranslated region among Thai dengue-3 virus, Bangkok isolates, during 1973 – 2000. DNA Cel Biol. 2009 Oct; 28 (10):481 -91.
120. Pedro AO. Dengue em Nicteroy. Brasil-Médico. 1923; 1: 173-177.
121. Pepin KM, Lambeth K, Hanley KA. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. BMC Microbiol. 2008; 8:28.
122. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. Current Opinion in Microbiology. 2008; v. 11, p. 369-377.
123. Peyrefitte CN, Couissinier-Paris P, Mercier Perennec V, Bessaud M, Martial J, Kenane N, Durand JP, Tolou HJ. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). J Clin Microbiol. 2003; 41: 5195-5198.
124. Proutski V, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. Nucleic Acids Res. 1997; v.25, n.6, p.1194-1202.
125. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108 Suppl 1:11-7. doi: 10.1590/0074-0276130395.
126. Repik PM, Dalrymple JM, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32(3): 577 – 589.

127. Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized sersool cuticle. BMC Develop Biol. 2008; 8: 82.
128. Richardson J, Molina-Cruz A, Salazar MI and Black WIV. "Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*." Am J Trop Med Hyg. 2006; 74(1): 132–141.
129. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. Adv Virus Res. 2003; 59:315-41.
130. Rico-Hesse, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. Virology. 1990; 174(2):479-93.
131. Rodenhuis-Zybert, IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. Cell Mol Life Sci. 2010; v. 67, n. 16, p. 2773-86.
132. Rodriguez-Roche R, Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. Biomed Res Int. 2013; 2013:690835.
133. Rutledge LC, Ward RA and Gould DJ. "Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder." Mosquito News. 1964; 24(4): 407-419.
134. Romoser WS, Wasieloski LP Jr, Pushko P, Kondig JP, Lerdthusnee K, Neira M, Ludwig GV. Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. J Med Entomol. 2004, 41 (3): 467-75.
135. Rosen L, Gubler DJ. The use of Mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. Am J Trop Hyg. 1974; 23(6): 1153 – 1160.
136. Sabin AB. Research on dengue during World War II. Am J Trop Hyg. 1952; 1: 30-50.
137. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE and Beaty BJ 2007. "Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes." BMC Microbiology. 2007; 7(9): 1-13.
138. Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AW, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. PLoS Pathog. 2009; 5(2):e1000299.
139. Santos MAV de M. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Estudos populacionais e estratégias integradas de controle vetorial em municípios da região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007. Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

140. Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos Da Rosa APA. Na outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81: 245-246.
141. Shi PY, Tilgner M, Lo MK. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. Virology. 2002; 296: 219 - 33.
142. Shurtleff AC, Beasley DWC, Chen JJY, Ni M, Suderman MT, Wang H, Xu R, Wang E, Weaver SC, Watts DM, Russel KL, Barrett ADT. Genetic variation in the 3' Non-coding region of dengue viruses. Virol Mar 1. 2001; 281(1): 75-87.
143. Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. Philipp J Sci. 1926; 29:1-304.
144. Silva Jr JB. Dengue: Situação e perspectivas [Internet]. Brasília: SVS/MS. 2013. [cited 2013]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2b_2013_abril.pdf.
145. Silva Jr JB & Pimenta JFG. Epidemiologia da dengue. In: Sousa, LJ. Dengue - diagnóstico, tratamento e prevenção. 2. ed. 2008; Rio de Janeiro: Ed: Rubio , p.11-35.
146. Silva RLA, Silva AM, Harris E, Macdonald GH. Genetic analysis of Dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions. Virus Res. 2008; v.135, p.320-25.
147. Simmons JS, John ST, Reynolds FHK. Experimental studies of dengue. Philipp. J. Sci. 1931; 44:1.
148. Siqueira Júnior JB, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 48-53.
149. Sylla M, Bosio C, Urdaneta-Marquez L, Ndiaye M, Black IV WC. Gene flow, subspecies composition, and dengue virus-2 susceptibility among *Aedes aegypti* collections in Senegal. Plos Negl Trop Dis. 2009; (3): 1-14.
150. SVS/MS. Informe Epidemiológico da Dengue Janeiro a Novembro de 2008 [Internet]. SVS/MS. 2008b. [cited 2009]. Available from: <http://www.combateadengue.com.br/wpcontent/uploads/2009/02/boletim-janeiro-novembro-2008.pdf>.
151. SVS/MS. Nota técnica nº 118/2010 – Identificação de Áreas de Maior Vulnerabilidade para Ocorrência de Dengue no período de Transmissão 2010/2011 com vistas a subsidiar a intensificação das ações de controle. Brasília. 2010; p. 1-12.
152. SVS/MS. Situação Epidemiológica [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2013. [cited 2013]. Available

from:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525.

153. Tabachnick WJ. "Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in Mosquito Arbovirus Transmission Competence." *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013;10(1): 249-277.
154. Tabachnick WJ, Powell JR. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genet Res*. 1979 Dec; 34(3):215-29.
155. Tan SY, Sung H. "Carlos Juan Finlay (1833-1915): of mosquitoes and yellow fever". *Singap. Med. J. Singapore*. 2008; 49 (5): 370–1.
156. Teixeira M G, Costa MC, Coelho G, Barreto ML. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14 (10): 1663.
157. Thoisy B, Dussart P and Kazanji M. "Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana." *Trans R Soc Trop Med*. 2004; 98: 409-412.
158. Thoisy BD, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán JL, Colón C, Mauffrey JF, Delaval M, Catzeflis F, Kazanji M and Matheus S. "Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals." *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008; 9: 157-170
159. Trent, DW et al. The molecular epidemiology of dengue viruses: Genetic variation and microevolution. *Appl Virol Res*.1990; 2: 293-315.
160. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007; 3:e201.
161. Urcuqui-Inchima S, Patino C, Torres S, Haenni AL, Diaz FJ. Recent developments in understanding dengue virus replication. *Adv Virus Res*. 2010; v. 77, p. 1-39.
162. Vasilakis N, Hanley KA, Weaver SC. Dengue Virus Emergence from its Sylvatic Cycle. In: Hanley KA, Weaver SC, editors. *Frontiers in Dengue Virus Research*. 1^a ed. USA: Caister Academic Press; 2010. p. 183-217.
163. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*. 2008; v.72, p.1-76.
164. Vasilakis N. The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia. 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever; Bangkok, Thailand 2013.

165. Vaughn DW et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *Journal of infectious diseases*, Chicago. 2000; v. 181, n. 1, p. 2-9.
166. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq JS, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux AB. Two *chikungunya* isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*. 2007; 2:e1168.
167. Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E and Failloux AB. "Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia." *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60(2): 292-299.
168. Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik. A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *RNA*. 2010 Dec; 16(2): 2325-35.
169. Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik. Differential RNA sequence requirement for dengue virus replication in mosquito and mammalian cells. *J. Virol.*2013; 87(16):9365-72
170. Wallner G, Mandl C, Kunz C, Heinz FX. The flavivirus 3'-non-coding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1995; v.213, p.169-78.
171. Wang E, H Ni, Xu R, Barrett ADT, Watowich SJ, Gubler DJ, and Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.*2000; 74:3227-3234.
172. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009; 9(4):523-40.
173. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 2009; 5(4):365-75.
174. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JE, Russell PK, Trent DW. *Flaviviridae*. *Intervirology*. 1985; 24: 183-192.
175. WHO. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases, Pages 140. Geneva
176. Wilson, M. E.; Chen, L. H. Dengue in the Americas. *Dengue Bull*. 2002; v.26, p.44-61.

177. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*. 2002; 301: 148-156.
178. Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ. *Biology of Disease Vectors*. In Marquardt WC, Beaty BJ, editores. Natural cycles of vector-borne pathogens. Colorado: University Press of Colorado. 1996; 51–72.
179. Yazi-Mendoza M, Salas-Benito JS, Lanz-Mendoza H, Nernández-Martínez S, del Angel RM. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67: 76-84.
180. You S, Padmanabhan RA. Novel in vitro replication system for dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3' end of exogenous viral RNA templates requires 5' and 3' terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J. Biol. Chem.* 1999; v. 274, p. 33.714–22.
181. Yu I-M, et al. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol*. 2009; 83(23):12101–12107.
182. Yu L, Markoff L. The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence. *J. Virol.* 2005; v. 79, p. 2.309–24.
183. Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(2):548-53.
184. Zhang M, Zheng X, Wu Y, Gan M, He A, Li Z, Liu J and Zhan X. "Quantitative Analysis of Replication and Tropisms of Dengue Virus Type 2 in *Aedes albopictus*." *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(3): 700–707.
185. Zhou Y, Mammen PJr, Klungthong C, Chinnawirotpisan P, Vaughn DW, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes EC, Zhong C. Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3'-untranslated region of dengue viruses and disease syndrome. *J GenVirolSep* 2006; 87(9): 2595-2603.