

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Aires Januário Fernandes da Moura

**Avaliação da competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago,
Cabo Verde, a diferentes sorotipos do vírus Dengue**

RECIFE

2014

Aires Januário Fernandes da Moura

**Avaliação da competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago,
Cabo Verde, a diferentes sorotipos do vírus Dengue**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes

Co-orientadora: Dra. Maria Alice Varjal De Melo Santos

Recife

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- M929a Moura, Aires Januário Fernandes.
Avaliação da competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a diferentes sorotipos do vírus Dengue / Aires Januário Fernandes da Moura. - Recife: s. n, 2014.
65 p. : ilus.
- Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.
- Orientadores: Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes, Maria Alice Varjal de Melo Santos.
1. Vírus da Dengue. 2. *Aedes*. 3. Insetos Vetores. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 5. Cabo Verde. 1. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. III. Título.

CDU 616.928

Aires Januário Fernandes da Moura

**Avaliação da competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago,
Cabo Verde, a diferentes sorotipos do vírus Dengue**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 21/01/2014

Banca Examinadora

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes (orientadora)
CPqAM- Fiocruz

Dra. Maria Cynthia Braga (Titular interno)
CPqAM- Fiocruz

Dra. Marli Tenório Cordeiro (Titular externo)
CPqAM- Fiocruz

Dedico este trabalho a minha mãe, Julieta, e ao meu Pai, Januário.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Constância Ayres e Maria Alice Varjal, por todos os ensinamentos e amizade.

À Doutora Lara Gomez, por ter acreditado na investigação em Cabo Verde e ter promovido a cooperação internacional entre a Universidade Jean Piaget de Cabo Verde e a Fiocruz que permitiu a realização deste projeto.

Aos alunos do grupo de investigação GIDTPiaget da Universidade Jean Piaget de Cabo verde, pela contribuição na coleta dos ovos de *Aedes aegypti*.

À Duschinka Guedes e Danilo Carvalho pelos ensinamentos, ajuda nas dissecções e amizade.

Às minhas amigas do insetário, Ana Lúcia, Andréia, Tatiane Cibele, Mércia Cristiane, Rose, Ana Paula, Elisângela e Mônica Crespo, pelo suporte no estabelecimento da população de *Aedes aegypti* de Cabo Verde no Brasil e pelos bons momentos de convivência.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório, Renato, Marcelo e Norma pelo suporte no laboratório e pelas boas risadas.

Aos meus amigos Hélio, Livia, Taty Romão, Morgana, Amanda, Elisama, Alessandra, Mariana, Eloína, Suzany, Natalie, Taty Alexandre, Bárbara, Diego Felipe, Emanuel, Suzane Alves, Lígia, Lêda, Claudia, Clara, Maria Helena, Priscilla, Rosângela e Rafael pelo companheirismo, bons momentos de descontração e por fazerem-me sentir em casa.

Ao pessoal do LAVITE, Verônica Gomes, Priscila Castanha, Tereza Magalhães e Laís Rodrigues pelas contribuições nos experimentos de titulação.

Ao Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) e LAVITE do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- Fiocruz PE, pela disponibilização da infraestrutura e equipamentos, sem os quais seria impossível a realização do projeto.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

“Pesquisar é ver o que outros viram, e pensar o que nenhum outro pensou.”

Albert Szent-Gyorgyi

MOURA, Aires Januário Fernandes. **Avaliação da competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a diferentes sorotipos do vírus Dengue.** 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus Dengue (DENV), cujos principais vetores são os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. *A. aegypti* é o único vetor de DENV em Cabo Verde, país que teve a sua primeira epidemia da dengue registrada em 2009. Contudo, pouco se sabe acerca da variação no nível de competência vetorial das populações do vetor aos diferentes sorotipos de DENV. O estudo teve como objetivo avaliar a competência vetorial de *A. aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a quatro sorotipos de DENV. Para isso, os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue contendo diferentes sorotipos de DENV, e em seguida dissecados ao 7º, 14º e 21º dia após infecção (dpi) para verificar a presença do vírus no intestino, cabeça e glândulas salivares usando a técnica de RT-PCR. Adicionalmente, o número de cópias de RNA viral presente nas glândulas salivares foi determinado por qRT-PCR. Foram observadas altas taxas de infecção das glândulas salivares para DENV-2 e DENV-3 (65 e 75% respectivamente), enquanto que para DENV-1, o RNA viral só foi detectado no intestino e cabeça, não chegando a infectar as glândulas salivares. DENV-4 não disseminou para cabeça e glândulas salivares, mantendo a infecção apenas no intestino (9%). O número de cópias de RNA viral nas glândulas salivares não variou significativamente entre DENV-2 e DENV-3 e nem entre os diferentes períodos de incubação do vírus e títulos de DENV testados. Conclui-se, que a população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, possui alta competência vetorial para as cepas de DENV-2 e DENV-3 e são pouco susceptíveis para as de DENV-1 e DENV-4. As cópias de RNA viral nas glândulas salivares mantêm-se relativamente constante por 21 dias após a infecção, o que pode potencializar a capacidade vetorial de mosquito *A. aegypti* e sugere alguma forma de modulação da replicação do vírus nesse órgão.

Palavras chaves: Vírus da dengue (DENV); *Aedes*; Insetos vetores; Cabo Verde; PCR em tempo real.

MOURA, Aires Januário Fernandes. **Evaluation of Vectorial Competence of *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of Dengue virus.** 2014. Dissertation (Academic Master in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

Dengue is an arboviral disease caused by dengue virus (DENV), for which the main vectors are the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *A. aegypti* is the only DENV vector in Cape Verde, a country which suffered its first dengue outbreak in 2009. However, little is known about the variation in the level of vector competence of this mosquito population to the different DENV serotypes. The present study aimed to evaluate the vector competence of *A. aegypti* on the Island of Santiago, Cape Verde, to four DENV serotypes. For this, the mosquitoes were fed with blood containing different DENV serotypes, and then dissected at 7, 14 and 21 days post infection (dpi) to detect the virus in the midgut, head and salivary glands by RT-PCR. Additionally, copies of viral RNA present in salivary glands were determined by qRT-PCR. High rates of salivary gland infection were observed for DENV-2 and DENV-3 (65 and 75 %, respectively), while for DENV-1, the viral RNA was only detected in the midgut and head, but did not infect the salivary glands. DENV-4 didn't spread to the head and salivary glands, maintaining the infection only in the midgut (9%). The number of viral RNA copies in the salivary glands did not vary significantly between DENV-2 and DENV-3, nor between the different periods of incubation and the various titers of DENV tested. In conclusion, the population of *Aedes aegypti* on Santiago Island, Cape Verde, has high vector competence for DENV-2 and DENV-3 strains and is less susceptible to DENV-1 and DENV-4. Viral RNA copies in the salivary gland remained relatively constant for at least 21 days after infection, which may enhance the vector capacity of *A. Aegypti*, and suggests some form of modulation of virus replication in the salivary glands.

Keywords: Dengue virus (DENV); *Aedes*; Insect vectors; Cape Verde; Real Time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Número médio de casos de dengue reportados anualmente à Organização Mundial da Saúde de 1955- 2007 e número de casos recentes, 2008-2010.....	21
Figura 2- Zonas endêmicas e de risco para dengue.....	22
Figura 3- Dengue e mosquito <i>Aedes aegypti</i> na África.....	24
Figura 4- Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> e outros mosquitos em Cabo Verde.....	26
Figura 5- Genoma do vírus Dengue	27
Figura 6- Ilustração das diferentes fases do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 7- Potenciais barreiras de transmissão de arbovírus pelos mosquitos.....	35
Figura 8- Localização geográfica de Cabo Verde	38
Figura 9- Visualização dos aparatos utilizados para a alimentação sanguínea de mosquitos e a sua contenção em gaiolas teladas em infectório.....	41
Figura 10- Representação do gel de agarose contendo amostras de DNA correspondentes à região amplificada NS5 de DENV-1, DENV-2, DENV-3 E DENV-4	47
Figura 11- Quantificação do RNA de DENV-2 e DENV-3 nas glândulas salivares	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Títulos de DENV obtidos para cada sorotipo.....	48
Tabela 2- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-1..	48
Tabela 3- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-2.	49
Tabela 4- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-3..	50
Tabela 5- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-4.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC- 3-amino-9-etil-carbazol

CPqAM- Centro de pesquisas Aggeu Magalhães

DENV- Dengue virus (vírus Dengue)

dpi- dias pós infecção

FFU/ml- unidades formadoras de foco por mililitro

FHD- febre hemorrágica da dengue

SCD- síndrome de choque por dengue

GL- glândulas salivares

LAVITE- Laboratório de Virologia e Terapia Experimental

MEB- midgut escape barrier (barreira de “escape” do intestino)

MIF- Macrophage migration inhibitory factor (fator inibidor da migração de macrófagos)

MIB- midgut infection barrier (barreira de infecção do intestino)

MORENA- Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A.aegypti* a inseticidas

Proteínas NS (nonstructural)- proteínas não estruturais

PBS- phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)

PCR- Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase)

RNA- Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

RNAi- RNA de interferência

RT-PCR- Reverse transcriptase PCR (PCR da transcriptase reversa)

TNF α - Tumor necrosis factor

qRT- PCR- Quantitative reverse transcriptase PCR (PCR da transcriptase reversa quantitativa)

SIB- salivary gland infection barrier (barreira de infecção das glândulas salivares)

SSRNA- Single strand RNA (RNA de cadeia simples)

UTR- untranslated region (região não codificadora)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	16
3	PERGUNTA CONDUTORA	17
4	HIPÓTESE	18
5	OBJETIVOS	19
5.1	GERAL.....	19
5.2	ESPECÍFICOS	19
6	MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	20
6.1	DENGUE.....	20
6.1.1	Distribuição geográfica e incidência da dengue	21
6.1.1.1	Dengue na África.....	23
6.1.1.2	Dengue em Cabo Verde	25
6.1.2	Vírus Dengue (DENV)	27
6.1.2.1	Estrutura	27
6.1.2.2	Diversidade, ciclos de transmissão e evolução de DENV.....	29
6.1.3	O mosquito <i>A. aegypti</i> (Linneaus 1972)	31
6.1.3.1	Classificação em subespécies	32
6.2	INTERAÇÃO DENV-VETOR E COMPETÊNCIA VETORIAL	33
7	METODOLOGIA	38
7.1	ÁREA DE ESTUDO	38
7.2	PERÍODO DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	39
7.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	39
7.3.1	Propagação de DENV em células C6/36	39
7.3.2	Infecção oral dos mosquitos com o vírus Dengue	40
7.3.3	Determinação do título viral na mistura vírus/ sangue por ensaio de placa em células C6/36	41
7.3.4	Dissecção dos mosquitos e extração de RNA total	42
7.3.5	Determinação das taxas de infecção por RT- PCR One Step convencional.	43
7.3.6	Síntese dos padrões de DENV para a RT-PCR quantitativa (qRT- PCR)	43
7.3.7	RT-PCR quantitativa (qRT- PCR)	44
7.4	ANÁLISE DOS DADOS	45
8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	46
9	RESULTADOS	47

9.1	PADRÃO DE BANDAS DA RT-PCR ONE-STEP.....	47
9.3	INFECÇÃO DOS MOSQUITOS COM DENV-1	48
9.4	INFECÇÃO COM DENV-2	49
9.5	INFECÇÃO COM DENV-3	49
9.6	INFECÇÃO COM DENV-4	50
9.7	QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL.....	50
10	DISCUSSÃO	52
11	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das doenças veiculadas por vetores de maior importância a nível global. Atualmente é estimado que 3,6 bilhões de pessoas vivem em áreas tropicais e subtropicais onde é endêmica, ocorrendo anualmente cerca de 50 a 200 milhões de infecções, 500 mil casos de dengue grave (Febre Hemorrágica da dengue- FHD) e mais de 20.000 mortes (GUBLER, 2012; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013).

A doença é causada pelo vírus Dengue (DENV), um vírus de RNA que é transmitida ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (GUZMAN et al., 2010). Os diferentes sorotipos de DENV evoluíram em primatas não humanos a partir de um ancestral comum e cada um entrou, independentemente, no ciclo urbano há cerca de 100-1500 anos atrás (WANG et al., 2000). Apesar do vasto conhecimento do vírus e da grande importância epidemiológica da dengue, atualmente não existem terapias antivirais específicas, nem vacinas comercialmente disponíveis contra todos os sorotipos de DENV.

Aedes aegypti é o principal vetor de DENV na maioria dos países onde a dengue é endêmica. Este mosquito teve sua origem no continente africano, mas atualmente encontra-se largamente distribuído, tendo sido registrado em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Austrália, Pacífico Sul, Américas e algumas partes do Oriente Médio (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HIGA, 2011). Segundo Gubler (1998), o aumento da distribuição geográfica de *Aedes aegypti* tem sido a principal causa da expansão da dengue no mundo. Deste modo, o controle e monitoramento desse vetor é essencial para o controle da doença (BROWN, 2013).

As populações naturais de *A. aegypti* mostram extensa variação genética, o que de certa forma determina vários graus de susceptibilidade ao vírus Dengue (BEHURA et al., 2011). A habilidade de o vetor ser infectado por um agente patogênico, permitir a sua replicação e transmiti-lo a outro hospedeiro é denominada competência vetorial (BENNETT et al., 2002). Ela é influenciada principalmente pela variabilidade genética do vetor e do agente patogênico, porém, é por vezes modulada por fatores ambientais (COX; BROWN; RICO-HESS, 2011; LAMBRECHTS et al., 2011; MERCADO-CURIEL; BLACK; MUNOZ, 2008).

A variação na competência vetorial de *A. aegypti* ao vírus Dengue (DENV) que é observada em diferentes ambientes naturais tem implicações na transmissão do vírus e na

epidemiologia da dengue. Portanto, o seu estudo é importante para o planejamento de ações de prevenção e desenvolvimento de novas estratégias de controle da transmissão (COX; BROWN; RICO-HESSE, 2011).

Atualmente, quatro sorotipos de DENV (DENV1-4) circulam no continente africano, sendo que a maioria das epidemias tem sido causada por DENV-2 seguida de DENV-1 (SANG, 2006). Em 2009 ocorreu a primeira epidemia de dengue em Cabo Verde, arquipélago situado a 500 km da Costa Ocidental Africana. Durante a epidemia, foram diagnosticados mais de 20.000 casos, dentre os quais 174 foram do tipo FHD e quatro foram a óbito (CABO VERDE, 2010). A epidemia foi causada por uma cepa de DENV-3, que possivelmente terá vindo de países vizinhos da Costa Ocidental africana (FRANCO, 2010).

A presença de *A. aegypti* em Cabo Verde foi registrada desde 1931 (ALVES et al., 2010; RIBEIRO et al., 1980), não havendo registros de outras espécies de *Aedes*, como por exemplo, *A. albopictus*, que pudessem estar implicadas na transmissão. Contudo, pouco se sabe acerca do nível de competência vetorial das populações locais de *A. aegypti* ao DENV. O estudo de Vazeille *et al.* (2013), mostrou que a população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, tem uma habilidade moderada para transmitir a cepa de DENV-3 responsável pela epidemia de 2009, mas é pouco susceptível ao DENV-2 isolada em 1974 na Tailândia. No entanto, não existem estudos de avaliação da competência vetorial relativamente aos outros sorotipos de DENV.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a competência vetorial da população de *A. aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a quatro sorotipos do vírus Dengue, usando como ferramenta a RT-PCR.

2 JUSTIFICATIVA

A dengue tem causado anualmente milhares de mortes. Em 2012, foi classificada pela Organização Mundial da Saúde como sendo a doença viral transmitida por vetores com maior fator de transmissão, existindo o risco de no futuro se tornar uma pandemia.

A expansão da dengue nos últimos anos tem estado associada principalmente ao aumento da distribuição geográfica e densidade populacional dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Por outro lado, o controle da transmissão de DENV tem sido dificultado pela inexistência de vacinas e imunoterápicos específicos contra o vírus. Desta forma, a principal estratégia de prevenção da transmissão do vírus Dengue nas populações humanas tem sido os programas de monitoramento e controle dos mosquitos vetores.

O nível de competência vetorial das populações naturais de *A. aegypti* aos diferentes sorotipos de DENV está fortemente associado à variabilidade genética do mosquito e do vírus. Por isso, tem sido considerada uma característica relevante para o entendimento da dinâmica de transmissão nos diferentes contextos geográficos e permitirá acessar o risco de futuras epidemias de dengue. Adicionalmente, o estudo dos fatores genéticos que modulam a competência vetorial permitirá compreender melhor o processo de interação entre o vírus e o vetor, e assim poderá possibilitar a concepção de novas estratégias de controle da doença, como a criação de mosquitos transgênicos refratários ao vírus.

Cabo Verde pertence ao grupo dos 34 países africanos onde a dengue é endêmica. Em 2009 ocorreu nesse país uma grande epidemia, supostamente causada por uma cepa de DENV-3, presente na Costa Ocidental Africana desde 2006. Em Cabo Verde, os programas de monitoramento e controle do *A. aegypti* se encontram em fase inicial, não havendo, portanto, conhecimento acumulado sobre a distribuição, densidade e competência vetorial da população local que possa estimar o risco de transmissão.

Nesse sentido, é de grande relevância avaliar a competência vetorial dos mosquitos *A. aegypti* de Cabo Verde a diferentes sorotipos de DENV.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o nível de competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a diferentes sorotipos do vírus Dengue?

4 HIPÓTESE

A população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago possui competência vetorial para transmitir quatro sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4).

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Avaliar a competência vetorial da população de *A. aegypti* da ilha de Santiago a quatro sorotipos do vírus Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4).

5.2 ESPECÍFICOS

- a) Investigar o processo de replicação viral dos diferentes sorotipos de DENV no intestino, cabeça e glândulas salivares do mosquito *A. aegypti*;
- b) Quantificar o RNA viral presente nas glândulas salivares de mosquitos infectados;
- c) Comparar as taxas de infecção do intestino, de disseminação e infecção das glândulas salivares dos diferentes sorotipos de DENV;
- d) Comparar o número de cópias de RNA viral dos diferentes sorotipos DENV;

6 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

6.1 DENGUE

A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus Dengue, transmitida ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* Linnaeus, 1752 e *A. albopictus* Skuse, 1894. A infecção pelo DENV pode levar a um amplo espectro de manifestações clínicas ou a infecção pode progredir sem sintomas (GIBBONS; VAUGHN, 2002; GUBLER, 1998). Estes sintomas enquadram-se dentro das formas clínicas designadas por febre clássica da dengue e febre hemorrágica de dengue (FHD) / síndrome de choque por dengue (SCD). No caso da febre clássica da dengue, os principais sintomas são dor de cabeça, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, erupções cutâneas, manifestações hemorrágicas e leucopênia, enquanto que a forma hemorrágica/ síndrome de choque por dengue (SCD), é caracterizada pelo aparecimento rápido de extravasamento capilar, acompanhada de trombocitopenia, quadros hemorrágicos como sangramento da mucosa e do trato gastrointestinal e danos ao fígado indicado pelo aumento da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (HALSTEAD, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Os primeiros relatos de doenças compatíveis com a dengue encontram-se na enciclopédia chinesa intitulada “Sintomas de doenças e os remédios” publicada pela primeira vez durante a dinastia Chin (ano 265-420 D.C) e formalmente editada nas dinastias Tang e Sung, em 610 e 992 D.C, respectivamente. A doença foi chamada de veneno da água pelos chineses e associavam-na com insetos que viviam neste meio (GUBLER, 1998).

Outros possíveis registros de dengue incluem surtos nas Antilhas francesas em 1635 e no Panamá em 1699. No entanto, os primeiros registros mais plausíveis são de 1779 e 1780, quando epidemias ocorreram na Ásia, África e América do Norte (BHATTACHARYA *et al.*, 2013; GUBLER, 1998). De 1844 a 1849, foram relatados casos semelhantes a dengue nas Américas, incluindo Brasil, e em 1918 ocorreram casos semelhantes no Peru, e de 1926 a 1928 nas Caraíbas, Sul dos Estados Unidos, Colômbia e México (SCHATZMAYR, 2008. p. 20-30).

Em 1906, foi confirmada a transmissão da dengue pelo mosquito do gênero *Aedes* e em 1907 foi demonstrado ser causada por um vírus, o vírus Dengue (GUBLER, 2006). O sorotipo DENV-1 foi primeiramente isolado de soldados que adoeceram no Hawai, Índia e

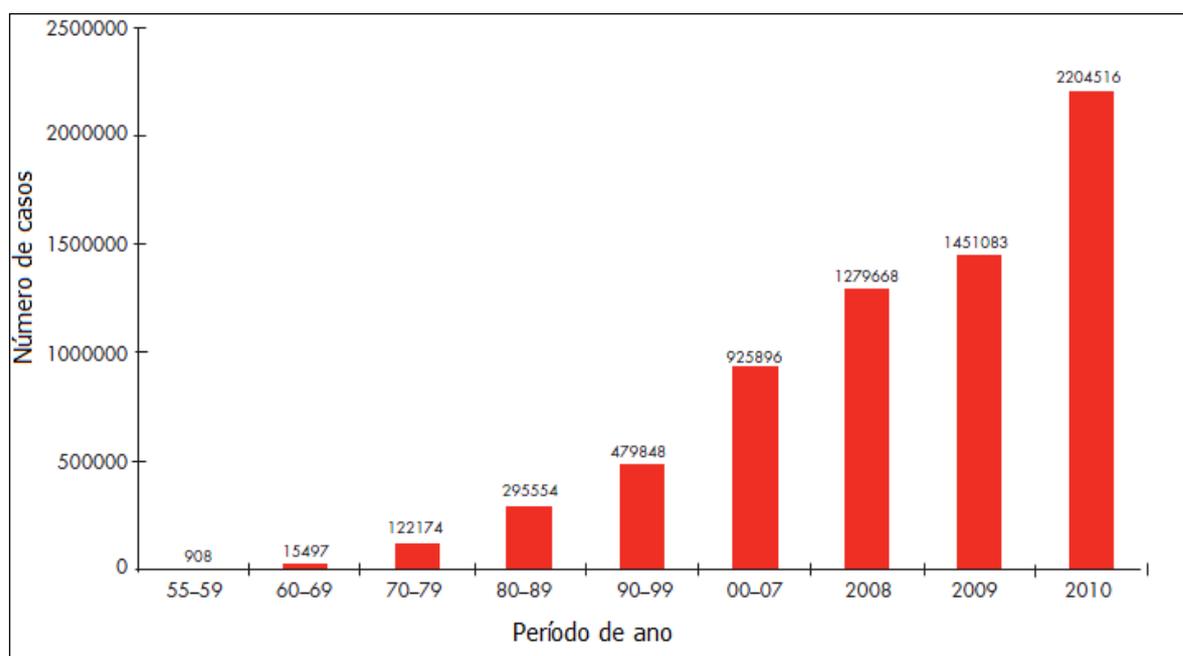
Nova Guiné. Três cepas de DENV-2 foram primeiramente isoladas em Nova Guiné e os sorotipos DENV-3 e DENV-4 foram isolados em 1956 de pacientes com febre hemorrágica nas Filipinas (ELDRIDGE; EDMAN, 2003).

Em Outubro de 2013 foi anunciado na 3ª Conferência Internacional de Dengue e Febre Hemorrágica, em Bangkok, o descobrimento de um novo sorotipo, designado por DENV-5. O vírus foi isolado em um surto ocorrido no estado de Sarawak, Malásia, em 2007 e tinha sido incorretamente identificado como DENV-4. Mais tarde, o sequenciamento do genoma do vírus por Nikos Vasilakis e colaboradores determinou que o vírus é filogeneticamente distinto dos quatro sorotipos já conhecidos e que os anticorpos induzidos em macacos e seres humanos diferem significativamente daqueles induzidos pelos demais sorotipos. Para os mesmos autores, este sorotipo possivelmente está circulando já a algum tempo entre os macacos, nas florestas de Sarawak na Malásia (NORMILE, 2013).

6.1.1 Distribuição geográfica e incidência da dengue

Até ao século XIX, a dengue era considerada uma doença esporádica que causava epidemias em intervalos longos, no entanto, nos últimos 50 anos, o número de casos aumentou drasticamente (Figura 1), tornando-se a doença viral transmitida por mosquitos de maior importância no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012b).

Figura 1- Número médio de casos de dengue reportados anualmente à Organização Mundial da Saúde de 1955-2007 e número de casos recentes, 2008-2010.



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2012b)

Segundo Gubler (1998), a emergência da dengue está associada ao aumento da distribuição e densidade do principal vetor, *A. aegypti*, resultante da urbanização não controlada, aumento de viagens entre países, controle não efetivo em áreas endêmicas e decaimento das infraestruturas de saúde pública nos últimos 30 anos.

A dengue é endêmica em vários países da Ásia, região do Pacífico, África e América Latina (Figura 2), onde é estimado que 3,6 bilhões de pessoas vivem em risco de contrair a doença (GUBLER, 2012). Dados mais recentes mostram que anualmente ocorrem 50 a 200 milhões de infecções, 500 mil casos de dengue severa (FHD) e mais de 20.000 mortes. (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013). No entanto, no estudo de Bhatt *et al.* (2013), em que foram usadas abordagens cartográficas para determinar a incidência da dengue, foi estimado que as infecções anuais podem atingir 390 milhões de pessoas.

Figura 2- Zonas endêmicas e de risco para dengue.

Dengue, países e áreas em risco (2011)



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2012a)

Legenda: Em cor amarela estão representadas as regiões onde já foram registrados casos de dengue. Linhas isotérmicas definem os limites geográficos onde *Aedes aegypti* está presente (zonas de risco).

No Sudeste da Ásia, estima-se que 1,3 bilhões de pessoas vivem em áreas onde a dengue é endêmica, sendo que em Bangladesh, Índia, Indonésia, Maldivas, Sri Lanka e Tailândia esta doença corresponde a principal causa de hospitalização e morte entre as crianças. Em 2010, ocorreram nessa região cerca de 190.000 casos, e foi verificado um

aumento da proporção de dengue grave, principalmente na Tailândia e Indonésia (FERREIRA, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

Na região das Américas, a incidência da dengue tem aumentado nos últimos anos. Segundo a Organização Pan- Americana da Saúde (2013), os países mais afetados em 2013 foram Brasil (1.451.432 casos), México (215.000 casos), Colômbia (117.624 casos) e Venezuela (54.624 casos) e ocorreram no total 1.194 mortes. Na região do pacífico, foi registrado em 2011, um total de 244. 855 casos dos quais 839 resultaram em óbitos (ARIMA *et al.*, 2013).

Na Europa, os últimos casos mortais de dengue ocorreram na Grécia, na epidemia de 1926 a 1928. No entanto, recentemente, os casos importados em viajantes tornaram-se frequentes, sendo que em 2010, foi notificada transmissão local da dengue na Croácia e na França e em outubro de 2012, um surto na ilha da Madeira, Portugal, resultou em 2,164 casos e foram identificados casos importados dessa região em outros 13 países da Europa (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013).

6.1.1.1 Dengue na África

No continente africano, a dengue tem aumentado desde 1980, com a maioria das epidemias ocorrendo na zona Leste do continente e, em menor medida, na África Ocidental. Contudo, a prevalência da doença parece menor do que na Ásia e Américas (SANG, 2006).

Na África, os primeiros isolados do vírus Dengue em humanos foram da Nigéria, referentes ao período de 1964 a 1968, e pertenciam aos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (CAREY *et al.*, 1971). No entanto, um inquérito sorológico retrospectivo confirmou que a doença já se encontrava no continente, tendo ocorrido uma epidemia em Durban, África do Sul, no biênio 1926/1927 (KOKERNOT, 1956). Atualmente, os quatro sorotipos têm circulado no continente, sendo que a maioria das epidemias tem sido causada pelo DENV-2 seguido de DENV-1 (SANG, 2006).

Os dados disponíveis sugerem que anualmente ocorrem no continente africano cerca de 20.000 a 1 milhão de casos de febre clássica da dengue, entre os quais 10.000 são do tipo FHD (AMARASINGHE *et al.*, 2011). A transmissão de DENV é endêmica em 34 países da África (Figura 3), sendo que destes, 22 relataram a transmissão local da doença e nos 12 países restantes, a dengue foi diagnosticada apenas em viajantes que retornaram aos seus países de origem infectados (AMARASINGHE *et al.*, 2011; WERE, 2012).

explicar o baixo número de casos incluem a proteção cruzada por outras infecções endêmicas de flavivírus, baixa competência vetorial das populações de mosquitos ao DENV e fatores genéticos dos hospedeiros (AMARASINGHE *et al.*, 2011; DIALLO *et al.*, 2005). A raça pode ser um fator de resistência à infecção por dengue, com alguns estudos a sugerir que os indivíduos negros são mais resistentes (HALSTEAD *et al.*, 2001). Os polimorfismos genéticos em genes de citocinas e proteínas de coagulação foram propostos como mecanismos potenciais para essa resistência (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005).

6.1.1.2 Dengue em Cabo Verde

Em 2009 ocorreu a primeira epidemia de dengue registrada em Cabo Verde. Foram diagnosticados mais de 20.000 casos, entre os quais 174 do tipo FHD e ocorreram quatro óbitos (Quadro 1).

Quadro 1- Dados estatísticos da epidemia de dengue ocorrida em Cabo Verde no ano de 2009

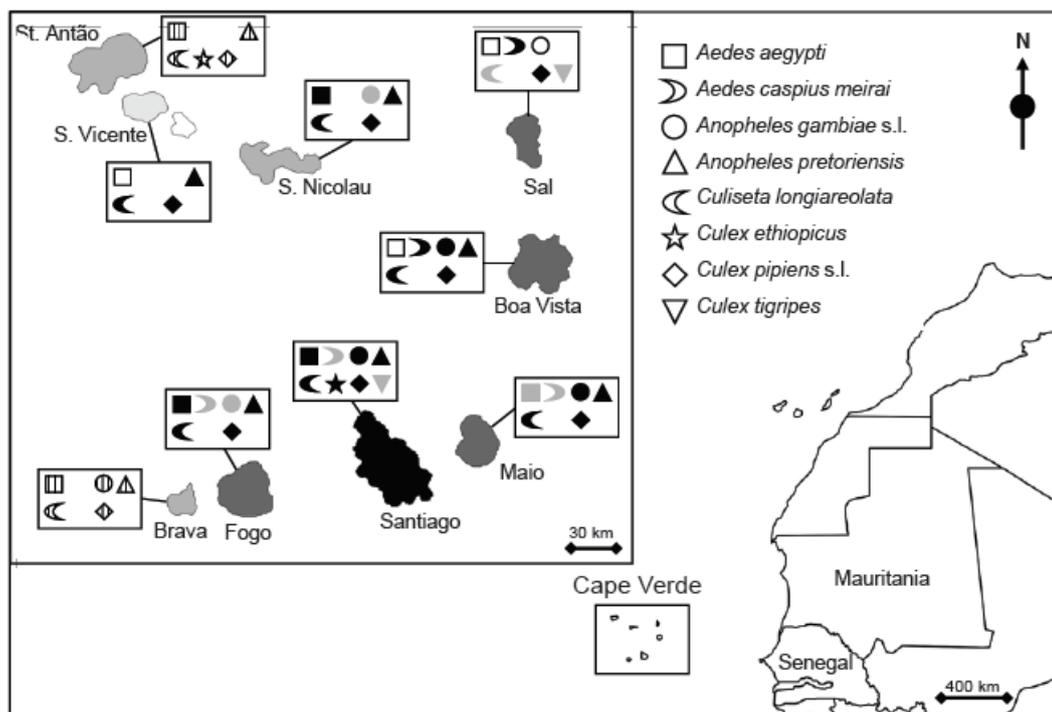
Delegacias de Saúde	Concelhos	Nº de casos de dengue	Nº de casos de FHD	Nº de óbitos	Taxa de ataque (%)	Taxa de letalidade (%)
Praia	Praia	14488	87	4	11,4	0,03
	Rib. Grande Santiago	254	0	0	2,6	0
S. Domingos	S. Domingos	171	0	0	1,2	0
Santa Catarina	Sta. Catarina Santiago	334	3	0	0,7	0
	S.Salvador do Mundo	47	0	0	0,4	0
Santa Cruz	Santa Cruz	583	8	0	2	0
	S. Lourenço dos Órgãos	63	1	0	0,7	0
S. Miguel	S. Miguel	121	0	0	0,8	0
Tarrafal	Tarrafal	176	6	0	0,8	0
Maio	Maio	836	2	0	10,3	0
Brava	Brava	161	2	0	2,6	0
S. Felipe	S. Felipe	3420	64	0	14,8	0
	Sta. Catarina do Fogo	32	0	0	0,8	0
Mosteiros	Mosteiros	376	0	0	4	0
S.Vicente	S.Vicente	20	0	0	0	0
S. Nicolau	Ribeira Brava	1	0	0	0	0
	Tarrafal S. Nicolau	14	0	0	0,3	0
Sal	Sal	20	1	0	0,1	0
Boa Vista	Boa Vista	16	0	0	0,3	0
Ribeira Grande	Ribeira Grande	1	0	0	0	0
Porto Novo	Porto Novo	0	0	0	0	0
Paúl	Paúl	3	0	0	0	0
Total		21.137	174	4	4,2	0,02

Fonte: Cabo Verde (2010)

As ilhas mais afetadas foram Santiago (77% dos casos), Fogo (18%) e Maio (4%) (CABO VERDE, 2010). Registros de 2010 apontaram para alguns casos esporádicos da dengue, sobretudo na ilha de Santiago e Fogo (CABO VERDE, 2011). De acordo com os serviços de saúde de Cabo Verde e o Instituto Pasteur de Senegal, a epidemia de dengue registrada em Cabo Verde foi causada pelo sorotipo DENV-3. Especula-se que o vírus era originário da África Ocidental, mais propriamente de Senegal, uma vez que no mesmo ano tiveram uma epidemia de DENV-3 (FRANCO *et al.*, 2010).

A presença de *A. aegypti* já foi registrada em todas as ilhas do arquipélago (Figura 4). Atualmente, é o único vetor de DENV em Cabo Verde, não havendo registros da presença do vetor secundário *A. albopictus* (ALVES *et al.*, 2010).

Figura 4- Distribuição do *Aedes aegypti* e outros mosquitos em Cabo Verde



Fonte: Alves *et al.* (2010)

Legenda: Cada espécie está representada por um símbolo. Símbolos negros: espécies registradas antes de 1980 (Ribeiro *et al.* 1980) e também em relatórios não publicados de 1983-2006; símbolos brancos: espécies anotadas antes de 1980, mas ausentes em relatórios 1983-2006. Símbolos cinza: espécies registradas apenas em relatórios de 1983-2006. Símbolos listrados: registros apenas de Ribeiro *et al.* (1980). Intensidade de sombreamento das ilhas reflete a riqueza de espécies.

Embora *A. aegypti* tenha sido detectado em Cabo verde desde 1931 (RIBEIRO *et al.*, 1980), só começou a ser alvo de programas de controle vetorial após a epidemia de 2009. O controle vetorial em Cabo Verde se baseia principalmente no uso de Abate (Temephos) para

as formas imaturas do mosquito (larvas) e pulverizações com deltametrina para as formas adultas (GÓMEZ *et al.*, 2013). Devido à baixa pluviosidade no país, a frequência de criadouros naturais para o *Aedes aegypti* é baixa. No interior da ilha de Santiago, por exemplo, o crescimento desse mosquito tem se dado preferencialmente em ambientes domésticos, nos recipientes utilizados para a armazenagem de água (DUARTE *et al.*, 2012).

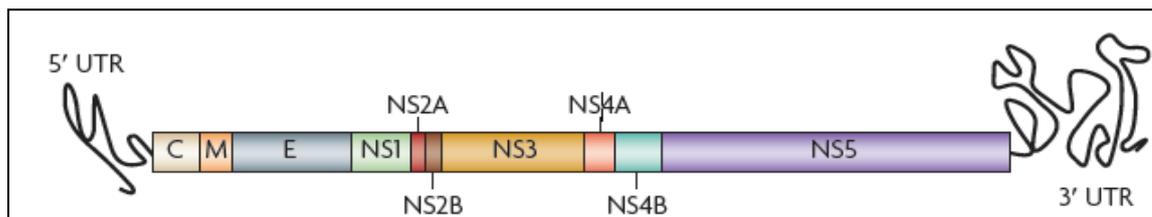
6.1.2 Vírus Dengue (DENV)

6.1.2.1 Estrutura

Vírus Dengue são arbovírus pertencentes à família Flaviviridae, gênero Flavivirus e agrupam-se em sorotipos distintos dentro do complexo antigênico dengue. Têm forma esférica, com cerca de 40 a 50 nm de diâmetro e o genoma compreende uma cadeia simples, de polaridade positiva, de ácido ribonucleico (ssRNA) com 11kb de comprimento (CHEN; VASILAKIS, 2011).

O genoma possui uma única fase de leitura aberta (figura 5) que codifica uma poliproteína que é posteriormente processada originando proteínas estruturais e não estruturais (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008).

Figura 5- Genoma do vírus Dengue



Fonte: Guzman *et al.* (2010)

Legenda: Esquema da fase de leitura aberta que codifica as proteínas estruturais, do capsídeo (C), da membrana (M) e do envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

As proteínas estruturas incluem a proteína C, que juntamente com o ssRNA formam o nucleocapsídeo viral, a proteína M e a glicoproteína E que são constituintes do envelope viral. Existem sete proteínas não estruturais designadas por proteínas NS: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5 (BARTH, 2000; LEITMEYER *et al.*, 1999; TORRES, 2008). Flanqueando o genoma temos regiões não codificadoras 5'UTR e 3'UTR com 96 e 450 nucleotídeos, respectivamente. Elementos estruturais da região 3'UTR estão envolvidos nos

processos de replicação viral, regulação da tradução, síntese de RNA e interação com as proteínas virais e celulares (VASILAKIS *et al.*, 2011).

Importantes propriedades biológicas do vírus Dengue, incluindo a ligação ao receptor, fusão com a membrana celular, hemaglutinação de eritrócitos, indução de anticorpos neutralizantes e a resposta imunitária protetora, estão associadas com a glicoproteína E (GUZMAN *et al.*, 2010). A proteína M inibe a atividade de fusão da proteína E durante a maturação do vírus no interior da célula, e as proteínas não estruturais estão envolvidas no processo de replicação do RNA viral (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008). Entre essas proteínas, destaca-se a NS5 que possui atividade de RNA polimerase e metiltransferase, a NS3 possui atividade de helicase, protease e trifosfatase de RNA e NS2A e NS4B inibem a sinalização por interferões (VASILAKIS *et al.*, 2011; WAHALA; DE SILVA, 2011).

Quando o vírus Dengue é inoculado junto com a saliva do mosquito no hospedeiro humano, ele infecta inicialmente as células dendríticas imaturas através de um receptor presente na membrana dessas células. Posteriormente, as células dendríticas infectadas amadurecem e migram para os nódulos linfáticos regionais, ou locais, onde apresentam antígenos virais às células T, dando início à resposta imune humoral e celular (GUZMAN *et al.*, 2010).

A infecção com um sorotipo de DENV não fornece imunidade protetora contra os outros, e a infecção sequencial demonstrou aumentar a replicação do vírus e, assim, aumentar a probabilidade de desenvolvimento de FHD (HALSTEAD, 1970; KLIKS *et al.*, 1989). A hipótese mais aceita para explicar o maior risco de dengue hemorrágica associada à infecção secundária consiste no processo de “Antibody dependent enhancement” - potencialização da infecção dependente de anticorpos. Segundo essa hipótese, o vírus forma imunocomplexos com anticorpos não neutralizantes preexistentes, interagindo assim com um receptor alternativo presente nas membranas celulares, o que facilita a sua entrada nas células do hospedeiro (THEPPARIT; SMITH, 2004). No entanto, a virulência do vírus também parece explicar o aparecimento de formas mais graves de dengue, sendo que foi observado que algumas cepas de DENV são mais virulentas do que outras, estando associadas a epidemias mais explosivas e com maiores manifestações de DHF/SCD, mesmo na ausência de infecções primárias (ELDRIDGE; EDMAN, 2003).

6.1.2.2 Diversidade, ciclos de transmissão e evolução de DENV.

Até 2013, o complexo DENV consistia de quatro vírus distintos, porém, relacionados, entre si, designados por sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). No entanto, recentemente foi descoberto um novo sorotipo, DENV-5, na Malásia (NORMILE, 2013). DENV tem epítomos de anticorpos que são únicos para cada sorotipo e epítomos que são compartilhadas entre eles (WAHALA; DE SILVA, 2011).

Genótipos ou linhagens distintas foram identificados dentro de cada sorotipo, destacando a grande variabilidade genética do vírus Dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). A classificação dos genótipos para cada sorotipo é ainda hoje controversa. No entanto, as classificações mais aceitas atualmente são a de Rico-Hesse (2003), e de Chen e Vasilakis (2011). Para Rico-Hesse, os sorotipos DENV1-4 encontram-se divididos nos seguintes genótipos:

- a) **DENV-1:** silvático/ Malásia; América/África; Asiático; e da Tailândia;
- b) **DENV-2:** Malásia/ Índia; Sudeste da Ásia; América; e genótipo da África Ocidental;
- c) **DENV-3:** sudeste da Ásia/ Pacífico do Sul; Tailândia; Índia subcontinental; e Américas;
- d) **DENV4:** Indonésia; sudeste da Ásia; e Malásia.

Entretanto, Chen e Vasilakis (2011), fizeram uma análise mais detalhada das sequências do gene E atualmente existentes, e concluíram que para o sorotipo DENV-1 existem cinco genótipos distintos (I; II; III; IV; e V), para DENV-2 existem seis (Asiático I; Asiático II; Sudeste da Ásia/ Americano; cosmopolita/IV; Americano/genótipo V; genótipo silvestre). Para DENV-3 foram identificadas cinco genótipos (I; II; III; IV; e V), e para DENV-4 quatro (I; II; III; e IV).

Os quatro sorotipos DENV são mantidos em dois ciclos de transmissão distintos: silvestre e humana/ epidêmica. A forma silvestre ocorre em ambientes silvestres do Sudeste Asiático e África Ocidental. Neste ciclo, a transmissão das estirpes de DENV silvestres ocorre entre primatas não humanos através da picada de espécies silvestres de *Aedes* spp infectados. Na África, os principais vetores incluem *A. (Stegomyia) luteocephalus*, *A. (Diceromyia) furcifer*, *A. (Diceromyia) taylori* e *A. vitattus*, enquanto que na Ásia são *A. pseudoniveus*, *A. subniveus*, *A. Vanus*, *A. albolateralis*, *A. niveoides* e *A. novoniveus* (CHEN; VASILAKIS, 2011; DIALLO *et al.*, 2003).

O ciclo de transmissão humana ocorre quase exclusivamente por cepas de DENV que circulam em ambientes domésticos e peridomiciliares (urbanos), onde os humanos servem como os únicos reservatórios. É mantido principalmente por *A. aegypti* e *A. albopictus*, no entanto, surtos de dengue também têm sido atribuídos a *Aedes polynesiensis* na Polinésia Francesa (GUBLER, 1998).

Em áreas rurais da África e da Ásia, onde o vetor silvestre atinge altas densidades, ocorre transmissão de DENV entre humanos e primatas (CHEN; VASILAKIS, 2011; VASILAKIS *et al.*, 2011). Na África, um estudo filogenético de genomas virais completos, detectou DENV-2 silvestre em isolados humanos na Nigéria (VASILAKIS; TESH; WEAVER, 2008). Em 2009, foi isolado de um paciente com FHD uma cepa de DENV-2 silvestre, evidenciando que a forma silvestre de DENV pode provocar dengue grave (FRANCO *et al.*, 2011).

Por outro lado, o estudo de Diallo *et al.* (2005), demonstrou que vetores silvestres do Senegal (principalmente *A. furcifer* e *A. luteocephalus*) são altamente susceptíveis à infecção por cepas de DENV-2 silvestres e urbanas, e foi detectado, uma baixa suscetibilidade de duas populações locais de *A. aegypti* a estas cepas. Isto indica que o vetor silvestre pode possivelmente manter os dois ciclos de transmissão na África Ocidental.

A origem da forma humana de DENV ainda é pouco clara, contudo, existe a hipótese de que o DENV que circula hoje em centros urbanos e peri-urbanos surgiram de formas silvestres (CHEN; VASILAKIS, 2011). Análises filogenéticas utilizando sequências de genes da proteína do envelope sugerem que os quatro sorotipos de DENV endêmico/ epidêmico evoluíram independentemente dos vírus ancestrais silvestres, tornando-se ambos ecologicamente e evolutivamente diferentes (VASILAKIS; WEAVER, 2008). Este processo de emergência de estirpes/cepas de DENV em humanos a partir do ciclo silvestre foi facilitado pela mudança do vetor, de espécies silvestres de *Aedes* para *A. aegypti* e *A. albopictus* e também pela troca de hospedeiros reservatórios, de primatas não humanos para seres humanos (MONCAYO *et al.*, 2004). A evolução das formas endêmicas/epidêmicas representa eventos relativamente recentes na história evolutiva de DENV, com estimativas de tempo que variam de 100 a 1.500 anos atrás (WANG *et al.*, 2000).

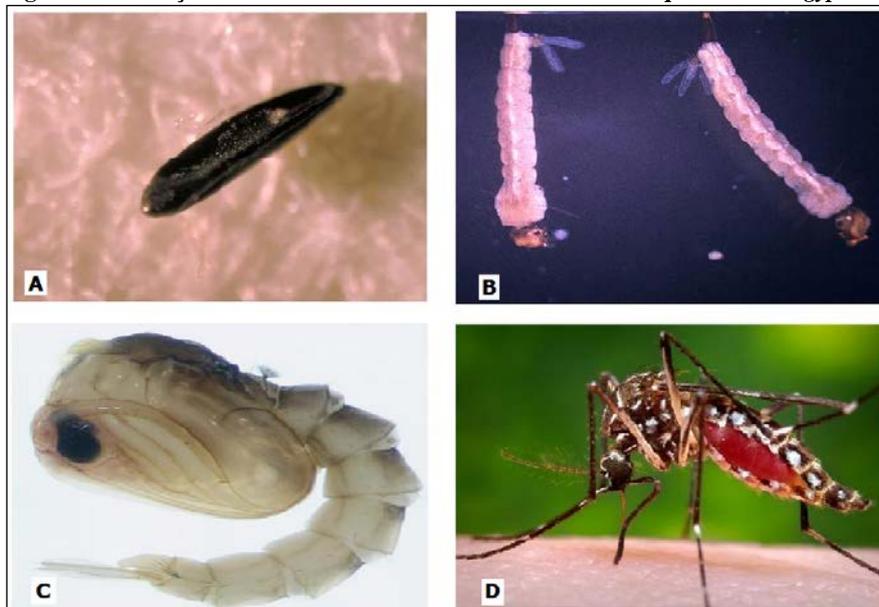
6.1.3 O mosquito *A. aegypti* (Linneaus 1972)

Aedes aegypti Linneaus 1972, é um mosquito oriundo da África, provavelmente da região etiópica, tendo sido originalmente descrito no Egito (CHRISTOPHERS, 1960). É o vetor do vírus Dengue na maioria dos países onde a doença é endêmica e tem demonstrado uma grande capacidade de adaptação às condições de vida das populações humanas e a sua distribuição e densidades populacionais têm aumentado, especialmente em áreas urbanas das regiões tropicais (GUBLER, 1998). É um vetor eficiente de DENV por ser altamente susceptível ao vírus e viver em ambientes domiciliares e peridomiciliares onde se alimenta preferencialmente de sangue humano (GIBBONS; VAUGHN, 2002). Por outro lado, esse vetor faz ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonadotrófico aumentando a probabilidade de infectar-se e de transmitir os vírus (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

A.aegypti encontra-se largamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes 45° N e 35° S ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermais de 20 °C (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A altitude também influencia a sua distribuição. Normalmente não é encontrado acima dos 1.000 metros, mas já foi referida sua presença a 2.200 metros acima do nível do mar, na Índia e na Colômbia, o que evidencia a grande adaptabilidade dessa espécie (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

O mosquito *A. aegypti*, assim como todos os membros da família Culicidae, tem quatro fases distintas em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto (figura 6).

Figura 6- Ilustração das diferentes fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: adaptado de Centers of diseases control (2013).

Legenda: ovos (A); larvas (B); pupa (C) e adulto (D) do mosquito *Aedes aegypti*

A fêmea adulta de *A.aegypti* deposita seus ovos em água, preferencialmente limpa, contida principalmente em recipientes artificiais que se encontram ao redor e dentro das casas, como vasos de plantas, pneus de automóveis velhos, baldes e cisternas (GUBLER, 1998). Esses ovos são colocados individualmente em superfícies úmidas logo acima da linha de água. A fêmea coloca os ovos em vários recipientes, garantindo a sobrevivência e a dispersão de sua prole (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Em um ambiente quente e úmido, o desenvolvimento embrionário é geralmente concluído em 48 horas. Após esse período, os ovos podem resistir a longos períodos de dessecação (mais de um ano). A capacidade dos ovos de resistir a dessecação facilita a sobrevivência da espécie em condições climáticas adversas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011)

Os ovos ao entrarem em contato com a água são rompidos, dando origem às primeiras larvas. Essas passam por quatro estádios de crescimento larvar (L1, L2, L3 e L4), sendo a duração do desenvolvimento dependente da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade larval no recipiente (CHRISTOPHERS, 1960). Após cerca de oito dias de desenvolvimento, as larvas dão origem às pupas que se movimentam livremente nos criadouros, mantendo-se próximas à superfície da água, o que facilita a emergência do inseto adulto. O estado de pupa dura, geralmente, de dois a três dias e a partir daí surgem os mosquitos adultos os quais se alimentam de substâncias açucaradas, presentes em flores, frutos e outros exudatos de plantas. As fêmeas de *A. aegypti* possuem hábito hematofágico diurno, principalmente ao amanhecer e pouco antes do pôr do sol. Os machos também são diurnos e seguem as fêmeas aos seus abrigos, para efetuarem a cópula (CLEMENTS, 1999; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

6.1.3.1 Classificação em subespécies

Segundo Mattingly (1957), existem duas subespécies reconhecidas de *A. aegypti* s.l.: a forma ancestral, *A. aegypti formosus* (Aaf), um mosquito silvestre, presente na África subsariana e ocidental, e a subespécie *A. aegypti aegypti* (Aaa), encontrado globalmente em regiões tropicais e subtropicais, normalmente em associação com os seres humanos. Segundo esse autor, *A. aegypti formosus* apresenta coloração mais escura quando comparado com *A.aegypti aegypti* e não possui escamas claras no primeiro tégito abdominal. Essa subespécie se reproduz mais frequentemente em recipientes naturais, como ocos de árvores e as fêmeas se alimentam em animais silvestres (MATTINGLY, 1957).

Atualmente, existe a hipótese de que a forma doméstica, *A. aegypti aegypti*, teve origem a partir de espécies ancestrais semelhantes a *A. aegypti formosus*. Essa população ancestral teria ficado isolada no Norte da África e o ambiente agreste poderia ter selecionado os mosquitos que exibem comportamentos domésticos, como uma preferência para a reprodução em reservatórios de água artificiais (TABACHNICK, 1991). Segundo Brown *et al.* (2013), as rotas de comércio entre os séculos XV e XVIII permitiram a dispersão de *A. aegypti aegypti* da África para o Novo Mundo, e em seguida, do Novo Mundo para o Sudeste Asiático e Pacífico.

No entanto, a existência da subespécie africana *A. aegypti formosus* é ainda hoje questionada na comunidade científica, sendo que a sua identificação se baseia principalmente na cor (1º tégito sempre escura) e comportamento (exclusivamente silvestre). McClelland (1974), observou que na África as duas subespécies (baseadas na classificação de Mattingly) podiam coabitar o mesmo espaço peridomiciliar e existiam formas intermediárias com um padrão variado de escamas. Adicionalmente, na Costa Ocidental Africana, foram encontrados mosquitos, supostamente da subespécie *A. aegypti formosus*, a reproduzirem-se no interior de habitações (NASIDI *et al.*, 1989; VAZEILLE-FALCOZ *et al.*, 1999). Estes estudos evidenciam que o comportamento exclusivamente “silvestre” do *A. aegypti formosus* não pode ser utilizado como elemento para a sua classificação.

Vários estudos genéticos realizadas em populações de *A. aegypti* coletadas de diversas regiões do globo (incluindo África) mostraram uniformemente que os haplótipos de DNA mitocondrial encontram-se distribuídos em dois clados, contudo, em nenhum deles é conclusiva a associação entre os clados e as supostas subespécies de *A. aegypti* (MOORE *et al.*, 2013).

6.2 INTERAÇÃO DENV-VETOR E COMPETÊNCIA VETORIAL

No mosquito infectado, DENV se replica primeiramente no epitélio do intestino médio e depois se dissemina através da hemolinfa para outros órgãos, tais como o corpo gorduroso e traqueia, e finalmente infecta a glândula salivar em aproximadamente 10-14 dias após a ingestão do sangue infectado. Uma vez na saliva, o vírus é inoculado num hospedeiro humano quando o mosquito faz o repasto sanguíneo (SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012).

Globalmente, as populações de *Aedes aegypti* mostram variações na competência vetorial ao DENV. A habilidade do vetor se infectar por um agente patogênico, permitir a sua

replicação e transmiti-lo a outro hospedeiro é denominada de competência vetorial (BENNETT *et al.*, 2002). Esta característica é determinada pela genética do vetor e do agente patogênico, mas pode ser influenciado por fatores ambientais (COX; BROWN; RICO-HESSE, 2011; LAMBRECHTS *et al.*, 2011; MERCADO-CURIEL; BLACK; MUNOZ, 2008).

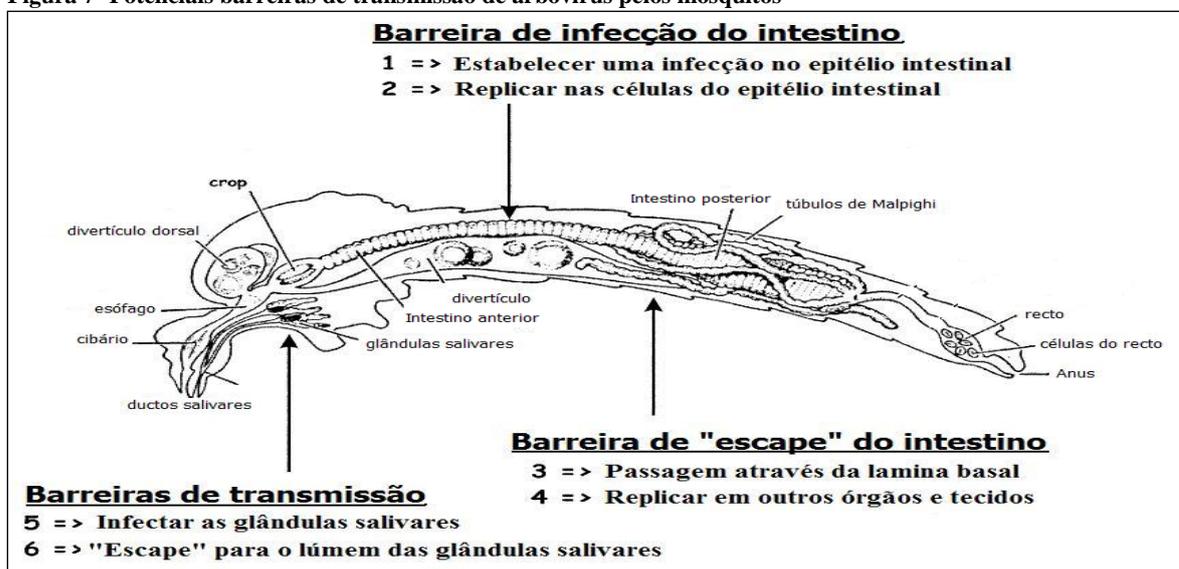
A competência vetorial está associada a certos obstáculos à infecção, que incluem a barreira de infecção do intestino (MIB), barreira de escape do intestino (MEB), e a barreira de infecção da glândula salivar (SIB). Nos vetores com MIB, o vírus não pode replicar nas células do intestino, enquanto que aqueles com MEB podem permitir a replicação do vírus no intestino, mesmo em concentrações elevadas, mas o vírus não é capaz de sair desse órgão e causar uma infecção disseminada. A barreira da glândula salivar impede a replicação do vírus nas glândulas salivares mesmo quando este se encontra disseminado no corpo do mosquito (BENNETT *et al.*, 2002; BOSIO; BEATY; BLACK, 1998; COX; BROWN; RICO-HESSE, 2011). Alguns autores identificaram uma barreira de escape das glândulas salivares para *Aedes brelandi* e *A. hendersoni* infectados com o vírus La Crosse (GRIMSTAD; PAULSON; CRAIG, 1985; PAULSON; GRIMSTAD; CRAIG, 1989), em que, embora o vírus se encontre nas glândulas salivares, ele não é libertado na saliva. No entanto, para *A. aegypti*, não existem estudos que confirmem a presença dessa barreira em populações infectadas com DENV.

As barreiras acima mencionadas (MIB, MEB, SIB) parecem estar relacionadas com múltiplos genes (multigênica), que condicionam a competência vetorial das populações de mosquitos. Para Bosio, Beaty e Black- *et al.* (1998), existem pelo menos dois conjuntos de genes que controlam a competência vetorial de *A. aegypti* ao DENV, um relacionado com MIB e outro com MEB. Segundo Miller e Mitchell (1991), a replicação de DENV parece ser controlada por um gene principal e um grupo de genes secundários relacionados. Para Black *et al.* (2002), as barreiras de infecção do intestino (MIB) inibem fases iniciais de infecção viral como a ligação do vírus aos receptores, desencapsulamento, transcrição e tradução, enquanto que as barreiras de escape do intestino (MEB) podem atuar ao nível da passagem pela lâmina basal ou maturação do vírus (Figura 7).

Estudos mais recentes evidenciam que parte das barreiras à infecção pelo DENV é determinada pela resposta imune (inata e humoral) do vetor ao patógeno (DIMOPOULOS, 2003). Por exemplo, vários autores mostraram que um dos principais componentes da resposta imune inata do mosquito, a via de RNA de interferência (RNAi), é um importante modulador das infecções pelo DENV. Sanchez-vargas *et al.* (2009), silenciaram vários genes

dessa via em mosquitos infectados por DENV-2 e em consequência houve um aumento significativo da replicação de DENV-2 nos mosquitos. Lambrechts *et al.* (2013), estudaram polimorfismos no gene Dicer-2 de várias populações de mosquitos *A. aegypti* expostos ao DENV-2 e concluíram que a compatibilidade vetor- DENV-2 depende em parte da interação genótipo-genótipo do mosquito (polimorfismos dcr2) e do vírus. Dicer-2 codifica uma ribonuclease que atua na via de RNAi, o que mais uma vez evidencia a importância dessa via na modulação da infecção por DENV.

Figura 7- Potenciais barreiras de transmissão de arbovírus pelos mosquitos



Fonte: Adaptado de Black *et al.* (2002)

Segundo Souza- Neto, Sim e Dimopoulos (2009), a via de JAK-STAT, um componente da imunidade inata do mosquito, também modula a resistência ao DENV. Quando esta via se encontra suprimida, o mosquito torna-se mais susceptível ao DENV e quando é ativada, a resistência ao DENV aumenta. No entanto, a análise da expressão de genes da via JAK-STAT de linhagens resistentes (MOYO-R) e susceptíveis (MOYO-S) ao DENV-2, mostrou que para as duas linhagens havia aumento da expressão desses genes após a infecção com o vírus, sugerindo que a via pode estar envolvida na resposta ao DENV, mas, não tem um papel significativo na competência vetorial (BEHURA *et al.*, 2011). Ainda no mesmo estudo, foi detectado que para a linhagem resistente (MOYO-R) havia ativação da expressão de genes relacionados com P53, JNK e genes de caspases, enquanto que para a linhagem susceptível (MOYO-S) havia subexpressão de genes da proteína da cutícula. O revestimento cuticular ao nível do sistema traqueal pode impedir a disseminação do vírus a

partir do intestino, e o resultado obtido no estudo poderia explicar a maior disseminação do vírus para a linhagem MOYO-S.

Os genes expressos especificamente na glândula salivar também parecem ter um papel importante na infecção pelo DENV. Sim *et al.* (2012), verificaram que o silenciamento do gene da catepsina B reduzia significativamente os títulos de DENV nas glândulas salivares, enquanto que o silenciamento do gene da cistatina aumentava os títulos de DENV. De acordo com o estudo, a apoptose ao nível das glândulas salivares parece ter um papel importante na susceptibilidade do mosquito ao DENV, pois, ambas as proteínas (catepsina B e cistatina) estão envolvidas nesse processo.

A competência vetorial também pode ser modulada por fatores ambientais. Carrington *et al.* (2013), observaram que grandes flutuações de temperatura durante o dia reduzem as taxas de infecção do intestino e aumentavam o período de incubação extrínseca de DENV-1 no mosquito *A. aegypti*. Por outro lado, o modelo termodinâmico criado por Lambrechts *et al.* (2011), prevê que para temperaturas médias menores que 18 °C, flutuações da temperatura diária levavam ao aumento da competência vetorial, enquanto que para temperaturas médias maiores que 18 °C, maiores variações na temperatura diária diminuíam a competência vetorial. Segundo o mesmo estudo, a temperatura pode afetar a transmissão de DENV de forma indireta, uma vez que grandes variações de temperatura ambiental reduzem a probabilidade de sobrevivência do vetor durante o período de incubação extrínseca e assim, diminuir a probabilidade de transmissão do vírus ao homem.

Outro fator ambiental que pode influenciar a competência vetorial é a flora bacteriana presente nas larvas do mosquito. Ramirez *et al.* (2012), verificaram que mosquitos *A. aegypti* infectados com certos isolados bacterianos do campo eram menos susceptíveis à infecção pelo DENV. Xi, Ramirez e Dimopoulos (2008), mostraram que a microbiota do mosquito inibe a replicação viral através da estimulação da via imune *Toll* do mosquito.

A competência vetorial do *Aedes aegypti* ainda é pouco estudada na África, mas de acordo com alguns autores, ela parece explicar de certa forma a menor incidência de dengue neste continente. Cepas africanas de *A. aegypti*, principalmente a subespécie *A. aegypti formosus*, e bem como a espécie *A. albopictus*, mostraram uniformemente menor susceptibilidade a todos os quatro sorotipos de DENV (SYLLA *et al.*, 2009; WERE, 2012). Bosio, Beaty e Black (1998), observaram uma maior barreira de infecção do intestino (MIB) no *A. aegypti formosus* quando comparada com a subespécie *A. aegypti aegypti*. Segundo o mesmo estudo, existem evidências que a frequência dos alelos que controlam o MIB difere

grandemente entre as duas subespécies. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para melhor entender a transmissão de DENV no continente africano.

Em Cabo Verde, um estudo recente de competência vetorial de populações locais de *A. aegypti* ao DENV, mostrou que o vetor possui habilidade moderada para transmitir a cepa de DENV-3 isolada na epidemia de 2009, mas são pouco susceptíveis ao DENV-2 da Tailândia (VAZEILLE *et al.*, 2013). No entanto, desconhece-se o nível de susceptibilidade aos outros sorotipos DENV.

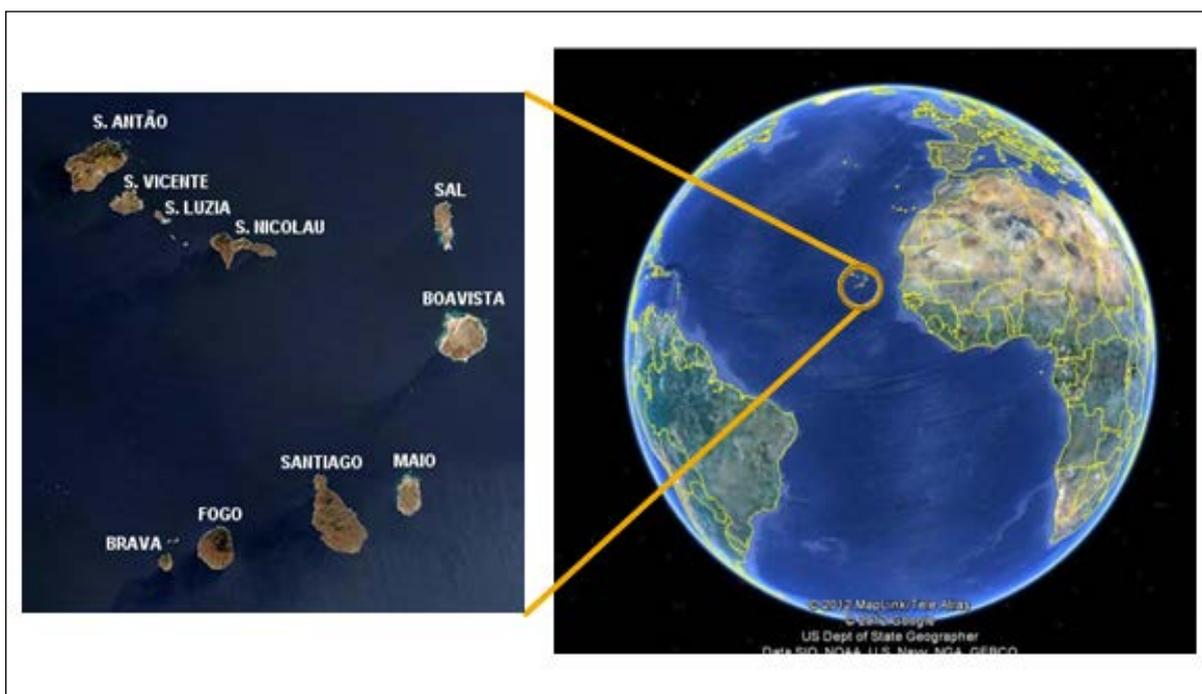
Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a quatro sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), usando como ferramenta a RT-PCR.

7 METODOLOGIA

7.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado na ilha de Santiago, localizada no arquipélago de Cabo Verde. O arquipélago de Cabo Verde é composto por dez ilhas (Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal, Boavista, Maio, Santiago, Fogo e Brava) e possui uma área total de 4.033 km². Encontra-se localizado no oceano atlântico, entre as latitudes 17 ° 12' e 14 ° 48' N e longitudes 22 ° 44' e 25 ° 22' W, a cerca de 450 km da costa Ocidental da África (Figura 8), (CABO VERDE, 1999).

Figura 8- Localização geográfica de Cabo Verde



Fonte: Adaptado do Google earth, 2013.

O arquipélago possui uma população de 491.683 habitantes, sendo que a maioria se encontra na ilha de Santiago (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA, 2010). O clima de Cabo Verde é do tipo subtropical seco, caracterizado por uma curta estação de chuvas (Julho a Outubro) resultante principalmente da passagem anual da Frente Intertropical (CABO VERDE, 2004).

Santiago é a maior das 10 ilhas do arquipélago, tem uma área de 991 km² e uma população de 273.919 habitantes distribuída em nove municípios. Nessa ilha também se encontra a capital do país, a cidade da Praia, que corresponde à cidade com maior número de habitantes e densidade populacional de Cabo Verde (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA, 2010). Segundo Alves *et al.* (2010), Santiago é a ilha com maior infestação de *Aedes aegypti* e é também onde se verificou o maior número de casos de dengue durante a epidemia de 2009 (CABO VERDE, 2010).

7.2 PERÍODO DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de *A. aegypti* foram coletadas sob a forma de ovos, por meio de armadilhas de oviposição (ovitrampas) adaptadas do modelo Fay e Perry de 1965 (REGIS *et al.*, 2008). As armadilhas foram distribuídas por sete municípios da ilha de Santiago, no período de Março a Junho de 2012. Foram instaladas em zonas peridomiciliares, próximas a potenciais criadouros de *Aedes aegypti* (poços, tanques e outros habitats aquáticos), de acordo com os serviços de vigilância entomológica do Ministério de Saúde de Cabo Verde.

Os ovos coletados foram encaminhados ao insetário do Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fiocruz-PE. Brasil, para estabelecer a população adulta, que foi mantida sob condições controladas de temperatura (26 °C ± 1 °C), umidade relativa do ar (60% a 80%) e fotoperíodo 12:12 h (claro/escuro). Para o estudo foram usadas apenas as gerações F₁ a F₃.

7.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

7.3.1 Propagação de DENV em células C6/36

As amostras dos diferentes sorotipos de DENV utilizadas neste estudo foram disponibilizadas pelo Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz-PE. As cepas usadas foram: DENV-1 42735/BR-PE (nº acesso GenBANK EU259529), DENV-2 3808/BR-PE (EU259569), DENV-3 85469/BR-PE (EU259607) e DENV-4 1385 (U18425).

Para a preparação dos estoques virais, os vírus foram expandidos em células C6/36 seguindo o protocolo de Guedes (2012). As células C6/36 foram infectadas com o vírus, e

após a formação do efeito citopático, as células passaram por um processo de congelamento em freezer a -80 °C e descongelamento em banho-maria a 37 °C por três vezes, de forma a liberar as partículas virais. A suspensão resultante foi posteriormente centrifugada a 2000-2500 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um tubo de 50 ml. A este sobrenadante foi adicionado soro fetal bovino e de seguida distribuída em criotubos em alíquotas de 0,5- 1 ml e armazenados em freezer -80 °C até a sua utilização.

Para a infecção, os estoques virais foram propagados na linhagem de células C6/36 seguindo o protocolo de Xi, Ramirez e Dimopoulos (2008), com modificações. Em resumo, utilizou-se 250 µl do estoque para infectar células C6/36 mantidas em frascos de cultura de 25 cm² numa confluência de 80% com multiplicidade de infecção de 0.5 partículas/células e suplementadas com meio L-15 (2% soro fetal bovino). Em seguida as células foram incubadas durante cinco a sete dias, e após esse período, foram congeladas a -80 °C e descongeladas em banho-maria a 37 °C por duas vezes para que ocorresse a lise e liberação das partículas virais. O conteúdo do frasco de cultura foi em seguida misturado com sangue desfibrinado de carneiro na proporção 1:1. Uma alíquota de 1,5ml dessa mistura foi separada e estocada a temperatura de -80 °C para posterior titulação por ensaio de placas em células C6/36. O restante do sangue infectado foi mantido a 37 °C durante 30 minutos antes da alimentação dos mosquitos.

7.3.2 Infecção oral dos mosquitos com o vírus Dengue

Com o objetivo de avaliar a susceptibilidade do mosquito *A. aegypti* aos diferentes sorotipos de DENV, foi feita a infecção oral dos mosquitos. Todo o procedimento de infecção oral foi realizado no infectório do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães onde as etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas dentro das normas de biossegurança para insetários e infectório (ADEGAS et al., 2005).

A infecção oral foi realizada com fêmeas de *A. aegypti* nulíparas com 7-10 dias de emergência usando um sistema de alimentação artificial (SALAZAR *et al.*, 2007) (Figura 9). Cerca de 100 a 150 mosquitos, cuja alimentação com sacarose foi suspensa 24h antes do experimento, foram alimentados com sangue contendo os diferentes sorotipos DENV. Simultaneamente, um grupo controle de igual número de indivíduos foi alimentado com sangue não infectado pelo vírus. Em seguida, foram selecionadas apenas as fêmeas

ingurgitadas e estas foram mantidas no infectório sob as condições previamente descritas, durante um período máximo de 21 dias. Para cada sorotipo foram realizados dois experimentos independentes.

Figura 9- Visualização dos aparatos utilizados para a alimentação sanguínea de mosquitos e a sua contenção em gaiolas teladas em infectório.



Fonte: O autor

Legenda: imagem a esquerda representa o sistema de mamadeiras ligadas a um banho circulante a 37 °C, provido de compartimento para deposição de sangue, revestido com membrana comercial, para a alimentação de fêmeas de *Aedes aegypti*. À direita, imagem da gaiola em tela e alumínio utilizada para acondicionamento dos potes telados contendo fêmeas alimentadas com sangue.

7.3.3 Determinação do título viral na mistura vírus/ sangue por ensaio de placa em células C6/36

Para determinar o título do vírus no sangue usado na infecção oral, foi realizada a técnica de titulação por peroxidase em células C6/36 seguindo o protocolo de Das *et al.* (2007), com modificações na revelação do ensaio. Em uma placa de 24 poços foram semeadas entre 2×10^5 e 3×10^5 células C6/36 em meio L15 (5% de soro bovino fetal) para cada poço, 48 horas antes da realização do ensaio (as células devem atingir 80% de confluência). Em seguida, foi preparada uma série de diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) da suspensão contendo o vírus a titular. Removeu-se o meio dos poços e adicionou-se 200 μ l de cada diluição. As placas foram posteriormente homogeneizadas em um homogeneizador orbital e depois incubadas a 28 °C por 45 minutos. Após a adsorção do vírus, as diluições foram removidas e adicionou-se 1ml de meio semi-sólido (2% carboximetilcelulose, meio Leibovitz 2X concentrado, penicilina/streptomicina 1% e fungizona a 1%) e incubou-se a 28 °C por cinco dias. Após o período de incubação, o meio foi retirado e adicionou-se 1 ml do

fixador (30% acetona em 1X PBS) e a placa foi mantida a 4 °C por 13 minutos. Depois, o fixador foi removido e os poços lavados com PBS 1X e deixados a secar em estufa por 24h. Após esse período, as placas foram incubadas com 200µl de anticorpo primário (líquido ascítico murino anti-dengue) a 37 °C por 1 hora e, em seguida, lavadas três vezes com tampão de lavagem (1X PBS e *Tween*-20). Após as lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário HRP-rec-Protein G (Invitrogen – cat. N° 10-1223) a 37 °C por 1 hora e, em seguida, lavadas três vezes com o tampão de lavagem. Por fim, foram adicionados 200 µl do substrato AEC (Sigma – Cat. N° A6926) e a placa foi incubada até o aparecimento dos *foci*.

O título foi dado em unidades formadoras de foco por ml (FFU/ml) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Título FFU/ml} = \text{focos da última diluição} \times \text{última diluição (10n)} \times \text{fator de diluição}$$

n= número da última diluição correspondente à visualização dos focos

7.3.4 Dissecção dos mosquitos e extração de RNA total

Para o acompanhamento do processo de replicação viral em diferentes momentos após a alimentação artificial, coletou-se individualmente 15 a 20 mosquitos no 7º 14º e 21º dia após a infecção (dpi), os quais foram submetidos à dissecção em PBS (1X). As cabeças, intestinos e glândulas salivares de cada mosquito foram acondicionados separadamente em microtubos de 1,5 ml contendo 250 µl de diluente para mosquito composto por PBS 1X (0,1M; pH 7,4), soro fetal bovino 10%, antibiótico 1% e antifúngico 1% (LAMBRECHTS et al., 2009) e as amostras foram estocadas a -80 °C até a sua utilização.

A extração do RNA total foi realizada usando Trizol, seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen cat. N° 15596-026) com algumas modificações. Os tecidos foram inicialmente homogeneizados utilizando pistilos e em seguida, 100 µl desse homogenato foram transferidos para microtubos de 1,5 ml contendo 200 µl de Trizol que foram agitados em vórtex por cerca de 10 segundos e mantidos à temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, 100 µl de clorofórmio foram adicionados aos microtubos, os quais foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para microtubos contendo 250 µl de isopropanol para precipitar o RNA. Esses

microtubos foram invertidos manualmente por 10 vezes, incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, e em seguida centrifugados a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão dos tubos e adicionou-se 300 µl de etanol 75% para lavar o RNA. O material foi submetido a uma ultima centrifugação a 7.500 g por 5 minutos, e em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet foi deixado a secar a temperatura de 37 °C por 15 minutos. O pellet foi ressuspendido em 30 µl de água ultra pura e foi feito a eliminação do DNA contaminante com DNase de acordo com o protocolo do fabricante (Turbo DNase-Ambion, cat N° AM2239). Finalmente, o RNA foi mantido a – 80 °C até a sua utilização.

7.3.5 Determinação das taxas de infecção por RT- PCR One Step convencional.

Para a detecção do vírus nos intestinos, cabeças e glândulas salivares foi feita a RT-PCR One Step convencional, usando os primers NS5 descritos por Kong *et al.* (2006) para DENV: forward, 5`-GGAAGGAGAAGGACTGCACA-3`; e reverso, 5`-ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT-3`. A região amplificada por esse par de primers não é sorotipo- específica, sendo que para os quatro sorotipos testados, o tamanho do fragmento amplificado é de 104pb.

A técnica de PCR foi realizada usando 12,5µl de Master mix (Promega Cat. N° M7505), 10µM de cada primer (Forward e Reverse), DTT a 0,1M, 1,05U de RT-AMV (Invitrogen), 1,2U de RNAase OUT e água para perfazer um volume final de 25 µl. O programa da reação foi de 1 ciclo a 50 °C por 60 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

7.3.6 Síntese dos padrões de DENV para a RT-PCR quantitativa (qRT- PCR)

A determinação do número de cópias de RNA viral/µl nas glândulas salivares foi feita pela técnica de PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR), usando o método de quantificação absoluta por curva padrão. Para a preparação dos padrões de cada sorotipo, foi feito inicialmente uma RT- PCR usando o RNA total extraído do estoque viral, seguindo-se de uma PCR para a região NS5 e finalmente uma transcrição *in vitro* do produto da PCR para obter o RNA correspondente à região NS5.

A etapa inicial da RT-PCR consistiu na síntese do cDNA a partir do RNA total extraído do estoque viral de cada sorotipo, usando o kit Cloned AMV Reverse Transcriptase

(Invitrogen, Cat. Nº 12328-019). Em seguida, foi feita a amplificação do fragmento NS5 por PCR, utilizando os primers descritos por Kong *et al.* (2006), em que NS5 *forward* foi modificado pela introdução de uma sequência promotora T7 (em negrito): forward, 5'-**TAATACGACTCACTATAGGG**-GGAAGGAGAAGGACTGCACA-3'; e reverso, 5'-ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT- 3'.

A técnica de PCR foi realizada usando a seguinte mistura: 12,5µl de Master mix (Promega Cat. Nº M7505), 10µM de cada primer (Forward e Reverse), 1 a 2µg de cDNA e água para completar um volume final de 25µl. A reação foi feita em termociclador programado para 1 ciclo a 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo final 72 °C por 10 minutos.

A transcrição *in vitro* foi realizada seguindo o protocolo do Kit da Ambion (MEGAscript T7 Kit, Cat. Nº AM1334) e utilizando o produto da PCR convencional anteriormente descrita. Em seguida, fez-se a purificação do transcrito usando fenol-clorofórmio. Para isso, água foi adicionado ao produto da transcrição *in vitro* até obter um volume de 350 µl e colocou-se 350 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamil (Invitrogen) e o material foi centrifugado a 12.000 rpm durante 4 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para outro microtubo onde foi adicionado 350 µl de clorofórmio: álcool isoamil e posteriormente foi centrifugada a 12.000 rpm durante 4 minutos. A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para um novo microtubo onde foram adicionados 60 µl de acetato de sódio e 1 ml de etanol 100% gelado, e a mistura foi mantida no freezer a -60 °C por 20 minutos. Posteriormente, fez-se uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, tendo o sobrenadante sido descartado e o pellet colocado à temperatura ambiente por 10 minutos para secar. O pellet foi ressuscitado em 50- 100µl de água ultra pura e o RNA quantificado no espectrofotômetro do tipo Nanodrop (Thermo Scientific, NanoDrop 2000). O número de cópias de RNA/µl foi calculado segundo a fórmula descrita por Kong *et al.* (2006):

$$\text{N}^\circ \text{ cópias RNA}/\mu\text{l} = [\text{Conc. RNA (g}/\mu\text{l)} / \text{tamanho do transcrito (pb)} \times 340] \times 6,02 \times 10^{23}$$

7.3.7 RT-PCR quantitativa (qRT- PCR)

Esta técnica foi empregada para determinar o nº de cópias de RNA viral presente nas glândulas salivares.

A RT-PCR em tempo real quantitativa foi realizada usando o Kit Quantitect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, Cat. Nº 204245) e os mesmos primers NS5R e NS5F citados para a RT-PCR One Step. Para um volume de reação de 25 µl foi usado 12,5µl de SYBR Green Master mix 2X, 0,2µM de cada primer, 0,25µl da enzima transcriptase reversa, 5µl de cada amostra normalizada para 50 ng e água ultra pura para completar os 25µl. As reações de amplificação foram realizadas no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500) consistindo o programa em 1 ciclo de 50 °C por 30 minutos, 95 °C por 15 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 58 °C por 30 segundos, e 72 °C por 30 segundos. A quantificação do vírus foi feita utilizando os valores de cycle threshold (ct) das amostras em relação aos da curva padrão. Os dados de detecção e quantificação foram analisados usando o software ABI (versão 2.0.5) da Applied Biosystems.

7.4 ANÁLISE DOS DADOS

As taxas de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial (taxa de infecção das glândulas salivares) foram determinadas para os diferentes sorotipos.

A taxa de infecção do intestino correspondeu ao número de mosquitos com intestino infectado dividido pelo número total de mosquitos expostos ao vírus, enquanto que a taxa de disseminação foi dada pelo número de mosquitos com cabeça infectada, dividido pelo número total de mosquitos com intestino infectado. A competência vetorial ou taxa de infecção das glândulas salivares correspondeu ao número de mosquitos com glândula salivar infectada dividido pelo número total de mosquitos expostos (BENNETT *et al.*, 2002).

Foram aplicados testes T, ANOVA, com pós teste de Dunnett, e testes não paramétrico de Kruskal Wallis e Mann-Whitney para a análise comparativa do número de cópias de RNA viral, usando o software SigmaPlot Versão 12.5.

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto de dissertação surgiu no âmbito do protocolo de colaboração entre o Departamento de Entomologia/CPqAM/Fiocruz-PE com a Universidade Jean Piaget de Cabo Verde. Por não envolver de forma direta pesquisa com seres humanos, este projeto não requereu submissão ao comitê de ética, de acordo com a resolução CNS nº196/96.

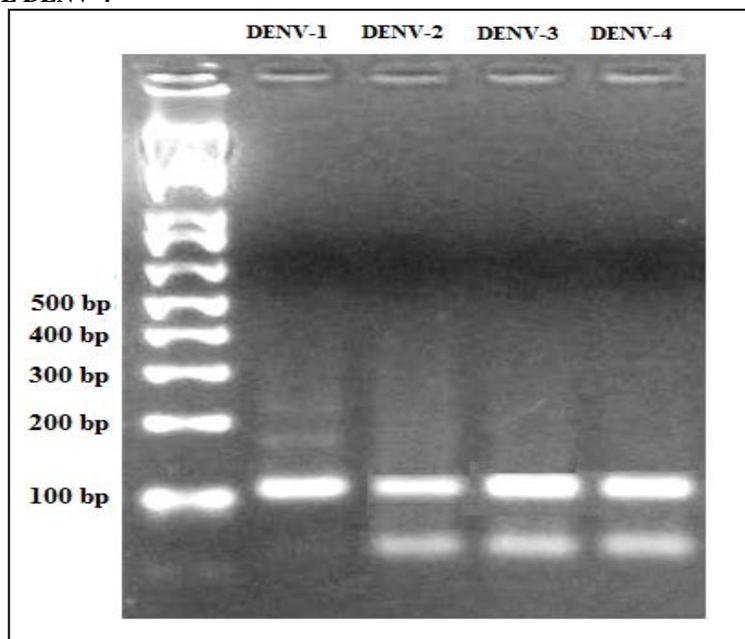
A remessa dos ovos de *Aedes aegypti* de Cabo Verde para o Brasil seguiu as disposições legais que regulamentam o envio de material biológico não humano. A manutenção das colônias de mosquitos e a infecção artificial foram feitas em laboratórios de nível de biossegurança 2 (NB-2) do Centro de pesquisas Aggeu Magalhães, de acordo com os parâmetros de biossegurança para insetários e infectórios de vetores (ADEGAS *et al.*, 2005).

9 RESULTADOS

9.1 PADRÃO DE BANDAS DA RT-PCR ONE-STEP.

A análise do gel de agarose contendo as amostras dos produtos da RT- PCR One Step convencional, mostrou que para os quatro sorotipos, o fragmento amplificado possuía um tamanho de 104 pb, como ilustrado na figura 10.

Figura 10- Representação do gel de agarose contendo amostras de DNA correspondentes à região amplificada NS5 de DENV-1, DENV-2, DENV-3 E DENV-4



Legenda: as regiões NS5 amplificadas pelos primers de Kong et al. (2006) possuem 104pb para os quatro sorotipos

Fonte: O autor

9.2 TÍTULOS DE DENV NO SANGUE

Os valores dos diferentes títulos de DENV obtidos por ensaio de placas em células C6/36 encontram-se na Tabela 1. Foi observado que para DENV-1 foram de 5×10^4 FFU/ml no 1º experimento e de 2×10^5 FFU/ml no 2º experimento, para DENV-2 foram observados valores de $1,4 \times 10^5$ e 2×10^5 FFU/ml, para DENV-3 foram de 1×10^6 e 2×10^6 FFU/ml e para DENV-4 foram registrados títulos de 1×10^6 FFU/ml e 2×10^6 FFU/ml para o 1º e 2º experimento respectivamente.

Tabela 1- Títulos de DENV obtidos para cada sorotipo.

Sorotipo de DENV	Título de DENV (FFU/ml)	
	1º Experimento	2º Experimento
DENV-1	5×10^4	2×10^5
DENV-2	$1,4 \times 10^5$	2×10^5
DENV-3	1×10^6	2×10^6
DENV-4	1×10^6	2×10^6

Fonte: Dados do autor

9.3 INFECCÃO DOS MOSQUITOS COM DENV-1

Em relação à taxa de infecção do intestino, o vírus foi detectado nesse órgão aos 21dpi, atingindo 13% para o experimento com o menor título (5×10^4 FFU/ml) e 27% para o experimento com maior título (2×10^5 FFU/ml) (Tabela 2).

Quanto à disseminação do vírus, DENV-1 foi detectado na cabeça do mosquito aos 21dpi, sendo que a taxa de disseminação foi de 100% no experimento com 5×10^4 FFU/ml, e 25% no experimento com 2×10^5 FFU/ml.

A análise das glândulas salivares dos mosquitos *A. aegypti*, mostrou que para os dois experimentos, esses órgãos não chegaram a ser infectados pelo DENV-1 durante o período de incubação de 21 dias.

Tabela 2- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-1. Título do vírus (FFU/ml) no primeiro experimento (1º exp) de 5×10^4 e no segundo experimento (2º exp) de 2×10^5 .

Dias após a infecção viral (dpi)	Taxa de infecção do intestino (%)		Taxa de disseminação (%)		Competência vetorial (%)	
	1º exp	2º exp	1º exp	2º exp	1º exp.	2º exp.
7	0	0	-	-	0	0
14	0	0	-	-	0	0
21	13	27	100	25	0	0

Fonte: Dados do autor

Legenda: FFU/ml - unidade formadora de focos por ml

9.4 INFECCÃO COM DENV-2

As taxas de infecção do intestino aos 7dpi foram de 50% e 70% para o 1º e 2º experimento respectivamente. Após esse período, foi verificado um aumento da taxa de infecção do intestino, de 75% e 85% aos 14dpi. Aos 21dpi foram encontradas taxas de 75% no 1º experimento e 60% no 2º experimento (Tabela 3).

Quanto às taxas de disseminação de DENV-2, foi verificado que para os dois experimentos, estas aumentavam com o período de incubação do vírus (Tabela 3).

A percentagem de glândulas salivares infectadas (competência vetorial) nos dois experimentos foi de 5% aos 7dpi, sendo alcançada a taxa máxima de 65% aos 14 e 21dpi

Tabela 3- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-2. Título do vírus (FFU/ml) no primeiro experimento (1º exp) de $1,4 \times 10^5$ e no segundo experimento (2º exp) de 2×10^5 .

Dias após a infecção viral (dpi)	Taxa de infecção do intestino (%)		Taxa de disseminação (%)		Competência vetorial (%)	
	1º exp	2º exp	1º exp	2º exp	1º exp.	2º exp.
7	50	70	20	29	5	5
14	75	85	73	76	55	65
21	75	60	93	92	65	35

Fonte: Dados do autor

Legenda: FFU/ml - unidade formadora de focos por ml.

9.5 INFECCÃO COM DENV-3

As infecções orais com DENV-3 foram feitas com títulos de 1×10^6 FFU/ml e 2×10^6 FFU/ml. Aos 7dpi foram observadas taxas de infecção do intestino de 10% e 15%, que aumentaram com o período de incubação extrínseca do vírus, atingindo 70% (1º experimento) e 80% (2º experimento) aos 21dpi (Tabela 4).

As taxas de disseminação do vírus também aumentaram com o período de incubação extrínseca, alcançando máximos de 121% e 88% para o 1º e 2º experimento respectivamente.

Em relação às glândulas salivares, foi verificado que ocorreu infecção apenas no 1º experimento, aos 7dpi. A taxa máxima observada foi de 75% para o experimento com 1×10^6 FFU/ml e 55% para o experimento com 2×10^6 .

Tabela 4- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-3. Título do vírus (FFU/ml) no primeiro experimento (1° exp), 1×10^6 e no segundo experimento (2° exp), 2×10^6 .

Dias após a infecção viral (dpi)	Taxa de infecção do intestino (%)		Taxa de disseminação (%)		Competência vetorial (%)	
	1° exp	2° exp	1° exp	2° exp	1° exp.	2° exp.
7	10	15	50	67	5	0
14	65	65	77	77	50	45
21	70	80	121	88	75	55

Fonte: Dados do autor

Legenda:FFU/ml - unidade formadora de focos por ml

9.6 INFECCÃO COM DENV-4

Os títulos de DENV-4 usados para infectar os mosquitos da ilha de Santiago foram de 1×10^6 e 2×10^6 FFU/ml (Tabela 5).

Os resultados mostram que DENV-4 foi detectado apenas no experimento com o título de 1×10^6 FFU/ml, atingindo uma taxa de infecção do intestino de 9% aos 21dpi. O vírus não infectou a cabeça, nem as glândulas salivares do mosquito *Aedes aegypti* (Tabela 5).

Tabela 5- Taxa de infecção do intestino, disseminação e competência vetorial para DENV-4. Título do vírus (FFU/ml) no primeiro experimento (1° exp), 1×10^6 e no segundo experimento (2° exp), 2×10^6 .

Dias após a infecção viral (dpi)	Taxa de infecção do intestino (%)		Taxa de disseminação (%)		Competência vetorial (%)	
	1° exp	2° exp	1° exp	2° exp	1° exp.	2° exp.
7	0	0	-	-	0	0
14	0	0	-	-	0	0
21	9	0	0	-	0	0

Fonte: Dados do autor

Legenda: 1° exp (1° experimento); 2° exp (2° experimento); FFU/ml - unidade formadora de focos por ml; dpi- dias após infecção.

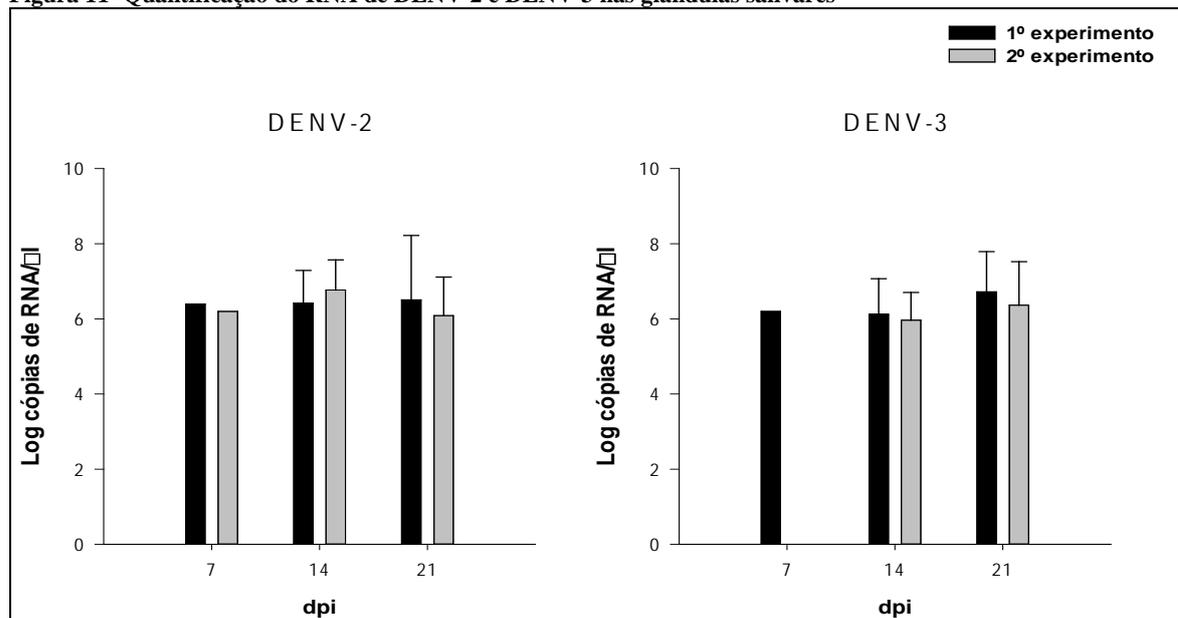
9.7 QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL

Relativamente ao DENV-2, o número de cópias de RNA viral nas glândulas salivares variou de $2,5 \times 10^6$ a $1,8 \times 10^8$ para 1° experimento, e de $1,7 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^7$ para o 2°

experimento. Para DENV-3 variou de $1,7 \times 10^6$ a $4,0 \times 10^7$ no 1º experimento, e no 2º experimento variou de $5,5 \times 10^6$ a $5,2 \times 10^7$ cópias RNA/ μ l (Figura 11).

Em relação ao DENV-2, não foram registradas diferenças estatisticamente significativas no número de cópias entre os dpi do 1º experimento ($P=0,9$; $P > 0,05$) e nem entre os dpi do 2º experimento ($P=0,1$; $P > 0,05$). A comparação entre os dois experimentos também não mostrou diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Figura 11- Quantificação do RNA de DENV-2 e DENV-3 nas glândulas salivares



Fonte: Dados do autor

Legenda: Quantificação do RNA de DENV-2 e DENV-3 nos diferentes dpi (dias após infecção). Barras de erro não aparecem aos 7dpi por n=1.

Quanto ao DENV-3, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de cópias entre os dpi do 1º experimento ($P=0,16$; $P > 0,05$) e nem entre os dpi do 2º experimento ($P=0,15$; $P > 0,05$). Além disso, não foram encontradas diferenças entre os dois experimentos ($P > 0,05$).

A comparação do número de cópias de RNA viral entre DENV-2 e DENV-3 não mostrou nenhuma diferença estatística significativa entre os dois sorotipos ($P > 0,05$).

10 DISCUSSÃO

O presente estudo corresponde à primeira avaliação da competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a quatro sorotipos do vírus Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que a população é susceptível às cepas de DENV-2 (3808/BR-PE) e DENV-3 (85469/BR-PE), mas possivelmente refratária ou possui baixa susceptibilidade ao DENV-1 (42735/BR-PE) e DENV-4 (1385) isoladas no Brasil.

A cepa de DENV-1 utilizada no estudo foi isolada no Estado de Pernambuco, Brasil, em 1997, e pertence ao genótipo América/África (CORDEIRO, 2008). Este genótipo inclui linhagens isoladas nas Américas e África que têm um grande impacto epidemiológico no mundo. Tem se espalhado rapidamente para várias regiões da América (Brasil em 1997, Colômbia, 1996; Peru, 1991, e Venezuela em 1997) (RICO-HESSE, 2003). Linhagens deste genótipo foram também detectadas na Flórida, EUA em 2009 e 2010 (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2013). Na Índia, também tem ocorrido um aumento de casos por DENV-1 e a análise filogenética de isolados do período 1962 a 2005 confirmou que todos pertencem ao genótipo América/África (PATIL *et al.*, 2011).

A transmissão de DENV-1 é também comum no continente Africano (SANG, 2006). Em meados de 2013, foram reportados em Canadá, França, Alemanha, Israel, Portugal, África do Sul e Estados Unidos, cerca de 90 casos de dengue importados de Luanda, Angola. O sequenciamento do genoma viral determinou que a cepa pertencia ao genótipo V (América/África), estreitamente relacionadas com as cepas que circulam na Costa do Marfim e América do Sul (SESSIONS *et al.*, 2013). Adicionalmente, amostras coletadas de viajantes europeus no período de 2000 a 2008 mostraram que cepas pertencentes ao genótipo América/África circulam na Costa de Marfim, Sudão e Camarões, evidenciando assim, a importância epidemiológica deste genótipo no continente africano (DOMINGO *et al.*, 2011).

No entanto, os resultados desse estudo mostram que a replicação de DENV-1 na população de *A. aegypti* da ilha de Santiago foi baixa. O vírus foi detectado no intestino e cabeça apenas aos 21dpi e com baixas taxas. Também, foi verificado que o vírus não atingiu as glândulas salivares mesmo em mosquitos com cabeças infectadas, indicando possivelmente, a presença de barreiras de infecção das glândulas salivares eficazes contra DENV-1. Em um estudo de competência vetorial com a população de Recife ao DENV-1, foi verificado que para a mesma cepa (42735/BR-PE), ocorria infecção das glândulas salivares já

aos 7dpi (GUEDES, 2012), demonstrando uma grande diferença na competência vetorial entre a população de *A. aegypti* da ilha de Santiago e de Recife, Brasil. Este comportamento observado para a população de Cabo Verde poderá ajudar a explicar o fato deste sorotipo nunca ter sido isolado no país, apesar de circular há muito tempo no continente Africano.

Contrariamente ao verificado para DENV-1, a população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago mostrou ser competente para transmitir o sorotipo DENV-2, sendo observada uma taxa de infecção das glândulas salivares máxima de 65% aos 14dpi. A análise da competência vetorial mostra também que as glândulas salivares foram infectadas logo aos 7dpi, evidenciando assim um período de incubação extrínseca curto para DENV-2. Segundo Salazar (2007), um período de incubação extrínseco curto pode ter consequências epidemiológicas importantes na transmissão da dengue, pois, quanto mais rapidamente o vírus atingir às glândulas salivares, maiores serão as probabilidades de ser transmitido a um hospedeiro durante o período de sobrevivência do vetor.

No continente africano, a maioria infecções por DENV são causadas pelo sorotipo 2, predominando o genótipo cosmopolita e o genótipo silvestre na África Ocidental (CHEN; VASILAKIS, 2011; DOMINGO et al., 2011; SANG, 2006). No entanto, a cepa de DENV-2 utilizada no presente estudo (3808/BR-PE) é representativa do genótipo Sudeste Asiático (CORDEIRO, 2008). Este genótipo foi detectado pela primeira vez nas Américas, durante uma epidemia em Cuba no ano de 1981, durante a qual milhares de casos de dengue hemorrágica foram documentados (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006). Surtos de dengue hemorrágica subsequentes surgiram no Brasil, Venezuela, Colômbia e Guiana Francesa (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2001). Considerando que a população de *A. aegypti* da ilha de Santiago também apresentou uma competência vetorial elevada para esta cepa de DENV, medidas preventivas imediatas deverão ser tomadas em Cabo Verde caso sejam detectados casos de dengue por DENV-2 sudeste asiático em países africanos vizinhos.

Em semelhança ao DENV-2, a população de *A. aegypti* mostrou alta competência vetorial para a cepa de DENV-3 (85469/BR-PE). Essa cepa foi isolada em Pernambuco, Brasil, no ano de 2002 e estudos filogenéticos mostraram que pertence ao genótipo da Índia subcontinental, segundo a classificação de Rico-Hesse (CORDEIRO, 2008) ou genótipo III segundo a classificação de Chen e Vasilakis (SILVA, 2013).

Na África, DENV-3 foi isolado pela primeira vez em 1984, durante uma epidemia de dengue em Moçambique (GUBLER *et al.*, 1986). Posteriormente, em 1993, foi detectado na Somália e áreas próximas ao Golfo Pérsico (SHARP *et al.*, 1995) e recentemente, se expandiu

para a África Ocidental, sendo isolado nos Camarões (2006), Costa de Marfim (2008), Senegal e Cabo Verde em 2009 (FRANCO *et al.*, 2010). O curto período de incubação extrínseca, e as altas taxas de infecção das glândulas salivares pelo DENV-3 observadas no presente estudo corroboram com as altas taxas de transmissão do vírus ocorridas durante a epidemia de 2009 em Cabo Verde.

A cepa de DENV-3 responsável pela epidemia de dengue em Cabo Verde não foi alvo de estudos filogenéticos, sendo por isso, desconhecido o genótipo a qual pertence. No entanto, como todas as cepas de DENV-3 detectadas na África Oriental de 1984 a 1993 e também nos casos recentes em Camarões, Costa de Marfim e Senegal (África Ocidental) pertencem ao genótipo III (FRANCO *et al.*, 2010; MESSER *et al.*, 2003), possivelmente seria este o genótipo que circulou em Cabo Verde na ocasião da epidemia.

Vazeille *et al.* (2013), avaliaram a competência vetorial de *A. aegypti* da ilha de Santiago a cepa de DENV-3 isolado na epidemia de 2009 e observaram taxas de disseminação de 80% aos 14dpi. No entanto, a análise da saliva por imunofluorescência revelou uma taxa de transmissão de apenas 20%, o que segundo os autores, poderá indicar a presença de barreira de infecção da glândula salivar. O uso da técnica de imunofluorescência em vez da RT-PCR, e da saliva em lugar das glândulas salivares no estudo de Vazeille (2013), poderão explicar as diferenças encontradas relativas ao observado no presente estudo. Por conseguinte, mais estudos serão necessários para confirmar a barreira de infecção das glândulas salivares para esta população.

Em relação ao DENV- 4, foi verificado que entre os quatro sorotipos analisados, foi o que menos se replicou no mosquito. Durante os 21 dias de incubação, o vírus só foi detectado no intestino, com uma taxa de apenas 9%, não chegando a se disseminar para a cabeça e glândulas salivares. Este resultado pode indicar que a população de *A. aegypti* de Santiago possui uma barreira de escape do intestino (MEB) eficiente contra DENV-4 e, por conseguinte, não consegue transmitir o vírus.

A cepa usada no estudo foi isolada em Roraima, Brasil, em 1982, e segundo Lanciotti, Gubler e Trent (1997), é representativo do genótipo II, estando diretamente associada com as cepas que têm circulado nas Caraíbas e América do Sul de grande importância epidemiológica. O genótipo II está presente nas Américas há mais de três décadas, e segundo Nunes *et al.* (2012), ele foi introduzido nas Caraíbas por volta de 1978 e daí, se dispersou para o Brasil (estados de Roraima e Pará), Venezuela e Colômbia.

Apesar dessa grande capacidade de dispersão do DENV-4, genótipo II, e do intenso fluxo de pessoas entre Cabo Verde e Américas, o país parece estar temporariamente “protegido” da transmissão de cepas pertencentes a esse genótipo devido a baixíssima susceptibilidade da população local de *A. aegypti* a este sorotipo.

Em relação aos diferentes títulos usados nas infecções orais, foi observado que estes influenciaram principalmente as taxas de infecção do intestino, sendo que para títulos maiores de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, foram observadas maiores taxas de infecção de intestino. 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 de intestino. No entanto, Bennett *et al.* (2002) 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. Estes estudos evidenciam que o título do vírus no sangue poderá ser importante para a taxa de infecção do intestino, mas não parece ser determinante para a disseminação do vírus para os diferentes tecidos do mosquito. No entanto, neste estudo, foi detectado no experimento com menor título viral de DENV-3 (1×10^6 FFU/ml) uma taxa de disseminação de 121% aos 21dpi e de apenas 88% no experimento com maior título viral (2×10^6 FFU/ml). Ou seja, aos 21dpi do experimento com menor título viral, foram encontrados mosquitos com RNA viral na cabeça, mas que não tinham intestinos infectados. Este resultado evidencia que para alguns títulos, a replicação do vírus ao nível da cabeça aumenta com o período de incubação extrínseca, enquanto que a replicação ao nível do intestino diminui. Este aspecto também mostrou ser importante para a competência vetorial, pois, no experimento em que sucedeu, a taxa de infecção das glândulas salivares foi superior (75%) relativamente ao experimento com maior título viral (55%). No estudo de Salazar *et al.*, (2007), também foi verificado que para DENV-2 ocorria uma diminuição da percentagem de mosquitos com intestinos infectados a partir do 10º dpi, enquanto que o número de cabeças infectadas aumentava a partir do 14º dpi. Futuramente, mais experimentos com diferentes títulos de DENV terão de ser realizados para a melhor compreensão deste fenômeno e a sua importância para a competência vetorial.

Interessantemente, em relação à quantificação do RNA viral presente nas glândulas salivares, os resultados mostraram que esta se mantinha constante após atingir esses órgãos e isso ocorreu independente do título no sangue. Esse resultado tem uma grande importância epidemiológica, pois, evidencia, primeiro que a quantidade de vírus nas glândulas salivares é

independente do título no sangue do hospedeiro no qual o mosquito se alimenta, e segundo, que o mosquito mantém a sua capacidade de vetor de DENV durante todo o seu período de sobrevivência. A análise da quantidade de cópias do RNA viral em três populações de *Aedes aegypti* do estado de Pernambuco também mostrou que não havia diferenças significativas na carga viral das glândulas salivares (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012). Segundo Salazar *et al.* (2007), o fato de o número de cópias de RNA do vírus se manter relativamente constante, pode também sugerir algum mecanismo de persistência e modulação da replicação viral ao nível das glândulas salivares. Entretanto, mais estudos deverão ser realizados para compreender melhor as interações entre as populações naturais de *A. aegypti* e os diferentes sorotipos de DENV, no intuito de disponibilizar informações para a construção de modelos preditivos de risco epidemiológico de transmissão da dengue nos diferentes contextos biogeográficos.

11 CONCLUSÕES

Conclui-se, que a população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, possui alta competência vetorial para a cepa DENV-2 (3808/BR-PE) e DENV-3 (85469/BR-PE), mas possui baixa susceptibilidade ao DENV-1 (42735/BR-PE) e DENV-4 (1385).

As cópias de RNA viral nas glândulas salivares mantêm-se relativamente constantes por 21 dias após infecção, habilidade essa que pode potencializar a capacidade vetorial da população local do mosquito *A. Aegypti*, e sugere a presença de um mecanismo modulador da replicação do vírus neste órgão.

Os resultados do estudo também sugerem que há variações na interação entre *A. aegypti* e os diferentes sorotipos de DENV e a identificação da base molecular dessa variabilidade poderá futuramente permitir o desenvolvimento de novas estratégias no campo da biologia molecular para impedir a replicação de DENV no mosquito vetor *Aedes aegypti*.

Para o controle e prevenção da dengue no continente africano será essencial uma maior aposta nos programas de monitoramento e controle dos principais vetores do vírus Dengue, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Por outro lado, a prevenção também passa pelo melhor entendimento da epidemiologia da dengue nesse continente, e para isso, recomenda-se o aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico laboratorial de forma a ter uma estimativa real da prevalência da doença no continente. Também, recomenda-se a genotipagem das cepas de DENV isoladas, fazer inquéritos sorológicos retroativos para elucidar o histórico de circulação dos vários sorotipos, e por último avaliar a competência vetorial das populações de vetores, de forma a acessar o risco de futuras transmissões do vírus no continente.

REFERÊNCIAS

- ADEGAS, M. G. et al. Parâmetros de biossegurança para projeto de insetários e infectórios de vetores: aplicação e adaptação das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissão técnica de Biossegurança da Fiocruz. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.
- ALVES, J. et al. Mosquito fauna on the Cape Verde Islands (West Africa): an update on species distribution and a new finding. Journal of vector ecology, Santa Ana, v. 35, n. 2, p. 307-312, 2010.
- AMARASINGHE, A. et al. Dengue virus infection in Africa. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 17, n. 8, p. 1349-1354, 2011.
- ANDERSON, J. R.; RICO-HESSE, R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 75, n. 5, p. 886-892, 2006.
- ARIMA, Y. et al. Epidemiologic update on the dengue situation in the Western Pacific Region, 2011. Western Pacific Surveillance Response Journal, Manila, v. 4, n. 2, p. 47-54, 2013.
- ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. Vector borne and zoonotic diseases, New York, v. 1, n. 2, p. 159-168, 2001.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. Estudos Avançados, São Paulo, v. 22, n. 64, 2008.
- BARTENSCHLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. Future microbiology, London, v. 3, n. 2, p. 155-165, 2008.
- BARTH, O. M. Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2000.
- BEHURA, S. K. et al. Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 5, n. 11, p. e1385, 2011.
- BENNETT, K. E. et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 67, n. 1, p. 85-92, 2002.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. Nature, London, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BHATTACHARYA, M. K. et al. Dengue: a growing menace - a snapshot of recent facts, figures & remedies. International journal of biomedical science, California, v. 9, n. 2, p. 61-67, 2013.

BLACK, W. C. T. et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Archives of medical research, New York, v. 33, n. 4, p. 379-388, 2002.

BOSIO, C. F.; BEATY, B. J.; BLACK, W. C. T. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 59, n. 6, p. 965-970, 1998.

BROWN, J. E. et al. Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes Aegypti*, the Dengue and Yellow Fever Mosquito. Evolution, Lancaster, v. 68, n. 2, p. 514-525, 2013.

CABO VERDE. Secretariado Executivo para o Ambiente. Comunicação Nacional sobre as Mudanças Climáticas. Praia: Ministério da Agricultura, Alimentação e Ambiente, 1999.

CABO VERDE. Ministério do Ambiente Agricultura e Pescas. Livro Branco sobre o estado do ambiente em Cabo Verde. Praia: Direção Geral do Ambiente, 2004.

CABO VERDE. Ministério da Saúde. Gabinete de Estudos, Planeamento e Cooperação. Relatório Estatístico 2009. Praia, 2010.

_____. Relatório Estatístico 2010. Praia, 2011.

CAREY, D. E. et al. Dengue viruses from febrile patients in Nigeria, 1964-68. Lancet, London, v. 1, n. 7690, p. 105-106, 1971.

CARRINGTON, L. B. et al. Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 88, n. 4, p. 689-697, 2013.

CARVALHO-LEANDRO, D. et al. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. Acta Tropica, Amsterdam, v. 124, n. 2, p. 113-119, 2012.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). Public Health Image Library. Disponível em: < <http://phil.cdc.gov/phil>>. Acesso em: 21 nov. 2013.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue--quo tu et quo vadis? Viruses, Basel, v. 3, n. 9, p. 1562-1608, 2011.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.): The Yellow Fever Mosquito. Virginia: University Press, 1960.

CLEMENTS, A. N. The Biology of Mosquitoes: Sensory reception and behaviour. Cambridge: Chapman & Hall, 1999.

CONSOLI, R. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

CORDEIRO, M. T. Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987-2006: Epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

COX, J.; BROWN, H. E.; RICO-HESSE, R. Variation in Vector Competence for Dengue Viruses Does Not Depend on Mosquito Midgut Binding Affinity. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e1172, 2011.

DAS, S. et al. Protocol for dengue infections in mosquitoes (*A. aegypti*) and infection phenotype determination. Journal of Visualized Experiments, Cambridge, n. 5, p. 220, 2007.

DIALLO, M. et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 9, n. 3, p. 362-367, 2003.

_____. Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 73, n. 2, p. 445-449, 2005.

DIMOPOULOS, G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. Cellular microbiology, Oxford, v. 5, n. 1, p. 3-14, 2003.

DOMINGO, C. et al. Molecular surveillance of circulating dengue genotypes through European travelers. Journal of Travel Medicine, Hamilton, v. 18, n. 3, p. 183-190, 2011.

DUARTE, E. H. et al. Reproduction of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Santa Cruz, Santiago island, Cape Verde Islands. Zoologia Caboverdiana, Praia, v. 3, n. 1, p. 29-36, 2012.

ELDRIDGE, B. F.; EDMAN, J. D. Medical Entomology: A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods. Dordrecht: Springer, 2003.

FERREIRA, G. L. Global dengue epidemiology trends. Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 54, p. 5-6, 2012.

FRANCO, L. et al. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. Euro surveillance, Saint-Maurice, v. 15, n. 7, p. 19490, 2010.

_____. First report of sylvatic DENV-2-associated dengue hemorrhagic fever in West Africa. PLoS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e1251, 2011.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. British medical journal, London, v. 324, n. 7353, p. 1563-1566, 2002.

GÓMEZ, L. F. et al. Bioecologia e controlo vetorial de Culicidae em Cabo Verde. Praia: Ministério de Ensino Superior, Ciência e Inovação, 2013.

GRIMSTAD, P. R.; PAULSON, S. L.; CRAIG, G. B., JR. Vector competence of *Aedes hendersoni* (Diptera: Culicidae) for La Crosse virus and evidence of a salivary-gland escape barrier. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 22, n. 4, p. 447-453, 1985.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

_____. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. Novartis Found Symposium, Basel, v. 277, p. 3-16, 2006.

_____. The economic burden of dengue. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 86, n. 5, p. 743-744, 2012.

GUBLER, D. J. et al. Dengue 3 virus transmission in Africa. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 35, n. 6, p. 1280-1284, 1986.

GUEDES, D. R. D. Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco. 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. Emerging themes in epidemiology, London, v. 2, n. 1, p. 1, 2005.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. Nature reviews microbiology, London, v. 8, n. 12, Suppl., p. S7-16, 2010.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. The Yale journal of biology and medicine, New Haven, v. 42, n. 5, p. 350-362, 1970.

_____. Dengue. Lancet, London, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HALSTEAD, S. B. et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 65, n. 3, p. 180-183, 2001.

HIGA, Y. Dengue Vectors and their Spatial Distribution. Tropical Medicine and Health, Nagasaki, v. 39, n. 4, p. 17-27, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA. Censo 2010. Praia, 2010.

KLIKS, S. C. et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 40, n. 4, p. 444-451, 1989.

KOKERNOT, R. H., SMITHBURN, K.C., WEINBREN, M.P. Neutralising antibodies to arthropod-borne viruses in human and animals in the Union of South Africa. The Journal of Immunology, Maryland, v. 77, p. 313–323, 1956.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. Journal of virological methods, Amsterdam, v. 138, n. 1-2, p. 123-130, 2006.

LAMBRECHTS, L. et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. BMC evolutionary biology, London, v. 9, p. 160, 2009.

_____. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 108, n. 18, p. 7460-7465, 2011.

_____. Specificity of resistance to dengue virus isolates is associated with genotypes of the mosquito antiviral gene Dicer-2. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society, London, v. 280, n. 1751, p. 20122437, 2013.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. Journal of General Virology, London, v. 78, pt. 9, p. 2279-2284, 1997.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. Journal of virology, Washington, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

MATTINGLY, P. F. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. I. Taxonom: and bionomics. Annals of tropical medicine and parasitology, Liverpool, v. 51, n. 4, p. 392-408, 1957.

MCCLELLAND, G. A. H. A worldwide survey of variation in scale pattern of the abdominal tergum of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Transactions of the Royal Entomological Society of London, London, v. 126, n. 2, p. 239-259, 1974.

MERCADO-CURIEL, R. F.; BLACK, W. C. T.; MUNOZ, L. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. BMC microbiology, London, v. 8, p. 118, 2008.

MESSER, W. B. et al. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 9, n. 7, p. 800-809, 2003.

MILLER, B. R.; MITCHELL, C. J. Genetic selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 399-407, 1991.

MONCAYO, A. C. et al. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 10, n. 10, p. 1790-1796, 2004.

MOORE, M. et al. Dual African origins of global *Aedes aegypti* s.l. populations revealed by mitochondrial DNA. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e2175, 2013.

MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. Genetic relatedness of dengue viruses in Key West, Florida, USA, 2009-2010. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 19, n. 4, p. 652-654, 2013.

MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. Journal of clinical epidemiology, Oxford, v. 5, p. 299-309, 2013.

NASIDI, A. et al. Urban yellow fever epidemic in western Nigeria, 1987. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 83, n. 3, p. 401-406, 1989.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. Science, Washington, v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

NUNES, M. R. et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 18, n. 11, p. 1858-1864, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva. 2009.

_____. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Nova Deli: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 2011.

_____. Dengue, countries or areas at risk, 2011. Geneva, 2012a. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png>. Acesso em: 22 jun. 2013.

_____. Global Strategy For Dengue Prevention And Control, 2012-2020. Geneva: WHO Press, 2012b.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Dengue Regional Information: Number of Cases. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363>. Acesso em: 8 dez. 2013.

PATIL, J. A. et al. Evolutionary dynamics of the American African genotype of dengue type 1 virus in India (1962-2005). Infection, genetics and evolution, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 1443-1448, 2011.

PAULSON, S. L.; GRIMSTAD, P. R.; CRAIG, G. B. Midgut and salivary gland barriers to La Crosse virus dissemination in mosquitoes of the *Aedes triseriatus* group. Medical and veterinary entomology, Oxford, v. 3, n. 2, p. 113-123, 1989.

RAMIREZ, J. L. et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e1561, 2012.

- REGIS, L. et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.
- RIBEIRO, H. et al. Os mosquitos de Cabo Verde, Sistemática, Distribuição, Bioecologia, e Importância Médica. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1980. (Estudos, Ensaios e Documentos, n. 135).
- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. Advances in virus research, New York, v. 59, p. 315-341, 2003.
- SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC microbiology, London, v. 7, p. 9, 2007.
- SANCHEZ-VARGAS, I. et al. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. PloS pathogens, San Francisco, v. 5, n. 2, p. e1000299, 2009.
- SANG, R. Dengue in Africa. In: REPORT OF THE SCIENTIFIC WORKING GROUP MEETING ON DENGUE, 2006, Geneva. Special programme for research and training in tropical diseases. Geneva: OMS, 2007. p. 50-52. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-swg.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2013.
- SCHATZMAYR, H. G. Aspectos Históricos da Dengue e seus vetores. In: SOUZA, L. J. Dengue: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção. Rio de Janeiro: Rubio, 2008. p. 20-30.
- SESSIONS, O. M. et al. Exploring the origin and potential for spread of the 2013 dengue outbreak in Luanda, Angola. Global Health Action, Höggeby, v. 6, p. 21822, 2013.
- SHARP, T. W. et al. Dengue fever in U.S. troops during Operation Restore Hope, Somalia, 1992-1993. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 53, n. 1, p. 89-94, 1995.
- SILVA, A. Caracterização Molecular dos vírus Dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública)- Centro Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
- SIM, S.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. PloS pathogens, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e1002631, 2012.
- SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.
- SYLLA, M. et al. Gene flow, subspecies composition, and dengue virus-2 susceptibility among *Aedes aegypti* collections in Senegal. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 3, n. 4, p. e408, 2009.

TABACHNICK, W. J. Evolutionary Genetics and Arthropod-borne Disease: The Yellow Fever Mosquito. American Entomologist, Maryland, v. 37, n. 1, p. 14-26, 1991.

THEPPARIT, C.; SMITH, D. R. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. Journal of virology, Washington, v. 78, n. 22, p. 12647-12656, 2004.

TORRES, E. M. Dengue. Estudos Avançados, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 33-52, 2008.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. Nature reviews microbiology, London, v. 9, n. 7, p. 532-541, 2011.

VASILAKIS, N.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Sylvatic dengue virus type 2 activity in humans, Nigeria, 1966. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 14, n. 3, p. 502-504, 2008.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. The history and evolution of human dengue emergence. Advances in virus research, New York, v. 72, p. 1-76, 2008.

VAZEILLE-FALCOZ, M. et al. Oral receptivity of *Aedes aegypti formosus* from Franceville (Gabon, central Africa) for type 2 dengue virus. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales, Paris, v. 92, n. 5, p. 341-342, 1999.

VAZEILLE, M. et al. Oral receptivity of *Aedes aegypti* from Cape Verde for yellow fever, dengue, and chikungunya viruses. Vector borne and zoonotic diseases, Larchmont, v. 13, n. 1, p. 37-40, 2013.

WAHALA, W. M. P. B.; DE SILVA, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. Viruses, Basel, v. 3, n. 12, p. 2374-2395, 2011.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. Journal of virology, Washington, v. 74, n. 7, p. 3227-3234, 2000.

WERE, F. The dengue situation in Africa. Paediatrics and international child health, London, v. 32 suppl. 1, p. 18-21, 2012.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PloS pathogens, San Francisco, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.