

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**O Estudo da Competência Vetorial das Populações de *Aedes aegypti* da
Cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue vírus 2***

por

Caroline Macedo Gonçalves

Belo Horizonte

Fevereiro/2010

DISSERTAÇÃO MBCM - CPqRR C.M.GONÇALVES 2010

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**O Estudo da Competência Vetorial das Populações de *Aedes aegypti* da
Cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue vírus 2***

por

Caroline Macedo Gonçalves

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.**

Orientação: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Co-Orientação: Dr. Breno de Mello Silva

Belo Horizonte

Fevereiro/2010

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

G635e
2010

Gonçalves, Caroline Macedo.

O estudo da competência vetorial das populações de *Aedes aegypti* da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue vírus 2* / Caroline Macedo Gonçalves. – Belo Horizonte, 2010.

xvii, 78 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 84 - 95

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue/prevenção & controle 2. *Aedes*/crescimento & desenvolvimento 3. Vírus da dengue/patogenicidade 4. Vetores de doenças/classificação I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientação). III. Silva, Breno de Mello (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**O Estudo da Competência Vetorial das Populações de *Aedes aegypti* da Cidade de
Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue virus 2***

por

Caroline Macedo Gonçalves

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Presidente)

Prof. Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Prof. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Prof. Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em: 25/02/2010.

Colaboradores

Secretaria Estadual da Saúde – SES

Dr. Eduardo Pessanha

Apoio

Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR – Fiocruz)

Suporte Financeiro

CAPES

CNPq

FAPEMIG

PRONEX

Fundação Bill e Melinda Gates

Dedico com todo amor

Ao meu pai Pedro Paulo, à minha mãe Marilene
e ao meu irmão Bruno por serem as pessoas que mais
amam neste mundo e que tanto torceram por mim

Ofereço com muito carinho

À minha segunda família
Paulo, Léa, Denise e meu querido Rafael.

Agradecimentos

A Deus pelo refúgio, coragem e força.

Ao orientador Paulo Pimenta pela oportunidade, confiança e pelos ensinamentos.

Ao Breno Mello por todos os ensinamentos e pela grande ajuda em todas as etapas deste projeto.

A Nágila Secundino pelo apoio e pelas sugestões.

As amigas do grupo dengue, Helena, Luciana e Sabrina pela grande ajuda nos experimentos.

A Secretária de Estado da Saúde, em especial ao Dr. Eduardo Pessanha, pela colaboração e confiança.

A todos do LEM, em especial àqueles que colaboraram para a realização deste trabalho.

As secretárias Érika, Cris e Andrea pela ajuda e suporte.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

A coordenação de Pós Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou e professores.

A turma do M.A.L. e grandes amigas, Azza, Zile e Galega, pelos momentos de descontração.

A minha grande amiga Léa pelo carinho e apoio.

Ao Fábio e Luiz pela grande amizade e credibilidade que sempre depositaram mim.

Aos amigos de Curvelo que sempre torcerem por minhas vitórias e pela amizade de tantos anos, aos amigos de BH, em especial a Grasi e ao Fernando.

Ao meu amor e melhor amigo Rafael, por toda paciência, força, apoio e carinho.

Aos meus pais, Marilene e Pedro Paulo, ao meu irmão Bruno e aos familiares, em especial as tias Gisca e Ângela pela força, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca, Constância e Jaqueline, por contribuírem na avaliação deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz e Ministério da saúde pelo suporte.

Sumário

Lista de figuras	XI
Lista de tabelas	XIII
Lista de abreviaturas e símbolos	XIV
Resumo	XVI
Abstract	XVII
1 Introdução	18
1.1 Estado da Arte	18
1.2 A Doença	19
1.2.1 Relevância	19
1.2.2 Dengue no Brasil	21
1.2.3 Situação atual da Dengue em Minas Gerais	22
1.2.4 Dengue e seu controle em Belo Horizonte	23
1.2.5 Manifestações Clínicas	27
1.2.5.1 Febre do Dengue	28
1.2.5.2 Febre Hemorrágica do Dengue	29
1.2.5.3 Síndrome de Choque por Dengue	29
1.3 Ciclo de transmissão	31
1.4 Controle e Prevenção	32
1.5 O Vetor	33
1.5.1 Vetor primário: <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> - Linnaeus, 1762	33
1.5.2 Vetor secundário: <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> – Skuse, 1894	34
1.5.3 Biologia do vetor	35
1.6 Agente etiológico	36
1.6.1 Gênero <i>Flavivirus</i>	36
1.6.2 <i>Dengue virus</i>	37
1.6.3 Ciclo replicativo	40
1.6.4 Infecção do DENV no mosquito vetor	41
1.7 Transmissão transovariana	42
1.8 Competência e Capacidade vetorial	42
2 Justificativa	45
3 Objetivos	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 Metodologia	47
4.1 Manutenção das populações de mosquitos	47
4.2 Células e vírus	47
4.2.1 Células C6/36	47
4.2.2 Vírus	48
4.3 Multiplicação viral	48

4.4 Titulação viral -----	48
4.5 Infecção dos mosquitos -----	49
4.6 Dissecção dos mosquitos -----	50
4.7 Extração de RNA -----	50
4.8 RT-PCR -----	50
4.8.1 RT-PCR “One Step” (Qiagen) -----	50
4.8.1.1 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% -----	52
4.8.2 “Semi-nested” RT-PCR (Lanciotti, 1992) -----	52
4.8.2.1 Transcrição reversa (RT) -----	52
4.8.2.2 PCR -----	53
4.8.2.3 Eletroforese em gel de acrilamida a 0,8% -----	55
4.9 Análise da transmissão vertical natural -----	55
4.10 Análise da competência vetorial -----	55
4.11 Delineamento Experimental -----	57
5 Resultados -----	58
5.1 Avaliação da viabilidade da utilização de amostras congeladas de DENV-2 na infecção artificial de mosquitos.-----	58
5.2 Análise da praticidade de duas técnicas de RT-PCR para detecção de DENV: Lanciotti (Lanciotti, 1992) X “One Step”-----	59
5.3 Colonização e infecção dos mosquitos -----	62
5.4 Determinação da taxa de transmissão vertical natural das populações estudadas	64
5.5 Análise comparativa da barreira de infecção (MIB), barreira de escape (MEB) e competência vetorial (CV) entre as populações de mosquitos estudadas após alimentação infectante com DENV-2.-----	66
6 Discussão -----	71
7 Conclusões -----	83
8 Referências Bibliográficas -----	84

Lista de figuras

Figura 1: Emergência da Febre do Dengue e da Febre Hemorrágica do Dengue após a década de 60-----	19
Figura 2: Distribuição mundial da dengue e do vetor <i>A. aegypti</i> no mundo em 2008-----	20
Figura 3: Mapa dos distritos sanitários e áreas de abrangência das unidades básicas de saúde, município de Belo Horizonte, MG-----	25
Figura 4: Casos confirmados de Dengue, por semana, nas nove regionais de Belo Horizonte no ano de 2009-----	27
Figura 5: Pirâmide que representa as doenças causadas pelas infecções de Dengue ---	30
Figura 6: Ciclo de transmissão do <i>Dengue virus</i> -----	32
Figura 7: <i>Aedes aegypti</i> -----	33
Figura 8: <i>Aedes albopictus</i> -----	35
Figura 9: Desenho esquemático mostrando os estágios de desenvolvimento do <i>A. aegypti</i> -----	35
Figura 10: Desenho esquemático mostrando a partícula viral -----	37
Figura 11: Esquema do <i>Dengue virus</i> maduro -----	39
Figura 12: Estrutura e expressão do genoma dos <i>Flavivirus</i> -----	39
Figura 13: Ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i> -----	40
Figura 14: Etapas necessárias para a infecção por <i>Flavivirus</i> e transmissão pelo vetor -----	41
Figura 15: Barreiras naturais à infecção pelo <i>Dengue virus</i> -----	43
Figura 16: Desenho esquemático da placa de titulação -----	49
Figura 17: Detecção de DENV-2, na população de <i>A. aegypti</i> da colônia do LEM, através da RT-PCR desenvolvida por Lanciotti, 1992. -----	60
Figura 18: Detecção de DENV-2, na população de <i>A. aegypti</i> da colônia do LEM, através da RT-PCR “One Step” (Qiagen)-----	61
Figura 19: Análise dos pools de <i>A. aegypti</i> para determinação das taxas de transmissão vertical natural-----	65

Figura 20: Gráficos ilustrando as análises comparativas da barreira de infecção (MIB), barreira de escape (MEB) e competência vetorial (CV) entre as populações de *A. aegypti* das regionais Norte (N), Venda Nova (VN), Oeste (O), Centro-Sul (CS) e Barreiro (B) ----- 68

Figura 21: Gráficos ilustrando as análises comparativas da barreira de infecção (MIB), barreira de escape (MEB) e competência vetorial (CV) entre as populações de *A. aegypti* das regionais Nordeste (NE), Leste (L), Pampulha (P) e Noroeste (NO) ----- 70

Lista de tabelas

Tabela 1: Reagentes utilizados para realização da PCR One Step – Qiagen -----	51
Tabela 2: Reagentes utilizados para a produção do mix da transcrição reversa-----	53
Tabela 3: Iniciadores usados para amplificar e sorotipar DENV -----	53
Tabela 4: Reagentes utilizados para realização da PCR desenvolvida por Lanciotti, 1992-----	54
Tabela 5: Condições dos ciclos das 1ª PCR e 2ª PCR desenvolvida por Lanciotti, 1992 -----	54
Tabela 6: Análise comparativa dos índices de infecção das duas populações de <i>A. aegypti</i> alimentadas com DENV congelado e fresco-----	58
Tabela 7: Populações de <i>A. aegypti</i> analisadas para a competência vetorial -----	63
Tabela 8: Relação dos títulos virais dos quatro repastos infectantes com DENV fresco -----	63
Tabela 9: Valores brutos de MIB, MEB e CV utilizados para a confecção dos gráficos -----	66

Lista de abreviaturas e símbolos

%: porcentagem

µl: microlitros

°C: graus Celsius

Å: angstrom

cDNA: DNA complementar

CG: complexo de glogi

cm²: centímetros quadrados

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

CV: competência vetorial

DENV: *Dengue virus*

DENV-1: *Dengue virus* 1

DENV-2: *Dengue virus* 2

DENV-3: *Dengue virus* 3

DENV-4: *Dengue virus* 4

DIR: taxa de disseminação do intestino

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatos

DS: Distritos Sanitários

F1: primeira filial (geração)

FD: Febre do dengue

FHD: Febre Hemorrágica do dengue

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

JEV: vírus da encefalite japonesa

kb: quilobase

L15: meio Leibowitz-15

LEM: Laboratório de Entomologia Médica

LIRAA: Levantamento Rápido de Índices de Infestação para *A. aegypti*.

MEB: barreira de escape do intestino médio

MG: Minas Gerais

MIB: barreira do intestino médio

MIR: taxa de infecção do intestino

mL: mililitros
mm: milímetros
nm: nanômetro
NS: proteína não estrutural
OMS: Organização Mundial de Saúde
pb: pares de base
PBS: tampão fosfato salina
PCR: reação em cadeia da polimerase
PIE: período de incubação extrínseco
Proteína prM: proteína precursora da membrana
Proteína C: proteína do capsídeo
Proteína E: proteína do envelope
Proteína M: proteína da membrana
RE: retículo endoplasmático
RNA: ácido ribonucléico
RT: transcrição reversa
RT-PCR: transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase
RVFV: vírus da febre do Rift Valley
SCD: Síndrome de Choque por Dengue
SES-MG: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais
SFB: soro fetal bovino
SLEV: vírus da encefalite de Saint Louis
SMS-BH: Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte
TBEV: vírus da encefalite causada por carrapatos
TCID₅₀: dose (50) infectante de cultura de tecido
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
WHO: World Health Organization
WNV: Vírus West Nile
YFV: Vírus da febre amarela

Resumo

A Dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e a principal arbovirose que atinge o homem. A doença é encontrada em mais de 100 países e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (WHO, 2008). Sendo assim, seu principal vetor nas Américas, o *A. aegypti*, tem sido objeto de inúmeros estudos por apresentar ampla variação na sua competência vetorial para DENV dentro e entre populações por todo o mundo. A competência vetorial é definida como um mecanismo intrínseco do vetor para infecção, replicação e transmissão do vírus e está associada com o número de barreiras anatômicas que determinam a eficiência da infecção no vetor (Black IV *et al.*, 2002). Este estudo é pioneiro no Brasil e analisou a competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte, para o DENV-2. Um total de 300 fêmeas de *A. aegypti*, de cada uma das regionais, foram submetidas a um repasto sanguíneo infectante com o DENV-2. Após 14 dias, amostras de 40 mosquitos fêmeas representativas de cada uma das regionais, foram dissecadas a partir da separação da cabeça e do corpo. A presença do vírus no corpo e na cabeça dos mosquitos foi verificada através da RT-PCR “One Step” utilizando iniciadores específicos para o DENV-2. Sendo assim, dentre as populações analisadas a com maior e menor barreira de infecção (MIB) foi a Pampulha (93%) e a Norte (18%), respectivamente. Já a população com maior e menor barreira de escape foi a Venda Nova (50%) e a Centro-Sul (1%), respectivamente. Por fim, verificou-se que a população com maior competência vetorial foi a da regional Norte (70%) seguida pela Oeste (30%), Centro-Sul (25%), Barreiro (25%), Venda Nova (15%), Leste (13%), Noroeste (10%), Nordeste (5%) e a com menor foi a da Pampulha (3%). Com estes resultados, medidas de controle do vetor poderão ser reforçadas nas regionais que possuem populações de *A. aegypti* com maior competência para transmitir o DENV.

Abstract

Dengue is one of the main public health problems in the world and also the main arbovirus that infects humans. This disease is found in over 100 countries and approximately 2.5 billion people live in endemic areas (WHO, 2008). For this reason, the main vector in the America Continent, the *A. aegypti*, has been the object of various studies, since it shows a wide range of vector competence towards the DENV inside and among populations around the whole world. Vector competence is defined as the vector's intrinsic mechanism to infection, replication and transmission of the virus and is associated with the quantity of anatomical barriers that determine the efficiency of the vector's infection (Black IV *et al.*, 2002). This study is pioneer in Brazil and analyzed the vector competence of *A. aegypti* population in the city of Belo Horizonte for infection of the DENV-2. A total of 300 *A. aegypti* females of each of the nine regions where submitted to a infective blood meal with DENV-2. After 14 days samples of 40 female mosquitoes from each of the nine regions where dissected with the separation of the head and body. The presence of the virus in the body and the head of the mosquitoes were made possible using the RT-PCR "One Step" with specific primers for the dengue virus 2. This being, among the population analyzed the population with the most and least midgut infection barrier (MIB) was Pampulha (93%) and Norte (18%), respectively. The population with the most and least midgut escape barrier (MEB) was Venda Nova (50%) and Centro-Sul (1%) respectively. It was also verified that the population with the highest percentage of vector competence (VC) was from the region Norte (70%), followed by Oeste (30%), Centro-Sul (25%), Barreio (25%), Venda Nova (15%), Noroeste (10%) and the region with the least vector competence was Pampulha (3%). With these results, vector control measures can be reinforced in the regions the have *A. aegypti* with the most capabilities the transmit the DENV.

1 Introdução

1.1 Estado da Arte

Os primeiros registros encontrados sobre os sintomas semelhantes à “Dengue atual” foram descritos na enciclopédia chinesa publicada durante a Dinastia da China Jin (265 a 420 A.D.). A doença foi chamada de “veneno da água” pelos chineses, pois suspeitavam que ela estava relacionada com insetos associados à água (Howe GM, 1977 e Gubler DJ, 1998).

Mais tarde ao final do século XVII surgiram relatos de uma enfermidade semelhante à Dengue. Estes foram descritos simultaneamente em 1779 em três distintos continentes: Batávia (Indonésia- Ásia), Cairo (Egito- África) e Filadélfia (Estados Unidos da América- Américas). Tais fatos indicam que tanto o *Dengue virus* (DENV), quanto o mosquito vetor já apresentavam uma distribuição mundial na região dos trópicos há mais de duzentos anos (Henchal EA, 1990).

Nas Américas, o DENV circulou desde o século XIX até as primeiras décadas do século XX. Na década de 50 ocorreu um silêncio epidemiológico, registrando-se nos anos 60 a reintrodução dos sorotipos 2 e 3, associada à ocorrência de várias epidemias de dengue clássico. Em 1963, foram detectados os primeiros casos de DENV-3 na Jamaica, que depois se disseminou para a Martinica, Curaçau, Antigua, Saint Kitts, Sanguilla e Porto Rico (Teixeira MG, 1999).

Já nas duas décadas seguintes 80 e 90 a transmissão da Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) se intensificou, ocorrendo uma expansão territorial do vetor e do vírus (Gubler DJ, 1998 e Gubler DJ, 1995). A distribuição da doença pode ser observada na figura 1.

Emergência da FD e FHD

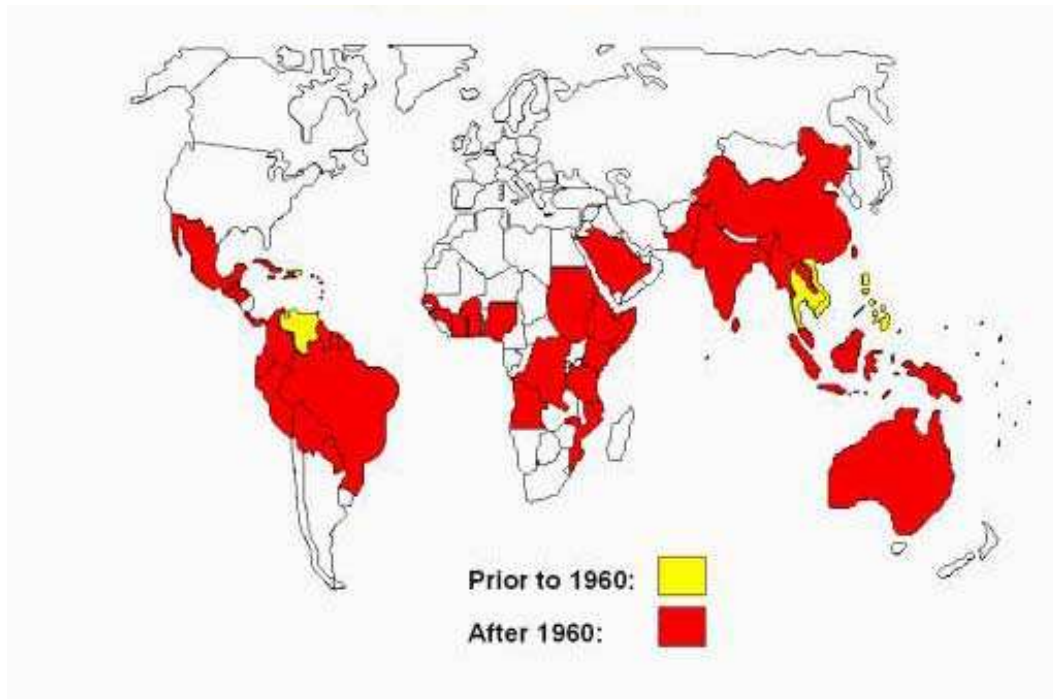


Figura 1: Emergência da Febre do Dengue e da Febre Hemorrágica do Dengue após a década de 60 (WHO, 2009).

O evento epidemiológico mais relevante na história do Dengue nas Américas foi a epidemia de FHD/SCD (Síndrome do Choque do Dengue) que ocorreu em Cuba, no ano de 1981. O DENV-2 estava associado a esta epidemia que foi precedida por outra, causada pelo DENV-1, em 1977. No ano de 1982, Cuba implantou um programa de erradicação do *A. aegypti* e manteve índices de infestação próximos a zero até os primeiros anos da década de 90. Entretanto em 1997 uma nova epidemia foi documentada na província de Santiago de Cuba (Teixeira MG, 1999).

1.2 A Doença

1.2.1 Relevância

O termo Dengue é hoje utilizado para descrever a etiologia da doença. Derivou-se de uma epidemia que ocorreu nas Índias Ocidentais Espanholas em 1927 e 1928 a partir da expressão swahili "*ki dengu pepo*". Essa expressão descrevia ataques causados por maus espíritos e, inicialmente, foi usada para descrever a enfermidade. A Dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e uma das mais importantes

arboviroses (grupos de infecções virais transmitidas por artrópodes) que atinge o homem (Holmes EC *et al.*, 1998 e Teixeira MG, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco de contrair Dengue no mundo e que anualmente 50 milhões de pessoas se infectam, com cerca de 500 mil casos de FHD com 21 mil óbitos, principalmente de crianças (WHO, 2008).

A Dengue está distribuída por todo o mundo atingindo regiões tropicais e subtropicais em associação com o mosquito vetor, o *A. aegypti*, predominando em áreas urbanas, semi-urbanas e atualmente em áreas rurais (Mercado-Curiel RF *et al*, 2008, Chaturvedi UC, 2006, Borges SMAA, 2001, Forattini OP, 1992). A figura 2 ilustra a distribuição mundial da Dengue e do seu vetor, *A. aegypti*, no mundo em 2008.



Figura 2: Distribuição mundial da Dengue e do vetor *A. aegypti* no mundo em 2008.
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2009)

A Dengue está associada ao grande crescimento urbano e possui grande impacto econômico, social e político. A urbanização não controlada e o aumento das viagens internacionais para o transporte de pessoas e para a importação e exportação de produtos aumentam a chance da introdução do DENV, isso pode ocorrer através da disseminação de ovos e migração de paciente de uma área endêmica para áreas com alta incidência do vetor. Estes fatores explicam a persistência da Dengue no século XX e XXI (Harris E, 2008 e Igarashi A, 1997)

1.2.2 Dengue no Brasil

No Brasil, há relatos de epidemias de Dengue, no estado de São Paulo em 1916 e em Niterói (Rio de Janeiro) em 1923, todavia sem confirmação laboratorial. A doença foi praticamente eliminada entre as décadas de 50 e 70 em virtude do combate ao vetor durante a campanha de erradicação da febre amarela. Observou-se a reinfestação do vetor em 1967, provavelmente originada a partir dos países vizinhos (Venezuela e Colômbia), que não obtiveram êxito em sua erradicação (Fraiha H, 1968).

A primeira epidemia de Dengue, no Brasil, ocorreu no período de 1981 a 1982, na cidade de Boa Vista (Roraima) com cerca de 11 mil casos da doença. Foram isolados dois sorotipos do vírus, DENV-1 e o DENV-4. Estes sorotipos estavam circulando em diversos países do Caribe e no norte da América do Sul e possivelmente, sua introdução se deu por via terrestre pela fronteira da Venezuela (Teixeira MG, 1999 e Ministério da Saúde, 2008).

A propagação viral para o resto do país não se deu a partir desse episódio pelo fato de o mesmo ter sido rapidamente controlado e porque o *A. aegypti* ainda não estava distribuído extensivamente pelo território brasileiro. O DENV só reapareceu no Brasil cinco anos depois na cidade de Nova Iguaçu (Rio de Janeiro), com a identificação do sorotipo 1. Conseqüentemente, a virose se disseminou para cidades vizinhas, Niterói e Rio de Janeiro e tornou-se um problema nacional de saúde pública (Schatzmayr HG, 1986).

No entanto, devido às dificuldades de implantar-se um programa de controle do vetor efetivo nas grandes comunidades urbanas, houve uma rápida dispersão do vírus e uma explosão da epidemia em vários estados (Schatzmayr HG, 1986). Quatro anos mais tarde, em 1990, ocorreu a introdução do DENV-2, também no estado do Rio de Janeiro e a subseqüente propagação para as outras regiões do país (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Ceará, Brasília, Roraima, Acre, Paraná, Amapá, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Ocorreram muitos casos grave da doença e foi registrado o primeiro caso fatal devido às infecções secundárias (Nogueira RMR *et al.*, 1999). Ausente das Américas por quase 15 anos, o DENV-3 foi reintroduzido em 1994 atingindo o Brasil em 2000 onde causou graves epidemias de Dengue, principalmente no verão de 2001-2002. O sorotipo 3 apresentou rápida dispersão para 24 estados do país no período de

2001 a 2003. As maiores epidemias detectadas até o momento ocorreram nos anos de 1998 e 2002, com cerca de 530 mil e 800 mil casos notificados, respectivamente (Schatzmayr, H.G. *et al*; 2007 e Ministério da Saúde, 2008).

Em conclusão, no Brasil atualmente encontra-se confirmada a circulação de três sorotipos do vírus: DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Porém, existem relatos da re-introdução do DENV-4 na região da Amazônia, provavelmente, resultado da proximidade do Brasil com países endêmicos a este sorotipo, a Venezuela e a Colômbia (Figueiredo RMP *et al.*, 2008).

A Dengue hoje, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde encontra-se com o seguinte cenário até a semana epidemiológica 30 (janeiro a agosto de 2009) a) redução no número de casos de Dengue de 46,3% em relação ao mesmo período de 2008, seguindo observação em 20 estados e no Distrito Federal, b) no Rio de Janeiro ocorreu a maior queda (95,9%), seguido pelo Rio Grande do Norte (93,0%) e Sergipe (90,4%); c) aumento nos estados do Acre, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (SVS, 2009).

1.2.3 Situação atual da Dengue em Minas Gerais

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais (SES-MG), a evolução da Dengue no estado foi preocupante nas primeiras semanas de 2009 com um aumento de 89% nos casos notificados da doença alcançando 6.502, quando comparada aos 3.432 casos ocorridos no mesmo período de 2008. (SES-MG, 2009).

Algumas cidades mineiras entraram em situação de risco para uma epidemia de Dengue no início de 2009 como foi indicado pelo Levantamento Rápido de Índices de Infestação para *A. aegypti* (LIRAA), o qual também mostrou que 85% dos focos de Dengue em Minas se concentram em áreas residenciais (SES-MG, 2009).

Os dados levantados no ano de 2009 em 25 municípios do Estado indicaram um índice de infestação pelo vetor de 3,9%, o qual configurou surtos da doença em Belo Horizonte, Coronel Fabriciano, Governador Valadares, Ipatinga, Montes Claros, Sete Lagoas, Timóteo e Vespasiano. O levantamento também apontou que outros 13 municípios revelaram índices entre 1% - 3,8%, valor indicativo de situação de alerta (SES-MG, 2009).

Quanto aos municípios com maior incidência de casos de Dengue, Belo Horizonte é o primeiro colocado com 23.218 casos, seguidos de Ipatinga, Coronel Fabriciano, Curvelo e Governador Valadares (SES-MG, 2009).


Na tentativa de conter o avanço da doença no estado, o governo de Minas Gerais elaborou em 2008, o “Plano Estadual de Contingência da Dengue” que destaca a conscientização das pessoas sobre o combate à Dengue e a capacitação dos profissionais de saúde para um melhor diagnóstico e tratamento da doença. O Estado também realiza o LIRaa três vezes por ano (SES-MG, 2009).

1.2.4 Dengue e seu controle em Belo Horizonte







O município de Belo Horizonte, localizado na região centro-sul do Estado de Minas Gerais, com uma população estimada de 2.412.937 habitantes, segundo o censo demográfico de 2007, está situado a 852 metros de altitude, com clima tropical, temperaturas médias anuais entre 17 e 20°C e índices pluviométricos próximos de 1.300mm anuais (IBGE, 2009).

Na cidade o combate à Dengue é coordenado pela Secretaria Municipal de Saúde e conta com a estrutura central de nove distritos sanitários (regionais Norte, Centro-Sul, Pampulha, Barreiro, Venda Nova, Oeste, Noroeste, Leste e Nordeste) e 139 unidades básicas de saúde. Tais unidades têm suas áreas de abrangência constituídas por setores censitários contíguos, considerando as barreiras geográficas, a malha viária e a população residente (Almeida MCM *et al.*, 2008). A figura 3 representa o mapa dos distritos sanitários (DS) e as áreas de abrangência das unidades básicas de saúde.

Vale ressaltar, que a divisão da cidade em regionais é apenas uma questão política, e que praticamente não existem barreiras geográficas entre elas. Entretanto, algumas destas regionais possuem particularidades que merecem ser destacadas:

 A regional Barreiro é separada da regional Oeste pelo anel rodoviário e faz limite com os municípios de Contagem, Ibirité, Brumadinho e Nova Lima. Coexistindo com a intensa atividade industrial e comerciais da região existem diversas áreas verdes e nascentes. Na porção sul/sudeste desta regional há uma área não urbanizada, onde se encontra áreas de preservação, como o parque Estadual da Serra

do Rola Moça. Já na porção norte há atuação de mineradoras e ocupação imobiliária pouco ordenada (Gomes I, 2005 e PBH, 2010).

-  A regional Centro-Sul é caracterizada como um centro metropolitano, onde se concentram as funções políticas, sociais, culturais e econômicas da cidade. São características desta regional a verticalidade e o alto padrão de ocupação (PBH, 2010).
-  A regional Oeste situa-se na bacia do ribeirão Arrudas, sendo a maior parte do seu território interceptado por afluentes, entre os quais destacam os córregos Biqueiras e Marinho, que foram canalizados para construção de avenidas e o córrego do Cercadinho que separa vários bairros nesta região. Possui uma disparidade social acentuada, há vilas e aglomerados com alta vulnerabilidade social e bairros de classe média alta (PBH, 2010).
-  A regional Norte possui a maior área verde da capital, que é destinada a parques e áreas de conservação permanente. Esta regional é dividida por quatro córregos: Vilarinho, Bacuraus, Isidoro e Onça. Com a construção do novo Centro Administrativo, esta região vem sendo considerada uma das últimas fronteiras de expansão da capital mineira, com áreas ainda a serem ocupadas. É marcada por contrastes, dividida entre bairros com população de melhor poder aquisitivo e bairros com condições mais precárias (PBH, 2010).
-  A regional Pampulha possui a bacia da Pampulha, conhecida como lagoa, que é composta por oito afluentes. A área total desta bacia é de 97 km² e em Belo Horizonte esta área é de 42 km². A população residente nesta região encontra-se estratificada em diversos níveis sócio-econômicos, variando desde o padrão muito baixo até muito alto (PBH, 2010).
-  Entre as regionais do município de Belo Horizonte, a Noroeste é a que tem a maior população, com mais de 360 mil habitantes, de acordo com o censo do IBGE de 2000. Toda a região encontra-se nas bacias da Pampulha/ Onça e do Ribeirão Arrudas. É cortada por importantes vias de Belo Horizonte, principalmente pelo anel rodoviário e a BR 040 (PBH, 2010).
-  A regional Nordeste é caracterizada por grandes diferenças de poder aquisitivo, apresentando situações socioeconômicas e de crescimento urbano bastante diferenciadas. A parte sul da região, muito próxima ao centro, é uma zona de intensa

atividade econômica, já as áreas de ocupação recente estão em fase de crescimento (PBH, 2010).



Figura 3: Mapa dos distritos sanitários e áreas de abrangência das unidades básicas de saúde, município de Belo Horizonte, MG (Corrêa PRL, 2005).

O trabalho desenvolvido pela Secretaria de Saúde de Belo Horizonte é sistemático para o controle da Dengue no município. Aproximadamente 1.200 agentes sanitários fazem o monitoramento da presença de focos da Dengue na capital. A cada dois meses são realizadas visitas quinzenais a cerca de 800 mil imóveis da cidade e em locais considerados estratégicos para os focos de reprodução do mosquito, tais como: floriculturas, ferros-velho e borracharias (Prefeitura de Belo Horizonte, 2009).

As ações de combate ao *A. aegypti* têm a coordenação hierarquizada no nível municipal, estando a execução das atividades sob a responsabilidade das unidades básicas. Essas ações sofrem as mudanças estabelecidas nacionalmente, ao longo dos

anos, nos programas de controle vetorial; a coordenação central, no entanto, propicia a homogeneidade dos serviços de controle, embora ocorram iniciativas específicas direcionadas às particularidades de cada local (Almeida MCM *et al.*, 2008).

Porém, vale destacar que desde 1996, o município de Belo Horizonte apresenta sucessivas epidemias de Dengue, acompanhadas de uma progressiva infestação e dispersão do *A. aegypti* nos vários agregados espaciais da cidade. Neste mesmo ano ocorreram os primeiros registros de Dengue no município, configurando uma epidemia na região Norte da cidade (Corrêa PRL *et al.*, 2005).

No início de 1997, surgiu a segunda epidemia. O único sorotipo do vírus identificado até então foi o DENV-1. No final de 1997, iniciou-se outra epidemia, a mais intensa, com circulação simultânea de DENV-1 e DENV-2. Esses sorotipos continuaram a produzir sucessivas epidemias, até que em fevereiro de 2002 o DENV-3 foi identificado pela primeira vez na cidade. Atualmente, os três sorotipos circulam no município (Almeida MCM *et al.*, 2008).

No entanto, as ações preventivas do município têm sido bem sucedidas e o número de casos de dengue na capital mineira continua em constante declínio (SES-MG, 2009). Neste contexto, destaca-se o papel dos agentes de saúde que também são treinados para informar e orientar a população a prevenir e a combater a proliferação do vetor (Prefeitura de Belo Horizonte, 2009).

Até a última semana de dezembro, a capital mineira registrou 23.218 notificações da doença. Desse total, 12.746 confirmados, 10.162 descartados e 310 aguardam resultados de exames. A região Norte ainda é a regional que apresenta maior número de casos com 6.051 confirmações, seguida pelas regiões de Venda Nova, com 1.491 confirmações, e Nordeste, com 1.386. Até a primeira semana de 2010 nenhum caso da doença foi confirmado na cidade (Prefeitura de Belo Horizonte, 2009). A figura 4 ilustra os casos confirmados de Dengue, por semana, nas nove regionais de Belo Horizonte no ano de 2009.

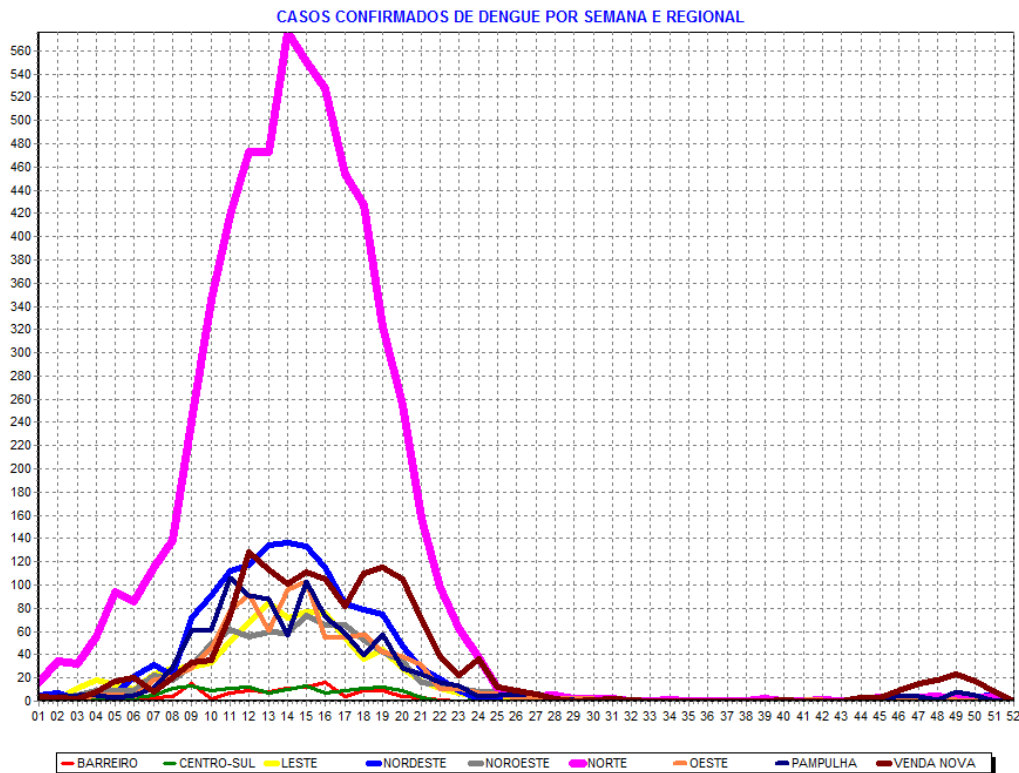


Figura 4: Casos confirmados de Dengue, por semana, nas nove regionais de Belo Horizonte no ano de 2009. (Prefeitura de Belo Horizonte, 2009).

1.2.5 Manifestações Clínicas

A infecção por DENV causa uma doença que inclui desde formas assintomáticas até quadros graves de hemorragia e choque, podendo levar a morte (WHO, 1997). A figura 5 ilustra, através de uma pirâmide, a organização das formas da doença segundo o grau de gravidade.

O período de incubação varia de 3 a 14 dias, com uma média de 4 a 7 dias. Em áreas onde a Dengue é endêmica, os sintomas apresentam-se muitas vezes clinicamente inespecífico, especialmente em crianças, nas quais encontram-se apenas sinais de alguma síndrome viral. Alguns fatores são importantes na progressão de um caso de Dengue Clássico para Dengue Hemorrágica, tais como: a cepa e o sorotipo do vírus da infecção, a imunidade, idade e fatores genéticos do hospedeiro humano (Gubler DJ, 1998).

1.2.5.1 Febre do Dengue

A Febre do Dengue (FD) clássica é normalmente benigna, auto limitada e raramente fatal. As características clínicas desta doença dependem da idade e do paciente (Torres EM, 2005). Esta é a forma mais leve da doença, sendo caracterizada pela febre e um conjunto de sintomas inespecíficos como: dores de cabeça, dor muscular, retro-orbital, náuseas, dores nas articulações, fraqueza e erupções cutâneas (exantema), os quais, geralmente, se desenvolvem em adultos (Mairuhu ATA *et al.*, 2004).

O período de incubação da doença, após a picada do mosquito, possui duração média de 3 a 8 dias, podendo estender-se a 10 dias. As crianças e os adolescentes apresentam, normalmente, febre inespecífica o que dificilmente a diferencia de outras doenças como: febre de chikungunya, sarampo, leptospirose, febre tifóide, malária e gripe (Mairuhu ATA *et al.*, 2004). Já a prova do laço positiva, com mais de vinte petéquias em uma determinada área da pele, pode ser encontrada em mais de 1/3 dos pacientes com febre clássica. Este é um procedimento utilizado para diagnóstico da Dengue onde é mantida uma pressão elevada sobre o membro superior na tentativa de verificar a fragilidade dos capilares (Rigau-Pérez JG *et al.*, 1998).

Os casos mais graves da FD ocorrem nos adultos e são caracterizadas por um aumento súbito da temperatura ($\geq 39^{\circ}\text{C}$) que persiste por 5 a 6 dias, retornando, algumas vezes, à temperatura normal no meio do período febril, processo este chamado de curva bifásica da temperatura (Mairuhu ATA *et al.*, 2004).

As exantemas são as manifestações cutâneas mais freqüentes, ocorrendo em 50% dos pacientes no período febril. Inicialmente, é macular ou maculopapular e tornam-se eritemas difusos em pequenas áreas da pele (ilhas) (Mairuhu ATA *et al.*, 2004). As manifestações hemorrágicas, como as petéquias, epistaxes, sangramento gengival e gastrointestinal, hematúria microscópica e hipermenorreia não são sintomas incomuns nesta fase da doença (Rigau-Pérez JG *et al.*, 1998).

A FD é muito desconfortante, mas seu prognóstico é simples e a recuperação ocorre após 7 a 10 dias do início da doença (Mairuhu ATA *et al.*, 2004). O DENV

desaparece do sangue após uma média de cinco dias o que, provavelmente, está correlacionado com o desaparecimento da febre (Rigau-Pérez JG *et al.*, 1998).

1.2.5.2 Febre Hemorrágica do dengue

A Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) foi descrita pela primeira vez no sudeste da Ásia onde foi, principalmente, uma doença de crianças. Nas Américas, a doença ocorre em todos os grupos de idades com as mesmas manifestações clínicas (Mairuhu ATA *et al.*, 2004).

A doença se inicia como uma febre indiferenciada nas crianças, ou associada, segundo a idade, a graus variáveis de mialgias, artralgias, cefaléia, dor retro-orbitária, exantema e manifestações digestivas como vômitos e dor abdominal (Torres EM, 2005). O período de incubação da FHD é semelhante ao da FD ocorrendo de 2 a 7 dias (Kurane I, 2007).

Em qualquer momento da doença, é possível a prova do laço tornar-se positiva, ou aparecerem hemorragias espontâneas, de qualquer tipo, porém as hemorragias por venopunção e petéquias são mais frequentes (Torres EM, 2005). O local de hemorragias mais comum é o trato gastrointestinal, as quais se manifestam como hematemeses ou melena seguidas por epistaxes (Malavige GN *et al.*, 2004).

O período mais crítico da FHD ocorre quando a febre regride para níveis normal ou subnormais. Neste ponto, o paciente pode se recuperar ou progredir para a fase de extravasamento de plasma; as manifestações hemorrágicas só ocorrem após o estabelecimento da febre. Instalam-se os derrames em cavidades serosas como ascite ou hidrotórax, as manifestações hemorrágicas aparecem ou pioram, pode-se verificar convergência da tensão arterial diferencial e os doentes apresentarem hipotensão e choque. O período convalescente na FHD é curto e tranquilo (Torres EM, 2005 e Malavige GN *et al.*, 2004).

1.2.5.3 Síndrome de Choque por Dengue

A Síndrome de Choque por Dengue (SCD) é a mais grave manifestação da FHD (Bridget AW *et al.*, 2005). Foi definida pela OMS como a FHD acrescida de sinais de insuficiência circulatória manifestada por pressão de pulso estreito (≤ 20 mmHg),

hipotensão com calafrios, pele fria e úmida, agitação e choque. O fígado pode ser palpável, macio e as suas enzimas apresentam-se anormais (Mairuhu ATA *et al.*, 2004 e WHO, 1997).

Os principais sinais de advertência para o quadro de choque são: dor abdominal, vômitos persistentes, agitação e uma súbita mudança da febre para hipotermia com sudorese e prostração (Rigau-Pérez JG *et al.*, 1998). O choque ocorre devido a um colapso circulatório onde há um grande extravasamento de plasma entre o 3º e 5º dia do início da doença. O estreitamento da pressão de pulso é reconhecido como uma das primeiras manifestações de choque, e ocorre antes do desenvolvimento de hipotensão arterial (Ngo Thi Nhan *et al.*, 2001).

A SCD está associada com uma alta taxa de mortalidade, em torno de 9,3% passando para 47% nos casos de choque profundo (Malavige GN *et al.*, 2004). O choque é reversível se o volume de líquido perdido for recuperado na fase inicial da doença. Naqueles casos em que a recuperação é inadequada o paciente pode evoluir para o choque irreversível e morte. Normalmente, o extravasamento capilar se resolve espontaneamente pelo 6º dia da doença e é seguido por uma recuperação total (Ngo Thi Nhan *et al.*, 2001).

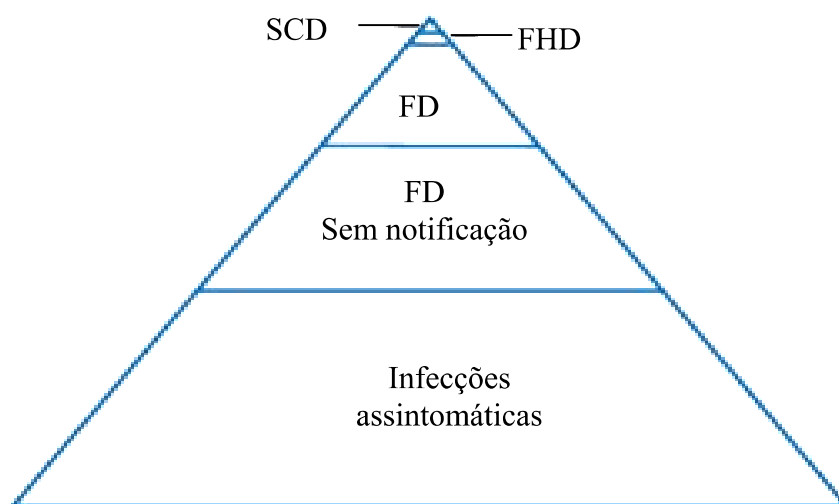


Figura 5: Pirâmide que representa as doenças causadas pelas infecções de Dengue (Kyle, JL 2008).

1.3 Ciclo de transmissão

O processo dinâmico e progressivo de seleção adaptativa para a sobrevivência das espécies, que ocorre cotidianamente na natureza, envolve importantes fenômenos que interferem no estado de saúde das populações humanas e isto pode ser bem evidenciado na força da re-emergência das infecções causadas pelos DENV, pois as agressões dos quatro sorotipos destes agentes às populações humanas vêm crescendo em magnitude e extensão geográfica, desde meados do século XX (Halstead SB, 1997)

Sendo assim, as primeiras evidências do ciclo de transmissão do DENV foram publicadas por Bancroft em 1906, que levantou a hipótese de o *A. aegypti* ser o vetor da Dengue, logo depois foi confirmado por Agramonte e outros pesquisadores. A partir deste conhecimento, foi possível estabelecer os elos epidemiológicos envolvidos na transmissão da doença resumidos na cadeia abaixo (revisão em Teixeira MG, 1999).

Mosquito infectado → homem susceptível → homem infectado → mosquito infectado

Após uma pessoa ser picada por um mosquito infectado, o vírus passa por um período de incubação em média de 4 a 7 dias no qual os sinais e sintomas da fase aguda da doença são apresentados. Este período é a fase de viremia, onde o vírus circula no sangue periférico. Se outros mosquitos (não infectados) se alimentarem no hospedeiro infectado durante esta fase podem tornar-se infectados e, subseqüentemente, podem transmitir o vírus a outras pessoas susceptíveis após um período de incubação extrínseco (PIE) que dura de 8 a 14 dias (revisão em Gubler DJ, 1998). A figura 6 mostra o desenho esquemático do ciclo da Dengue.

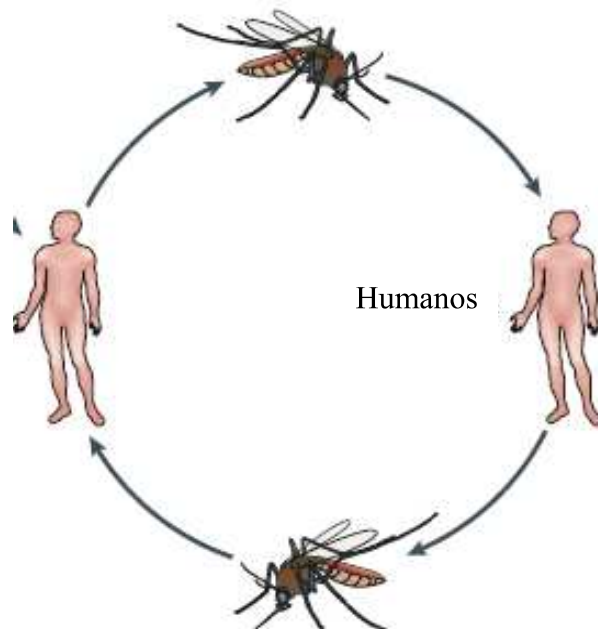


Figura 6: Ciclo de Transmissão do *Dengue virus* (Adaptado de: Whitehead SS, 2007).

1.4 Controle e Prevenção

Atualmente não existe vacina contra a Dengue. Os principais métodos para a prevenção da doença dependem do controle do mosquito vetor, principalmente no peridomicílio das residências onde a maioria das transmissões ocorre. Estes incluem: a redução dos locais de reprodução do mosquito, melhoria no manejo dos resíduos sólidos, organização do ambiente urbano, maiores investimentos e efetividade nos programas de educação da rede pública (Malavige GN, 2004).

O controle envolve governo e sociedade no combate do *A. aegypti*. As medidas preventivas são direcionadas principalmente aos criadouros, constituindo-se de ações simples e eficazes, especialmente aquelas que consistem em cuidados a serem adotados pela população. A tecnologia hoje disponível abrange tanto medidas de controle físico, químico e biológico. Análises laboratoriais também são indispensáveis para a prevenção, pois o diagnóstico correto e o tratamento imediato possuem um papel crucial na prevenção do sofrimento e morte causados pela Dengue (Donalísio MR, 2002 e Rigau-Pérez JG, 1998).

1.5 O Vetor

1.5.1 Vetor primário: *Aedes (Stegomyia) aegypti* - Linnaeus, 1762

O *A. aegypti*, popularmente conhecido como mosquito da Dengue, é uma espécie de mosquito da ordem *Diptera*, subordem *Nematocera*, família *Culicidae*, subfamília *Culicinae*, tribo *Aedini*, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Consoli RAGB, 1994).

O *A. aegypti* apresenta as seguintes características fenotípicas: é um mosquito rajado, de coloração escura, com escamas brancas pelo corpo. Sua identificação é facilitada pelo desenho em forma de lira presente no dorso, que pode ser observado a olho nu, como observado na figura 7. Escamas brancas, alternando-se com escamas escuras, são encontradas na região posterior da cabeça e nos segmentos abdominais. (Gadelha DP, 1985 e Rey L, 2001).

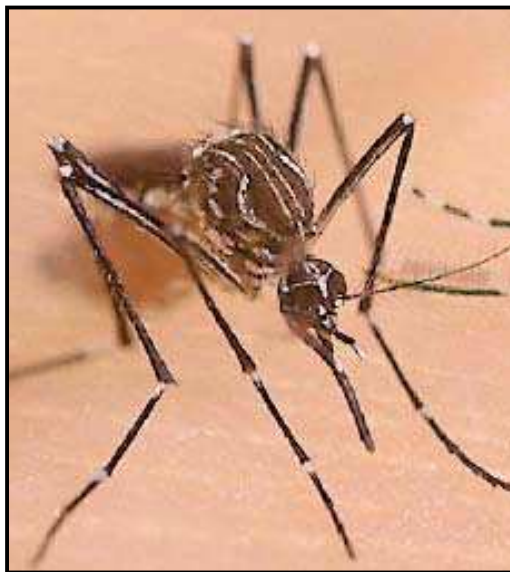


Figura 7: *Aedes aegypti* (University of Florida, 1999)

O *A. aegypti* é originário do continente africano e se espalhou pela Ásia e Américas ao longo dos séculos XV até o XIX, principalmente pelos meios de transportes cada vez mais rápidos, como vias aérea, marítima ou terrestre. (Rebelo JMM *et al.*, 1999). Foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos. Atualmente está distribuído por quase todo o mundo, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (Consoli RAGB, 1994).

Existe um consenso de que a partir da população silvestre, devido às pressões humanas decorrentes da destruição dos habitats naturais, uma variedade genética desse mosquito teria sofrido um processo seletivo, adaptando-se às áreas alteradas e, posteriormente, teria encontrado nos aglomerados humanos o ambiente adequado à sua sobrevivência. A adaptação aos criadouros artificiais teria sido um grande passo em direção ao comportamento sinantrópico (Christophers SR, 1960).

É um mosquito de hábito diurno com atividade no período vespertino. O seu controle é laborioso, devido ao fato de ser um mosquito muito versátil na escolha dos criadouros (lugares escolhidos pelas fêmeas para efetuar a postura de seus ovos). Os ovos são extremamente resistentes à dissecação, podendo sobreviver vários meses até que a chegada de água propicie seu desenvolvimento larval (Consoli RAGB, 1994).

1.5.2 Vetor secundário: *Aedes (Stegomyia) albopictus* – Skuse, 1894

O *A. albopictus*, popularmente conhecido por tigre asiático, também é vetor da Dengue no continente asiático. Nos últimos 14 anos, em consequência do intenso comércio intercontinental de pneus por intermédio dos transportes marítimos, disseminou-se para as Américas, sendo inicialmente detectado nos Estados Unidos em 1985, onde já está presente em 25 estados. Em 1986, foi identificado no Brasil, mas ainda não foi incriminado como vetor da Dengue (Teixeira, 1999).

Em algumas partes da Ásia, América do Sul e no Oeste da África, o *A. albopictus* é considerado um importante vetor porque se utiliza tanto de criadouros naturais quanto de criadouros artificiais. Ibáñez-Bernal *et al.* (1997), registraram, pela primeira vez nas Américas, a infecção natural do *A. albopictus* pelo DENV em espécimes coletadas durante um surto que ocorreu na cidade de Reynosa no México (revisão em Teixeira, 1999).

O *A. albopictus* apresenta como características fenotípicas a coloração negra; com uma faixa estreita, longitudinal, mediana e branco-prateada; abdômen com escamas basais brancas e pernas marcadas por escamas brancas e pretas, tais características podem ser observadas na figura 8. Esta espécie tem preferência pelos ocos de árvores para depositar seus ovos e possuem hábitos antropofílicos e zoofílicos diurnos e fora dos domicílios humanos (Teixeira MG, 1999).

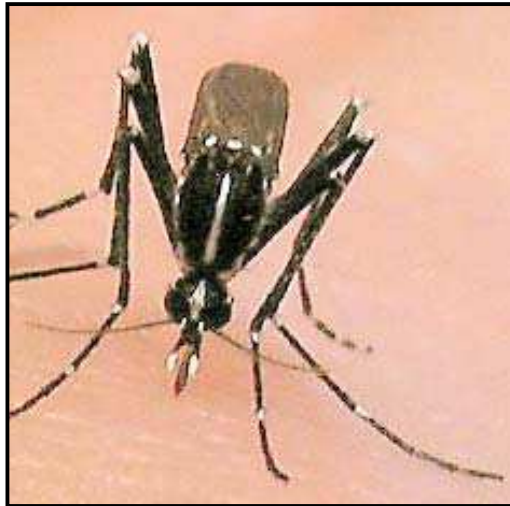


Figura 8: *Aedes albopictus* (University of Florida, 1999)

1.5.3 Biologia do vetor

Os Dípteros se desenvolvem através de metamorfose completa (holometabolía), e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (4 estádios larvários), pupa e adulto (Consoli RAGB, 1994). O desenho esquemático mostrando as fases de desenvolvimentos do *A. aegypti* está ilustrado na figura 9.

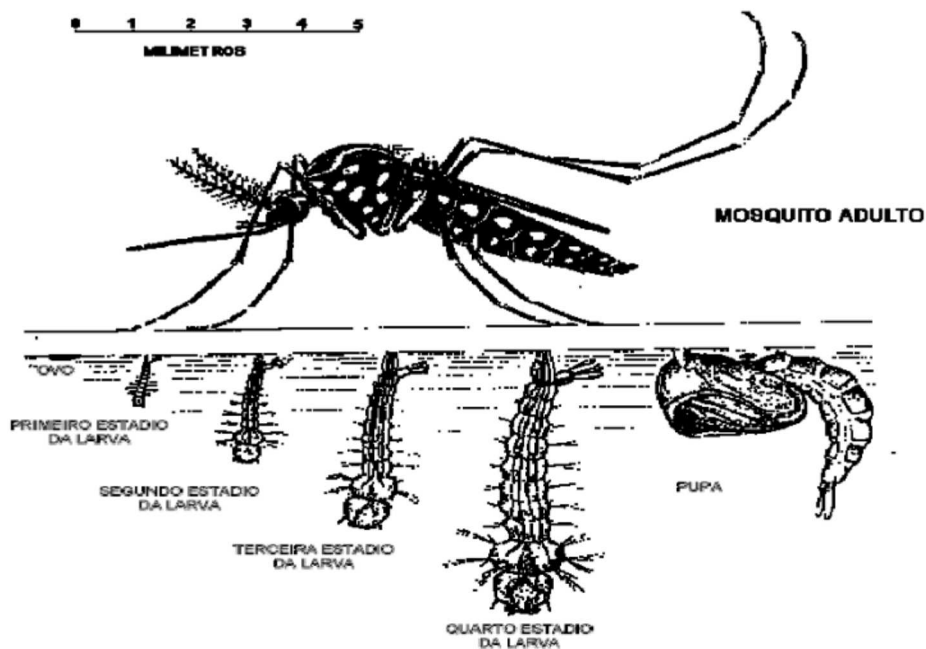


Figura 9: Desenho esquemático mostrando os estágios de desenvolvimento do *A. aegypti*.

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

O *A. aegypti* é um mosquito predominantemente doméstico. A oviposição ocorre durante o dia e se faz nas paredes dos criadouros pouco acima da superfície da água. Os ovos são menores que 1mm de comprimento, inicialmente brancos mas após duas horas tornam-se quase negros devido ao processo de oxidação. Os embriões no interior dos ovos necessitam de 1 a 3 dias de alta umidade para atingirem seu desenvolvimento. Se durante este período for assegurado um perfeito desenvolvimento, os ovos se tornam resistentes a dessecação e podem sobreviver por vários meses até um ano (revisão em Gadelha DP, 1985).

A larva que emerge da ruptura do ovo é a primeira dos quatro estágios larvais (Pereira ST *et al.*, 2006). Ela cresce seqüencialmente de 1mm para 7mm de comprimento. A passagem de um estágio larval para o próximo é feito pelo processo de muda durante o qual ocorre o desprendimento do exoesqueleto. A larva passa a maior parte do seu tempo comendo. O desenvolvimento larval se completa entre cinco dias desde que ocorram condições favoráveis de temperatura (25°C a 29°C) e se inicia a fase de pupa. O estágio pupal não requer alimentação e seu desenvolvimento dura em média de 1 a 3 dias, a partir de então aparecem as características dos adultos como asas, probóscide e patas. Assim que o ciclo gonadotrófico (amadurecimento dos ovos) é completado, a fêmea está apta para a postura. O tempo médio de vida do mosquito adulto é de 30 dias e a cada oviposição, a fêmea coloca de 50 a 200 ovos (revisão em Gadelha DP, 1985).

1.6 Agente etiológico

1.6.1 Gênero *Flavivirus*

A palavra *flavus* é derivada do latim e significa amarelo predizendo a coloração amarelada dos indivíduos acometidos pelo Vírus da Febre Amarela (Theiler M, 1937). O DENV pertence à família Flaviviridae que é constituída por patógenos virais responsáveis por causar doenças graves e mortalidade em animais e humanos. A família consiste em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* é o maior dentro da família, sendo composto de 70 vírus incluindo o DENV, Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), Vírus da Encefalite causada por carrapatos (TBEV), Vírus West Nile (WNV) e o Vírus da Febre Amarela (YFV) (Mukhopadhyay S *et al.*, 2005). Os vírus deste gênero possuem aproximadamente 500 Å de diâmetro e seu material

genômico é composto de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, empacotado por um nucleocapsídeo protéico e uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, coberta por mais de 180 cópias de duas glicoproteínas virais (Lindenbach BD, 2003). O genoma dos *Flavivirus* possui aproximadamente 11Kb e codifica três proteínas estruturais - proteína do capsídeo (C), a proteína precursora da membrana (prM – que é proteoliticamente clivada por uma protease celular para formar proteína M em vírions maduros) e a proteína do envelope (E) que constituem a partícula do vírus. Além de sete proteínas não estruturais (NS) que são essenciais para a replicação viral – NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Mackenzie JS, 2004). A figura 10 ilustra a partícula viral com suas proteínas estruturais e seu genoma.

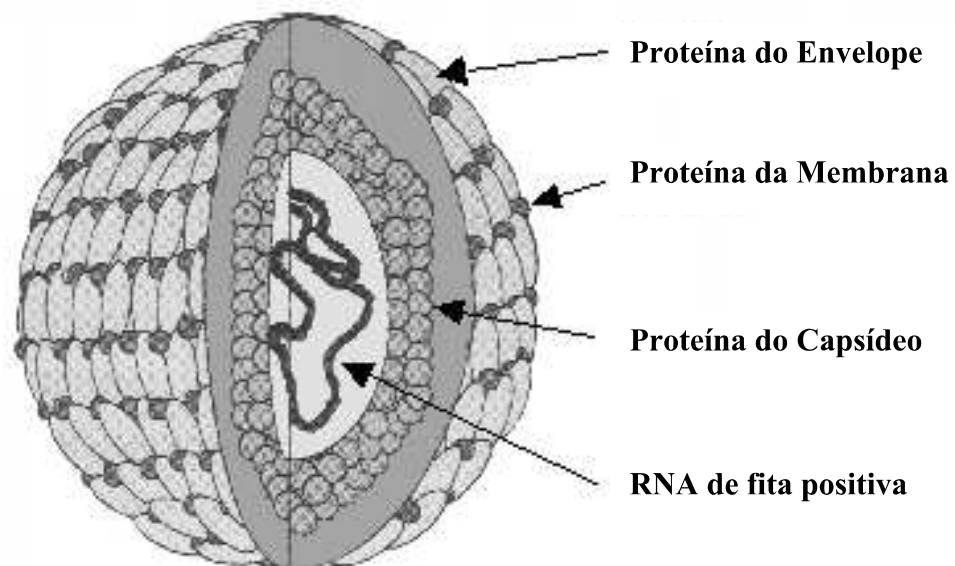


Figura 10: Desenho esquemático mostrando a partícula viral. Diagrama mostrando regiões do genoma dos *Flavivirus* codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais. O polipeptídeo é processado em três proteínas estruturais (C, proteína do nucleocapsídeo; M, proteína associada à membrana; e E a proteína do envelope) (www.dailyca.org/printable.phpid=7167).

1.6.2 Dengue virus

Os DENV são sorologicamente relacionados, mas antígenicamente distintos (Teixeira MG, 1999). São partículas esféricas de 40 a 50nm de diâmetro com um envelope lipídico que envolve o nucleocapsídeo isométrico medindo em torno de 30nm de diâmetro. A borda do envelope possui finas projeções em sua superfície, constituídas pelas proteínas estruturais da membrana do envoltório. O nucleocapsídeo viral inclui a proteína do capsídeo e o genoma RNA (Torres EM, 2005).

Os agentes etiológicos da Febre Amarela e da Dengue foram os primeiros microorganismos a serem denominados vírus, em 1902 e 1907, respectivamente, descritos como agentes filtráveis submicroscópicos. O isolamento do DENV só ocorreu na década de quarenta, por Kimura, em 1943 e Hotta, em 1944, denominado esta cepa de Mochizuki. Sabin e Schlesinger, em 1945, isolaram a cepa Havaí, quando o primeiro, neste mesmo ano, ao identificar outro vírus em Nova Guiné, observou que as cepas tinham características antigênicas diferentes e passou a considerar que eram sorotipos do mesmo vírus. As primeiras cepas ele denominou sorotipo 1 e a da Nova Guiné sorotipo 2. Em 1956, no curso da epidemia de dengue hemorrágico no Sudeste Asiático, foram isolados os vírus 3 e 4, definindo-se, a partir daí, que o complexo Dengue é formado por quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (revisão em Teixeira MG, 1999).

O vírion maduro possui três proteínas estruturais: a proteína C do nucleocapsídeo, a proteína M associada à membrana e a proteína E do envelope. A proteína C é o primeiro polipetídeo viral sintetizado e é capaz de neutralizar a molécula de RNA viral com a qual está associada, mas não é capaz de induzir anticorpos neutralizantes. A formação da proteína M a partir de um precursor (proteína pr-M) parece ser um fato crucial na morfogênese do vírus. A função desta proteína não está clara, mas tem por efeito um aumento da infectividade viral e uma reorganização da estrutura da superfície do vírus que permite a fusão à célula (Després P, 1993). A glicoproteína E está associada a funções biológicas tais como a união a receptores, a hemaglutinação dos eritrócitos, a indução de anticorpos neutralizantes na resposta imunológica protetora, a fusão dos vírus com a membrana endossômica e o acoplamento viral (Chang GJ, 1997). A estrutura do DENV maduro pode ser observada na figura 11.

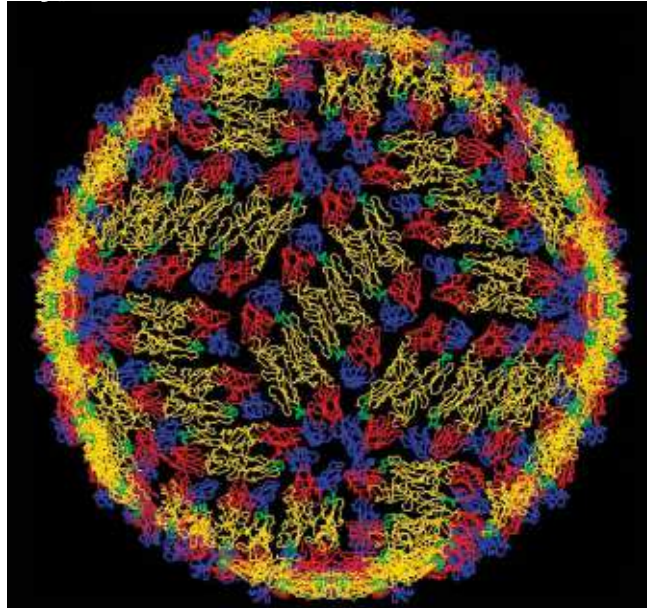


Figura 11: Esquema do *Dengue virus* maduro (Mackenzie JS, 2004)

Existem as outras proteínas não estruturais – NS1, NS2, NS5 – e outras quatro menores – NS2A, 2B, NS4A e 4B – cujas funções ainda não estão totalmente identificadas (Torres EM, 2005). A figura 12 ilustra a estrutura e a expressão do genoma dos *Flavivirus*.

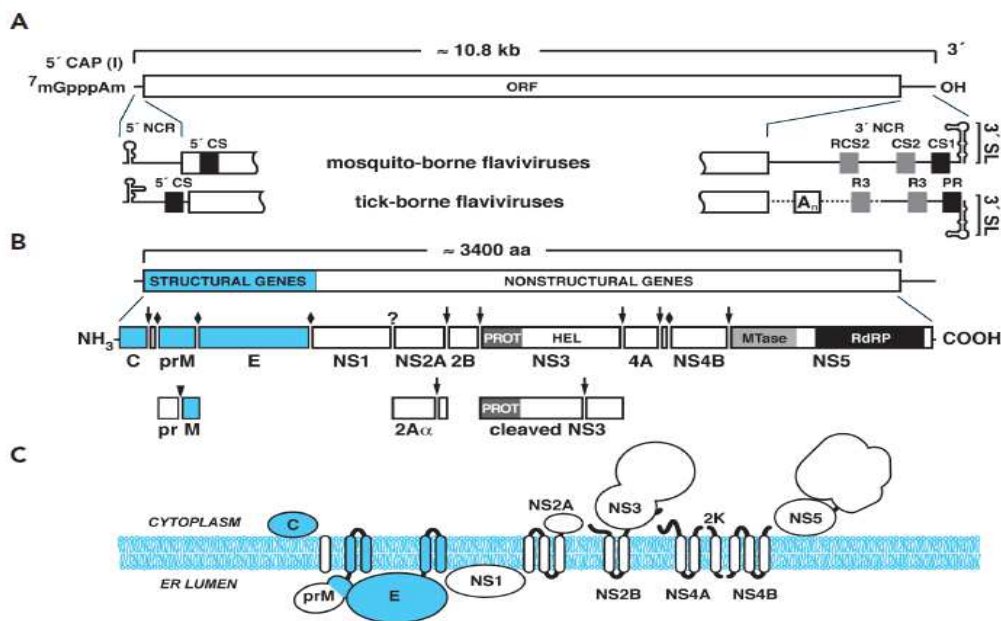


Figura 12: Estrutura e expressão do genoma dos *Flavivirus*. **A.** Estrutura do genoma e elementos do RNA. **B.** Processamento da poliproteína e genes estruturais e não-estruturais. **C.** Topologia da poliproteína na membrana (Lindenbach, 2007).

1.6.3 Ciclo replicativo

A replicação viral pode ser verificada precocemente três horas após a infecção, ocorrendo aparentemente na região perinuclear das células infectadas (Kantoch M, 1980). O vírus funde-se a superfície da célula do hospedeiro e em seguida entra na célula por endocitose mediada por receptor. Após a formação do endossoma ocorre a acidificação do meio neste compartimento e mudanças na conformação do vírion. Assim a partícula viral perde o revestimento do nucleocapsídeo e o material genético é liberado dentro do citoplasma. A replicação do genoma ocorre em membranas intracelulares. A montagem do vírus se inicia na superfície do retículo endoplasmático (RE) quando as proteínas estruturais e os segmentos de RNA recentemente sintetizado estão dentro do lúmen do RE. As partículas virais imaturas e não infecciosas são transportadas através do complexo de Golgi (CG). Estas partículas são então clivadas por protease do hospedeiro resultando nas partículas maduras e infecciosas. Os vírions maduros são subsequentemente liberados por exocitose, como demonstrado na figura 13 (Mukhopadhyay S *et al.*, 2005).

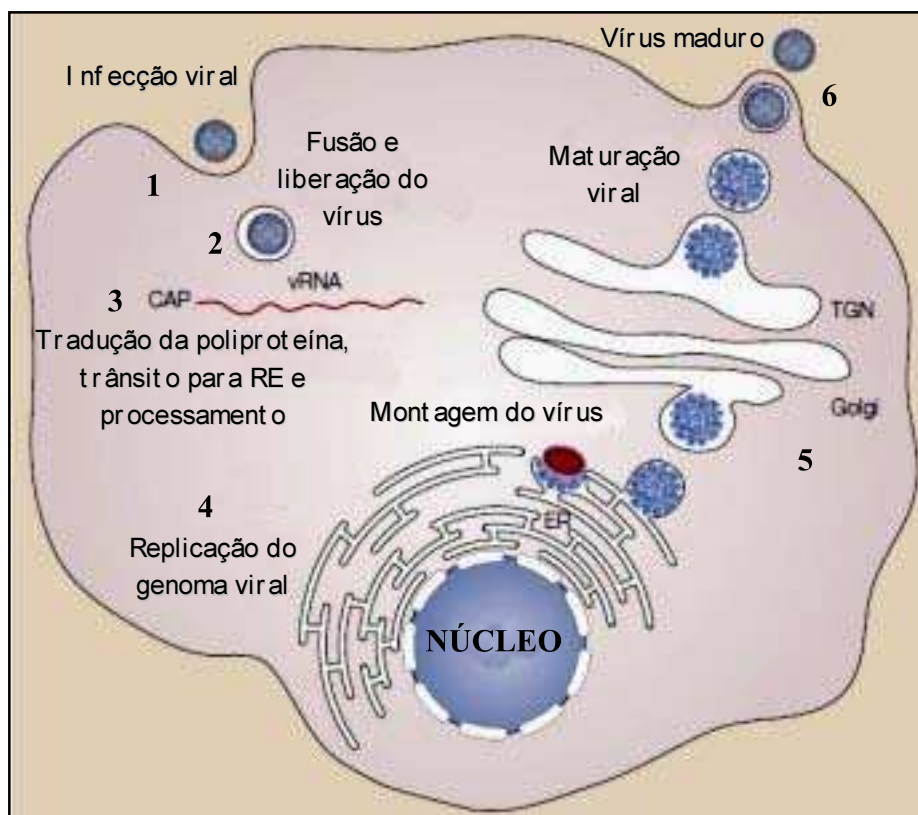


Figura 13: Ciclo de replicação dos *Flavivirus* (Adaptado de Mukhopadhyay, 2005).

1.6.4 Infecção do DENV no mosquito vetor

O período que vai desde o repasto infectante até a capacidade de transmissão do vírus pelo mosquito é designado como período de incubação extrínseco (PIE). Após ingestão de sangue contaminado com o DENV, as partículas virais precisam se ligar a receptores específicos do intestino médio do mosquito para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, se replicar nas células epiteliais intestinais para poderem então, deixar o intestino. Uma vez que o vírus consegue deixar o intestino, ele passa para a hemocele podendo infectar órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso. Por fim, é necessário estabelecer a infecção na glândula salivar para que este mosquito seja considerado apto a transmitir o vírus, partículas virais precisam ser eliminadas juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (Hardy JL *et al.*, 1980; Woodring JL *et al.*, 1996; Black IV WC *et al.*, 2002). As etapas necessárias para a infecção por *Flavivirus* e transmissão pelo vetor estão ilustradas na figura 14.

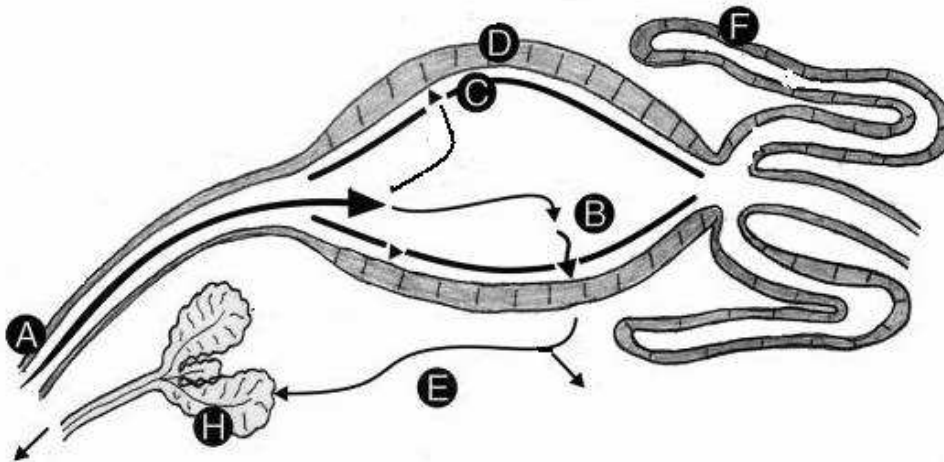


Figura 14: Etapas necessárias para a infecção por *Flavivirus* e transmissão pelo vetor. As letras indicam os locais de desenvolvimento viral e as setas indicam o caminho percorrido pelo patógeno dentro do inseto. Após a ingestão de sangue infectado (A) os vírus entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se replicam e deixam estas células alcançando a hemolinfa (E) e posteriormente, podem infectar e se replicar em outros órgãos do inseto como, por exemplo, as glândulas salivares (H), onde, durante um novo repasto sanguíneo, podem infectar um hospedeiro susceptível. Neste desenho as seguintes letras indicam: (B) intestino médio (C) matriz peritrófica e (F) os túbulos de Malpighi (modificado de Beerntsen *et al.* 2000).

A duração do PIE depende do vetor e do vírus envolvido e em geral, varia de 8 a 14 dias para *Flavivirus* (Woodring JL *et al.*, 1996). O PIE é influenciado por fatores ambientais como a temperatura e a umidade além de sofrer influência de fatores

intrínsecos do vetor como a competência vetorial e o genótipo viral envolvido (Black IV WC *et al.*, 2002). Após o PIE, o vetor infectado pode transmitir o vírus para novos hospedeiros vertebrados durante tentativas de alimentação ou para sua progênie durante a oviposição (Woodring JL *et al.*, 1996).

1.7 Transmissão transovariana

A transmissão transovariana é o processo no qual a fêmea transmite o patógeno à sua progênie e é muito comum de ocorrer em alguns arbovírus (Woodring *et al.*, 1996).

Existem duas rotas de infecção transovariana, ou seja, no momento da oviposição o vírus pode se encontrar dentro do ovo e a *transovum*, na qual o vírus se encontra na superfície do ovo. Quando os folículos ovarianos em desenvolvimento se tornam infectados, o vírus se replica e persiste no inseto durante a embriogênese, desenvolvimento larval e na metamorfose para o estágio adulto desta geração (Woodring *et al.*, 1996). Acredita-se que este tipo de transmissão do DENV é um fenômeno etiológico crucial e responsável pela persistência do vírus durante períodos inter-epidêmicos da doença, principalmente porque os ovos do *A. aegypti* permanecem viáveis por vários meses fora da água (Angel B e Joshi V, 2008 e Forattini OP, 2002).

Os vírus também possuem a capacidade de infectar vários outros órgãos do mosquito vetor. O tropismo tissular de uma cepa viral parece ser um fator importante na sobrevivência do vírus (Joshi V *et al.*, 2002).

1.8 Competência e Capacidade vetorial

Todos os vetores conhecidos que podem transmitir os quatro sorotipos do DENV pertencem ao gênero *Aedes*. A competência vetorial (CV) e a capacidade vetorial variam não só entre as diferentes espécies como também entre diferentes populações geográficas da mesma espécie (Rocco IM, 2001).

Para Rodhain F e Rosen L, 1997, a competência vetorial refere-se à facilidade com que uma espécie de mosquito se infecta pelo vírus, replica-o e transmite. A capacidade vetorial implica, além da CV, o efeito modificador que exercem os fatores ambientais sobre a competência do vetor, tais como a frequência de contatos homem-mosquito em função da abundância de mosquitos e seu tropismo. Segundo Forattini,

1992, capacidade vetorial é a propriedade de transmitir a infecção ao homem em condições naturais e depende da combinação de parâmetros relativos à competência vetorial, a densidade, antropofilia, taxa de picada, taxa de sobrevivência diária e o período de incubação extrínseco (PIE) do vírus no organismo do vetor.

A definição mais aceita para competência vetorial é a habilidade intrínseca do vetor para infecção, replicação e transmissão do vírus (Bennett K, 2002). Ela está associada com o número de barreiras anatômicas que determinam a eficiência da infecção no vetor e inclui a susceptibilidade à infecção, isto é, o desenvolvimento do patógeno, duração do período de incubação extrínseco e eficiência da transmissão do patógeno (Beerntsen BT, 2000). Tais barreiras incluem: a barreira de infecção do intestino médio (MIB), a barreira de escape do intestino médio (MEB) e a barreira da glândula salivar (Bennett K, 2002), como ilustradas na figura 15.

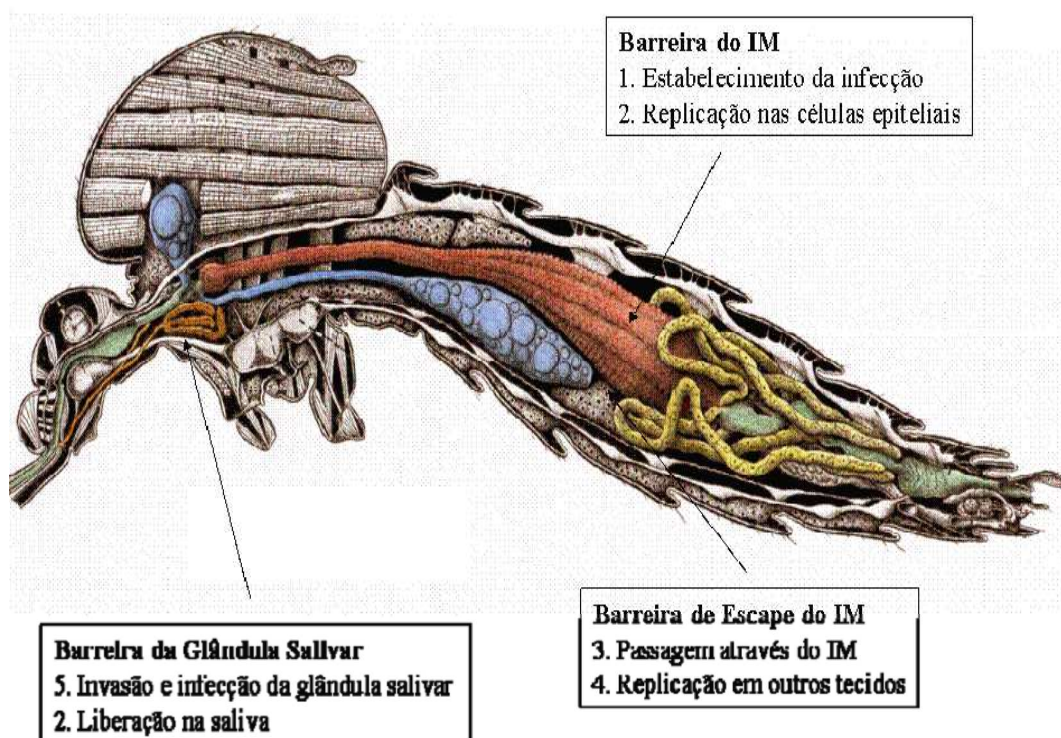


Figura 15: Barreiras naturais à infecção pelo *Dengue virus*. IM = intestino médio (Adaptado de: Jobling, 1987).

Estas barreiras podem ou não funcionar para proteger o vetor do desenvolvimento do parasita em seu interior. A variabilidade genética de uma espécie de mosquito ou linhagem de uma única espécie de mosquito é o que determina o sucesso da relação mosquito-patógeno específico (Beerntsen BT, 2000).

Em vetores potenciais com uma MIB, os vírus não podem infectar e/ou replicar nas células intestinais dos mosquitos. Isso pode ocorrer por falta de receptores para o vírus na superfície celular ou pela ausência de permissividade das células do intestino à infecção pelo vírus (Bennett K, 2002).

Vetores potenciais com MEB podem permitir a replicação do vírus no intestino, mas estes são incapazes de escapar e causar infecção disseminada. As barreiras de infecção podem variar entre as populações de *A. aegypti*, portanto a competência vetorial para o DENV também pode variar. Isto, em parte, pode determinar a epidemiologia da doença (Bennett K, 2002).

2 Justificativa

A Dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que 80 milhões de pessoas se infectem anualmente, com cerca de 20 mil óbitos (WHO, 2008).

Atualmente não existem agentes terapêuticos específicos para a Dengue e a única medida disponível para bloquear a transmissão da doença é o controle do mosquito vetor.

Sendo assim, é importante estudar os fenômenos que controlam a interação entre vetor e vírus, em especial a competência vetorial de populações brasileiras do *A. aegypti*. Tais vetores estão muito bem adaptados às zonas urbanas, principalmente ao domicílio humano e distribuídos por todo o território brasileiro. No Brasil há relatos oficiais da circulação de três dos quatro sorotipos do DENV, fato que, somado à alta densidade vetorial, favorece o surgimento de casos graves da doença.

Portanto, torna-se necessário obter avanços nas pesquisas referentes ao processo da interação vetor-patógeno, no conhecimento dos mecanismos de invasão pelo vírus e no desenvolvimento da infecção no mosquito vetor, bem como, no entendimento dos elementos ambientais e genéticos que conferem variados graus de competência vetorial a diferentes populações de mosquitos vetores.

Estudos com esta abordagem são recentes e inéditos no Brasil. Nossos resultados poderão contribuir para pesquisas futuras que visam bloquear a transmissão da Dengue e o controle do seu mosquito vetor.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar comparativamente a competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, à infecção com DENV-2.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1- Avaliar a viabilidade da utilização de amostras congeladas de DENV-2 na infecção artificial de mosquitos *A. aegypti*.

3.2.2- Analisar a praticidade de duas técnicas de RT-PCR para detecção de DENV - *Lanciotti* (Lanciotti RS, 1992) X One Step (Ayres M, 2006).

3.2.3- Determinar a taxa de transmissão vertical natural da geração F1 das populações estudadas.

3.2.4- Analisar comparativamente as barreiras de infecção e a competência vetorial das populações de mosquitos estudadas, após alimentação infectante com DENV-2.

4 Metodologia

4.1 Manutenção das populações de mosquitos

Foram estudadas populações de *A. aegypti* originárias das nove regionais do município de Belo Horizonte: Norte, Barreiro, Venda Nova, Centro-sul, Oeste, Nordeste, Noroeste, Leste e Pampulha. Os ovos destas populações foram coletados e cedidos pela Secretaria Municipal de Saúde.

Os ovos foram coletados durante as semanas epidemiológicas 17 e 18 de 2009, as quais corresponderam a um período com alto pico da Dengue na cidade (figura 4). As armadilhas para oviposição (APO) foram distribuídas em pontos pré-determinados, pela Secretaria Municipal de Saúde, em cada uma das regionais, com o objetivo de cobrir toda a área geográfica das mesmas. Estes ovos chegaram ao LEM em palhetas e separados por regionais. Em seguida, as colônias foram estabelecidas e mantidas até a geração F1.

Os mosquitos foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia Médica (LEM) – Centro de Pesquisas René Rachou/ FIOCRUZ, Minas Gerais, à temperatura média de 28°C e umidade relativa do ar a 80%. A alimentação destes mosquitos até o momento da infecção foi através de solução açucarada a 10%.

A população de *A. aegypti* colonizada no LEM foi originária de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro e mantida no laboratório desde 1999, também foi utilizada em alguns dos experimentos, bem como, a cepa *Red Eyes* que foi cedida e colonizada no Laboratório de Biologia e Bioquímica de Insetos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/ UFRJ.

4.2 Células e vírus

4.2.1 Células C6/36

Células de linhagem contínua de larvas de *A. albopictus* foram gentilmente cedidas pelo Dr. Cláudio Antônio Bonjardim (ICB/UFMG). Estas células foram cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15), contendo 20µg/ml de gentamicina, 5µg/ml de

anfotericina B, 200U/ml de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) e permaneceram a 28°C em B.O.D., para passagens do vírus.

Para os repiques das células, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X (tampão fosfato salina). Utilizou-se tripsina para desprendê-las da monocamada. Após soltas e homogeneizadas acrescentou-se sobre as células repicadas um novo meio L15.

4.2.2 Vírus

A cepa viral utilizada para os experimentos de infecção dos mosquitos foi a DENV-2/SPH, isolada de um paciente diagnosticado com FHD em Ribeirão Preto/SP no ano de 1991. Esta cepa foi obtida do banco de cepas de vírus congelados do laboratório do Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo do Laboratório de Virologia do HCFMRP-USP no ano de 1998.

Os vírus foram multiplicados em células C6/36 de *A. albopictus* em estufa à 25°C e mantidos em freezer à -70°C no LEM.

4.3 Multiplicação viral

Para a multiplicação viral uma garrafa de cultura (25 cm²) contendo as células C6/36 com 80 a 90% de confluência foi inoculada com 1 mL do DENV-2. Durante uma hora, a intervalos de 10 minutos, o meio contendo o DENV foi homogeneizado sobre a monocamada de células a partir de leves movimentos com a garrafa de cultura, em seguida adicionou-se 5 ml de meio L15 com SFB a 10% e suplementado com antibióticos sendo, por fim, incubada a 25°C. A infecção foi observada através da formação de sincícios e do efeito citopático característicos da infecção viral na cultura de células.

4.4 Titulação viral

A titulação viral foi calculada pelo método TCID₅₀ (Reed e Muench, 1938). Para a realização deste procedimento células C6/36 foram cultivadas em placas de 96 poços com meio L15 e SFB a 1%, sendo implantadas 2,5 x 10⁵ células/poço.

Uma cadeia de diluições (10^{-2} a 10^{-7}) seriadas contendo o vírus a ser titulado foi inoculada sobre as fileiras da placa contendo as células C6/36 preparadas para titulação. Como controles foram utilizados duas colunas com células não infectadas. Após incubação por duas horas, completou-se o volume de cada poço com 100 μ L de meio L15 com SFB a 10% e suplementado com antibióticos.

Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C por, aproximadamente, 10 dias. Para avaliação da titulação foi realizada a contagem de poços positivos, os quais possuíam a presença de sincícios e do efeito citopático, de acordo com os cálculos desenvolvidos por Reed LJ e Muench H, 1938. A Figura 16 demonstra o desenho esquemático da placa de titulação e de como foram feitas as diluições.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		CO	CO	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	
C		CO	CO	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	
D		CO	CO	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	
E		CO	CO	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	
F		CO	CO	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	
G		CO	CO	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	
H												

Figura 16: Desenho esquemático da placa de titulação. Legenda: PBS (azul), controle não infectado (laranja) e diluições seriadas de vírus (rosa).

4.5 Infecção dos mosquitos

Amostras de 300 fêmeas F1 de *A. aegypti* representativas de cada uma das localidades de estudo, com idade de 3 a 5 dias foram utilizadas nos experimentos de infecção. As fêmeas foram separadas em gaiolas identificadas e a solução de açúcar foi suspensa 36 horas antes da alimentação oral sendo mantidas apenas com água.

O repasto infectante foi realizado através de um sistema de membranas. O alimentador artificial foi revestido com membrana animal dissecada da pele de *Gallus domesticus* (um dia de idade). Ao alimentador foi adicionada uma mistura de 2/3 de

sangue de camundongo (*Mus musculus*) com o plasma inicialmente inativado e 1/3 do sobrenadante de células C6/36 infectadas com o DENV-2 (vírus fresco).

O sangue contendo o DENV-2 foi depositado dentro do alimentador e este permaneceu aquecido com água circulante vinda do banho-maria a 40°C. As fêmeas foram alimentadas durante o período médio de duas horas. Ao fim do processo da alimentação, as fêmeas não alimentadas foram retiradas das gaiolas. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas no infectório a 28°C e diariamente foram alimentadas com solução açucarada a 10% por um período de 14 dias.

As etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram feitas seguindo normas internacionais de segurança e executadas dentro do infectório de alta segurança do Laboratório de Entomologia Médica.

4.6 Dissecção dos mosquitos

Um total de 40 fêmeas foram dissecadas no décimo quarto dia após o repasto infectante, momento correspondente ao final do PIE do vírus.

A dissecção foi realizada a partir da separação do corpo e cabeça das fêmeas com auxílio de um microscópio estereoscópio da marca Zeiss (Stemi DV4) e estiletes. Estas amostras foram estocadas individualmente em tubos de 1,5 mL e armazenadas à -70°C até o momento do uso.

4.7 Extração de RNA

A cabeça ou o corpo dos mosquitos foram macerados em tubos cônicos de 1,5mL, com auxílio de um pistilo plástico, em 200µl de PBS 1X. Após centrifugação, 160µl do sobrenadante foi processado para extração do RNA viral através do QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram armazenadas à -70°C.

4.8 RT-PCR

4.8.1 RT-PCR “One Step” (Qiagen)

A análise molecular foi realizada com o kit “One Step” RT-PCR (Qiagen) como descrito por Ayres M (2006). Os iniciadores utilizados foram: FLAVI-1 (senso): 5’AATGTACGCTGATGACACAGCTGGCTGGGACAC3’ e o FLAVI-2 (anti-senso): 5’TCCAGACCTTCAGCATGTCTTCTGTTGTCATCCA3’.

Os amplicons gerados por estes iniciadores apresentam um tamanho de 854pb para o DENV-2. Tais iniciadores foram desenhados a partir de segmentos alvos da região conservada da proteína não estrutural NS5, comum a várias espécies de *Flavivirus* incluindo o YFV, o sorocomplexo do DENV e vários membros do sorocomplexo da Encefalite Japonesa (Ayres M *et al*, 2006).

As reações de PCR foram realizadas em placas de 96 poços em um volume total de 15µl por poço. O mix da reação continha os componentes listados na tabela 1.

Tabela 1: Reagentes utilizados para realização da PCR “One Step” – Qiagen

Componentes	Volume/reação	Concentração Final
Tampão da reação 5X	3µl	1X
Q-Solution 5X	3µl	1X
Primer senso (10 pmol)	0.9µl	0,6µM
Primer anti-senso (10 pmol)	0.9µl	0,6µM
Mix de dNTP (10mM cada)	0.6µl	400µM de cada dNTP
Mix de enzima	0.6µl	---
Água RNAase-free	3µl	---
RNA	3µl	---
Volume total	15µl	---

As reações da PCR foram processadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os ciclos foram realizados nas seguintes condições:

50°C - 30 minutos	
95°C - 15 minutos	
94°C - 1 minuto	} 45 vezes
58°C - 1 minuto	
72°C - 1 min e 30 seg	
72°C - 10 minutos	
4°C - ∞	

4.8.1.1 Eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Os resultados obtidos pela RT-PCR “One Step” (Qiagen) foram visualizados em géis de agarose a 1,5%. Para isso, foram aplicados no gel 6 μ l do produto da PCR e 3 μ l do padrão de peso molecular 100pb (Promega). Os géis foram submetidos à eletroforese (100V) utilizando tampão TAE 1 X (Tris base, EDTA 0,5M e ácido acético). Os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados no Transluminador UV 302nm T26M (Easydoc 100 – BioAgency).

4.8.2 “Semi-nested” RT-PCR (Lanciotti, 1992)

4.8.2.1 Transcrição reversa (RT)

A transcrição reversa foi realizada utilizando-se a enzima M-MLV (Promega) e seguindo as instruções do fabricante.

Uma alíquota de 5 μ l do RNA extraído foi adicionada a 2 μ l do primer reverso D2 e aquecido a 70°C por 5 minutos. Após a incubação de cinco minutos no gelo, foram adicionados 13 μ l do mix listado na tabela 2 em cada tubo. Por fim, a reação foi incubada a 42°C por uma hora.

Tabela 2: Reagentes utilizados para a produção do mix da transcrição reversa

Reagentes	Volume/reacção
Tampão 5X	4µl
Mix de dNTP (10mM cada)	4µl
Enzima M-MLV	1µl
Água RNAase-free	4µl
Volume Total	13µl

4.8.2.2 PCR

A PCR foi realizada com a enzima GoTaq (Promega) em dois passos. Na primeira PCR foram utilizados os iniciadores D1 e D2 para amplificar o fragmento de DNA de 511pb e a segunda utilizou-se o os iniciadores D1 e TS2 para amplificar o fragmento específico de 119pb correspondente ao DENV-2. Os iniciadores utilizados estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Iniciadores usados para amplificar e sorotipar DENV

Iniciadores	Seqüência	Posição no genoma	Fragmento amplificado
D1 (senso)	TCAATAGCTGAAACGCGGAGAACCG	134 – 161	511 pb
D2 (anti-senso)	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616 – 644	511 pb
TS2 (anti-senso)	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232 – 252	119 pb (D1 e TS2)

(Lanciotti RS *et al.*, 1992)

Os reagentes utilizados nas reacções estão listados na tabela 4. Para a realização da 2ª PCR foram utilizados 4µl do produto da 1ª PCR diluída 50X com água estéril e apirogênica.

4.8.2.3 Eletroforese em gel de acrilamida a 0,8%

Os resultados obtidos pela RT-PCR desenvolvida por Lanciotti (1992) foram visualizados em géis de acrilamida a 0,8%. Para isso, foram aplicados no gel 6 μ l do produto da PCR e 3 μ l do padrão de peso molecular 100pb (Promega). Os géis foram submetidos à eletroforese (110V) utilizando tampão TBE 1 X (Tris-borato, ácido bórico e EDTA) para a corrida. Foram fixados, por 10 minutos, com solução fixadora (2% ácido acético, 4% álcool etílico v/v). Após a incubação com solução de nitrato de prata (1g/500mL de água destilada) por 10 minutos, os géis foram lavado duas vezes, por 1 minuto, com água destilada. Em seguida foram incubados com solução de NaOH 3% (15g/500mL de água destilada) e 200 μ l de formaldeído até a revelação das bandas. A reação foi interrompida com a adição da solução fixadora.

Os géis foram visualizados e fotografados no Transluminador UV 302 nm T26M (Easydoc 100 – BioAgency), utilizando apenas a câmara fotográfica acoplada neste equipamento.

4.9 Análise da transmissão vertical natural

A análise da taxa de transmissão vertical natural foi realizada a partir de dois “pools”, contendo vinte fêmeas de *A. aegypti* (geração F1), de cada uma das regionais estudadas, sem passarem pelo processo do repasto infectante.

A partir destes pools foram feitas as análises moleculares através das extrações do RNA e a RT-PCR One Step como descrito acima. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%.

4.10 Análise da competência vetorial

A análise da competência vetorial foi realizada segundo Bennett KE *et al* (2002). A detecção do vírus no corpo revelou a infecção do intestino (MI) e a taxa de infecção do intestino (MIR) foi calculada como o número de intestinos positivos divididos pelo número de mosquitos expostos a alimentação.

$$\text{MIR} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de intestinos positivo}}{\text{n}^\circ \text{ de mosquitos expostos}}$$

A detecção do vírus na cabeça revelou a infecção disseminada (DI) e a taxa de infecção disseminada (DIR) foi calculada como o número de mosquitos com o vírus na cabeça dividido pelo número de mosquitos como o vírus no corpo.

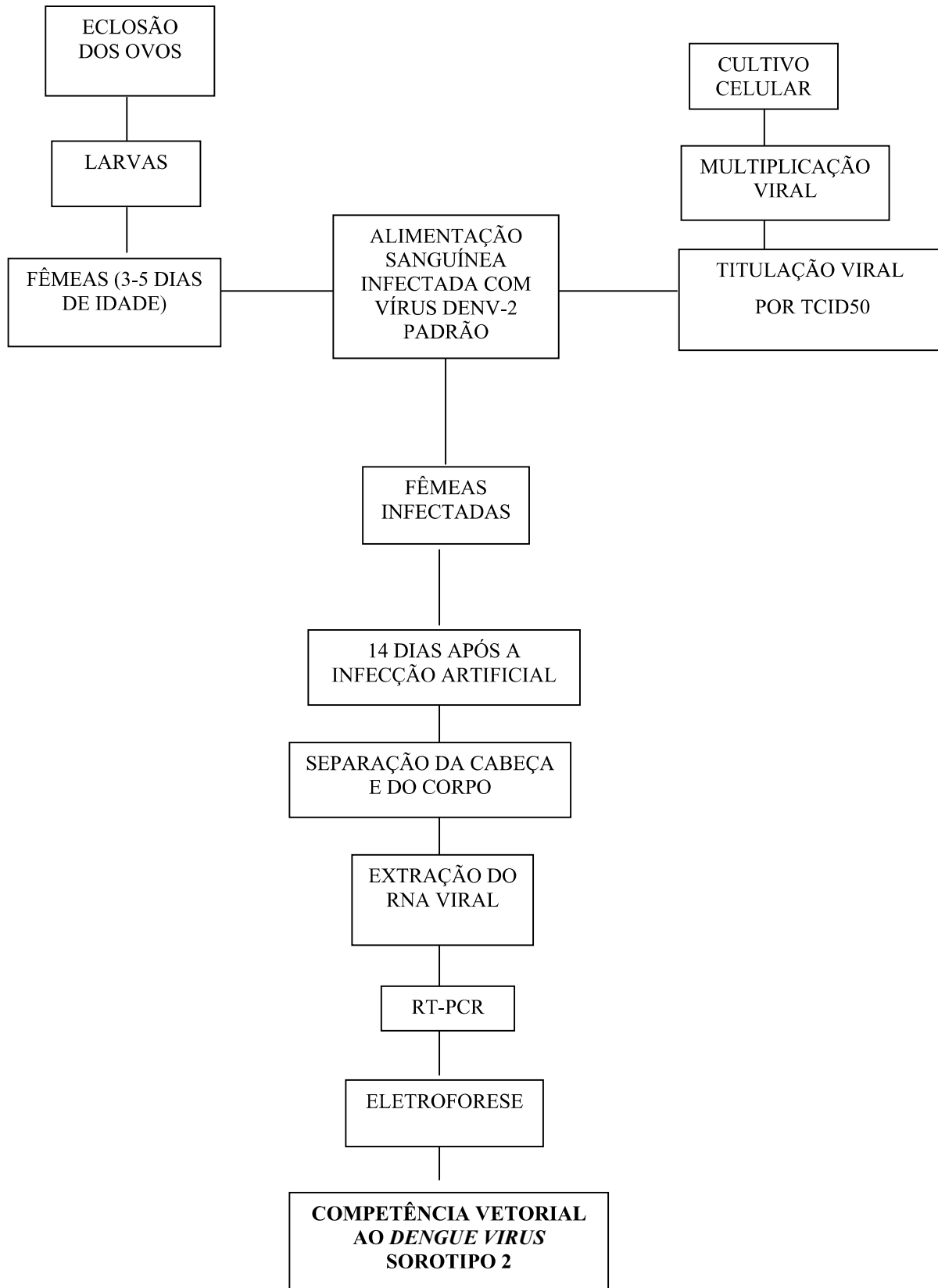
$$\text{DIR} = \frac{\text{n}^\circ \text{ mosquitos com vírus na cabeça}}{\text{n}^\circ \text{ mosquitos com vírus no corpo}}$$

A competência vetorial foi calculada como o número de mosquitos com DI dividido pelo número de mosquitos expostos.

$$\text{CV} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de mosquitos com vírus na cabeça}}{\text{n}^\circ \text{ de mosquitos expostos}}$$

A porcentagem de mosquitos exibindo a barreira de infecção do intestino médio (MIB) foi calculada como 1-MIR. E a porcentagem de mosquitos com barreira de escape do intestino (MEB) foi calculada como MIR-DIR.

4.11 Delineamento Experimental



5 Resultados

5.1 Avaliação da viabilidade da utilização de amostras congeladas de DENV-2 na infecção artificial de mosquitos.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade da utilização de alíquotas de DENV congelados, que possuem a vantagem de serem titulados apenas uma vez evitando assim variações nos títulos entre os experimentos, foram realizadas infecções artificiais com DENV congelado e DENV fresco provenientes de infecções programadas. A análise molecular foi realizada através da técnica de RT-PCR desenvolvida por Lanciotti como descrita na metodologia. O título viral da alíquota congelada foi estimado em $1,0 \times 10^4$ TCID₅₀/ml e o título do vírus fresco foi de $1,0 \times 10^6$ TCID₅₀/ml.

Para a realização deste experimento foram utilizadas duas populações de mosquito: *A. aegypti* colonizada no LEM e *A. aegypti* da cepa *Red Eyes*.

A tabela 6 exhibe a relação dos índices de infecção das duas cepas de *A. aegypti* submetidos ao processo de infecção artificial com DENV congelado e fresco. Observa-se que os índices de infecções das duas cepas de mosquitos foram menores (20%) com as alimentações contendo vírus congelado em relação às contendo vírus fresco, sendo 46% de infecção para *A. aegypti* colonizada no LEM e 80% para a cepa *Red Eyes*.

Tabela 6: Análise comparativa dos índices de infecção das duas populações de *A. aegypti* alimentadas com DENV congelado e fresco.

Populações de <i>A. aegypti</i>	DENV congelado	Índice de infecção	DENV fresco	Índice de infecção
Colônia LEM	3/15	20%	7/15	46%
<i>Red Eyes</i>	3/15	20%	12/15	80%

5.2 Análise da praticidade de duas técnicas de RT-PCR para detecção de DENV: Lanciotti (Lanciotti, 1992) X “One Step”

Devido ao grande número de amostras a serem analisadas no decorrer do projeto, duas metodologias de RT-PCR, uma desenvolvida por Lanciotti (1992) e a outra descrita por Ayres M (2006) foram testadas para a escolha de uma técnica molecular eficiente, prática e rápida.

Para a realização deste experimento utilizou-se a população de *A. aegypti* colonizada no LEM.

A figura 17 ilustra a detecção viral pela técnica molecular desenvolvida por Lanciotti (1992). A presença do DENV-2 foi caracterizada por uma banda em gel de poliacrilamida a 0,8%, corado com nitrato de prata, apresentando peso molecular de 119pb. As 13 amostras analisadas foram positivas inferindo um índice de infecção de 100%. A execução deste experimento demandou aproximadamente 10 horas e incluiu as seguintes etapas: transcrição reversa, 1ª PCR, diluição das amostras, 2ª PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida.

A detecção viral pela técnica da RT-PCR “One Step” (Qiagen) está representada na figura 18 por um amplicon de 854pb resolvido em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídio. Neste experimento utilizaram-se mosquitos derivados de uma infecção diferente daqueles que foram analisados pelo método de Lanciotti. Das 20 amostras processadas, 14 foram positivas para o DENV-2, inferindo um índice de infecção de 70%. A execução deste experimento demandou aproximadamente 5 horas e incluiu as seguintes etapas: RT e PCR em uma única etapa e eletroforese em gel de agarose.

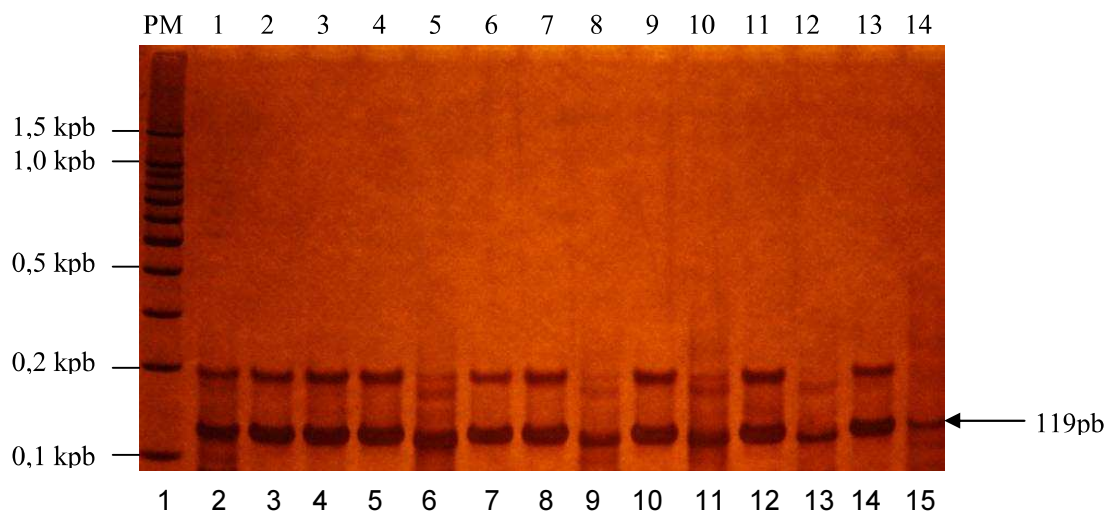


Figura 17-Detecção de DENV-2, na população de *A. aegypti* da colônia do LEM, através da RT-PCR desenvolvida por Lanciotti, 1992. Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 0,8% e corados com nitrato de prata. **Legenda:** canaleta 1: PM (padrão de peso molecular 100pb – Promega); canaletas de 2 a 14: amostras de mosquitos infectados com DENV-2, canaleta 15 controle positivo (+). A seta indica o amplicon de 119pb correspondente à positividade da amostra para DENV-2.

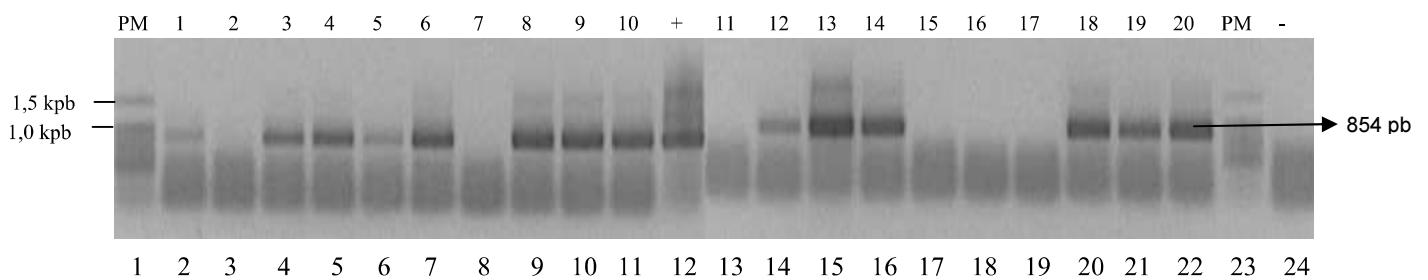


Figura 18- Detecção de DENV-2, na população de *A. aegypti* da colônia do LEM, através da RT-PCR “One Step” (Qiagen). Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio. **Legenda:** canaleta 1: PM (padrão de peso molecular 100pb – Promega); canaletas de 2-11 e 13-22: amostras de mosquitos infectados com DENV-2, canaleta 12: controle positivo (+). canaleta 24: controle negativo (-). A seta indica o amplicon de 854pb correspondente à positividade da amostra para DENV-2.

5.3 Colonização e infecção dos mosquitos.

Os *A. aegypti* das nove regionais de Belo Horizonte foram colonizados no LEM, como descrito na metodologia, até a primeira geração (F1). Durante o processo de colonização e infecção destes mosquitos foram observadas diferenças morfológicas e comportamentais entre as populações.

Os ovos derivados da regional Barreiro desenvolveram mosquitos muito pequenos em relação ao tamanho dos mosquitos das outras regionais, bem como, em relação aos mosquitos da colônia do LEM, já os derivados da regional Oeste desenvolveram mosquitos com tamanho muito superior a estes (resultados não mostrados).

No momento dos repastos infectantes o estímulo alimentar variou grandemente entre estas populações. Mosquitos da regional Norte, Nordeste e Leste alimentavam-se nos primeiros 30 minutos após oferecido o alimento numa quantidade superior a 80% do total de indivíduos expostos. Já mosquitos das regionais Barreiro, Venda Nova e Pampulha não se instigavam com o alimento oferecido e após duas horas de muito estímulo mecânico como: liberação de CO₂ nas gaiolas, intervalos de penumbra e luz no infectório, poucos indivíduos destas populações iam em busca do alimento e alimentavam-se com uma pequena quantidade de sangue (resultados não mostrados).

Das 300 fêmeas expostas ao repasto infectante, 40 indivíduos, de cada uma das nove regionais, foram processados para a análise da competência vetorial e barreiras de infecção. Os experimentos (infecções) foram repetidos 3 vezes para as regionais Norte, Oeste, Barreiro, Centro-Sul e Venda Nova para alcançar o total de 40 indivíduos ingurgitados e apenas uma vez para as regionais Nordeste, Leste, Pampulha e Noroeste, como demonstrado na tabela 7. Devido a esta diferença no número de alimentações, dividiu-se estas populações em dois grupo para as análises de MIB, MEB e CV.

Neste experimento, os vírus não congelados utilizados no repasto infectante foram titulados pelo método TCID₅₀ (Reed e Muench, 1938). A média destes títulos foi de $2,67 \times 10^6$ TCID₅₀/ml, como descrito na tabela 8. Porém, não foi possível calcular o título viral da primeira infecção, pois a placa de titulação foi contaminada com fungos.

Tabela 7: Populações de *A. aegypti* analisadas para a competência vetorial.

Regionais	Área (Km²)	Gerações usadas	N	Número de repastos infectantes
Norte	34,32	F1	40	3
Barreiro	55,14	F1	40	3
Oeste	32,10	F1	40	3
Centro-Sul	32,63	F1	40	3
Venda Nova	27,61	F1	40	3
Nordeste	39,86	F1	40	1
Leste	28,89	F1	40	1
Pampulha	46,81	F1	40	1
Noroeste	38,14	F1	40	1
Total				4

Tabela 8: Relação dos títulos virais dos quatro repastos infectantes com DENV fresco.

Repastos infectantes	TCID₅₀/ml
1 ^a	---
2 ^a	1,58 x 10 ⁶
3 ^a	5,13 x 10 ⁶
4 ^a	1,31 x 10 ⁶
Média	2,67 x 10 ⁶

5.4 Determinação da taxa de transmissão vertical natural das populações estudadas.

Para a verificação do índice de transmissão vertical natural da geração F1 de todas as populações estudadas foi realizada a análise molecular através da técnica da RT-PCR “One Step” (Qiagen), como descrita na metodologia.

As figuras 19A e B ilustram os géis de agarose a 1,5% contendo as análises moleculares, de dois pools com vinte indivíduos, de cada uma das regionais estudadas. Utilizou-se como controle *A. aegypti* não infectados colonizados no LEM.

Este resultado indicou que todos os “ pools” processados foram negativos para a presença de DENV-2.

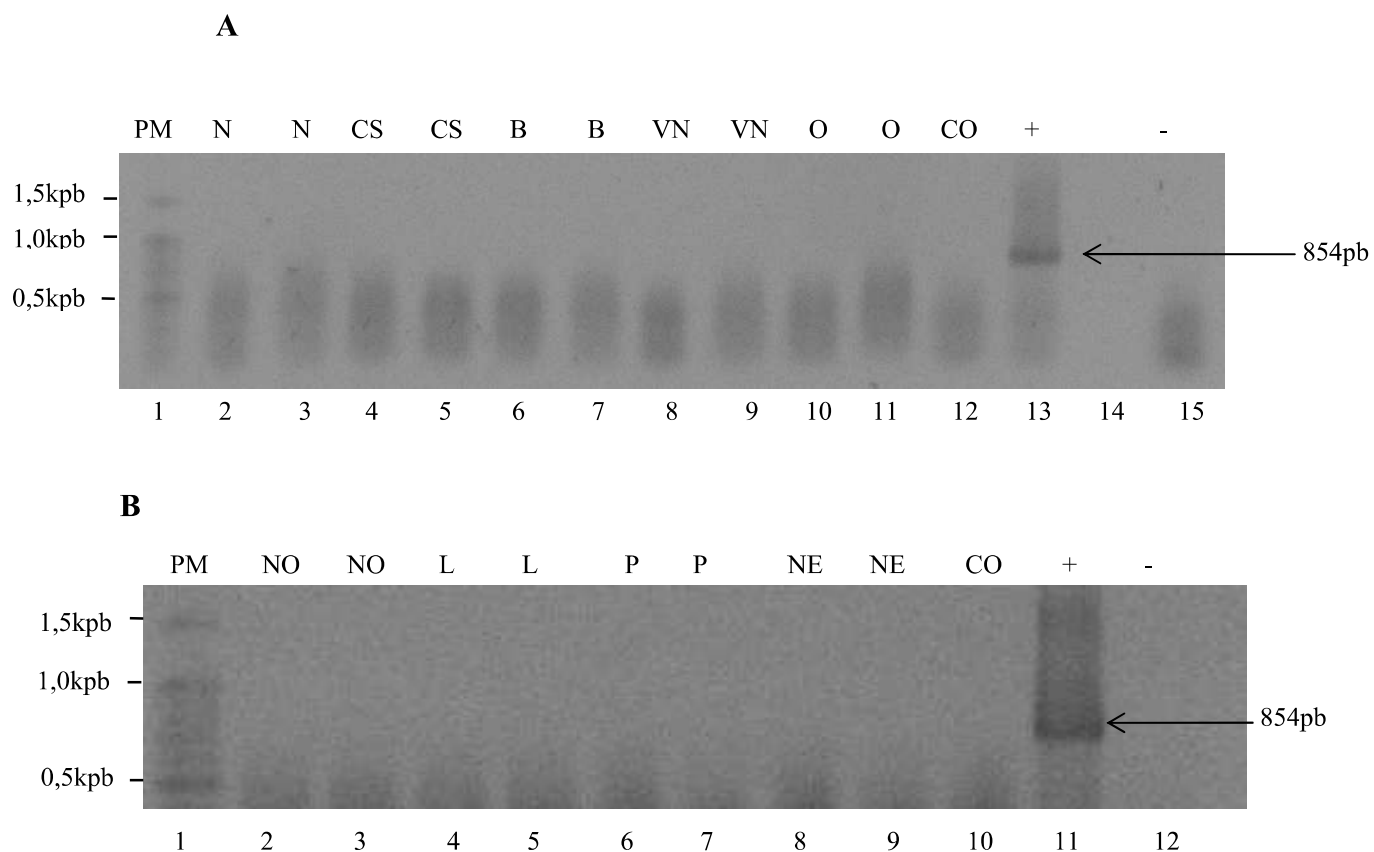


Figura 19- Análise dos pools de *A. aegypti* para determinação das taxas de transmissão vertical natural. Os amplicons foram resolvidos em géis de agarose a 1,5% e corados com brometos de etídio. **Legenda:** PM (padrão de peso molecular 100pb - Promega). **A:** duplicatas de pools de mosquitos das regionais Norte (canaletas 2 e 3); Centro-Sul (canaletas 4 e 5), Barreiro (canaletas 6 e 7), Venda Nova (canaletas 8 e 9); Oeste (canaletas 10 e 11), controle (canaleta 12), controle positivo (+) (canaleta 13) e controle negativo (-) (canaleta 15). **B:** duplicatas de pools de mosquitos das regionais: Noroeste (canaletas 2 e 3), Leste (canaletas 4 e 5), Pampulha (canaletas 6 e 7), Nordeste (canaletas 8 e 9), controle (canaleta 10), controle positivo (+) (canaleta 11) e controle negativo (-) (canaleta 12). A seta indica o amplicon de 854pb correspondente à positividade da amostra para DENV-2.

5.5 Análise comparativa da barreira de infecção (MIB), barreira de escape (MEB) e competência vetorial (CV) entre as populações de mosquitos estudadas após alimentação infectante com DENV-2.

As análises comparativas de MIB, MEB e CV entre as populações estudadas foram realizadas em dois grupos. No primeiro estão relacionadas às populações que foram submetidas a três repastos infectantes: Norte (N), Venda Nova (VN), Oeste (O), Centro-Sul (CS) e Barreiro (B) de acordo com a figura 20. E no segundo grupo estão as populações que foram submetidas apenas a um repasto infectante: Nordeste (NE), Leste (L), Pampulha (P) e Noroeste (NO) de acordo com a figura 21. Todos os resultados estão baseados em uma amostra de 40 indivíduos por regional.

As análises de MIB e MEB entre as populações das nove regionais foram avaliadas a partir da taxa de infecção dos intestinos e da taxa de disseminação do vírus para outros órgãos dos mosquitos, respectivamente. Já as análises da competência vetorial foram realizadas a partir da presença do vírus na cabeça como descrito na metodologia. Os valores brutos de MIB, MEB e CV utilizados para confecção dos gráficos estão listados na tabela 9.

Tabela 9: Valores brutos de MIB, MEB e CV utilizados para a confecção dos gráficos.

População	n	Corpo +	Cabeça +	MIR	DIR	MIB	MEB	CV
NORTE	40	33	28	0,83	0,85	0,18	-0,03	0,70
VENDA NOVA	40	10	6	0,25	0,75	0,75	-0,50	0,15
OESTE	40	20	12	0,50	0,67	0,50	-0,17	0,30
CENTRO SUL	40	14	10	0,35	0,36	0,65	-0,01	0,25
BARREIRO	40	13	10	0,33	0,76	0,68	-0,44	0,25
NORDESTE	40	10	2	0,25	0,14	0,75	0,11	0,05
LESTE	40	12	5	0,30	0,28	0,70	0,02	0,13
PAMPULHA	40	3	1	0,08	0,25	0,93	-0,18	0,03
NOROESTE	40	8	4	0,20	0,40	0,80	-0,20	0,10

Legenda: (n): total de *A. aegypti* analisados por regionais. MIR: taxa de infecção do intestino. DIR: taxa de disseminação do intestino. MIB: barreira de infecção do intestino. MEB: barreira de escape do intestino. CV: competência vetorial.

De acordo com as figuras 20A e B as populações estudadas exibiram uma variação para MIB e MEB. A população de Venda Nova exibiu a maior MIB (75%) bem como a maior MEB (50%). A população Norte apresentou o menor valor para MIB (18%) e uma porcentagem de 3% para MEB. Centro-Sul apresentou um percentual de 65% para MIB e o menor percentual para MEB (1%). Oeste obteve MIB de 50% e MEB de 17% e por fim a população Barreiro apresentou MIB de 68% e MEB de 44%.

Observa-se na figura 20C que a população com maior CV foi a Norte (70%) seguida pela Oeste (30%), Centro-Sul (25%) e Barreiro (25%) e a menor CV foi da população Venda Nova (15%).

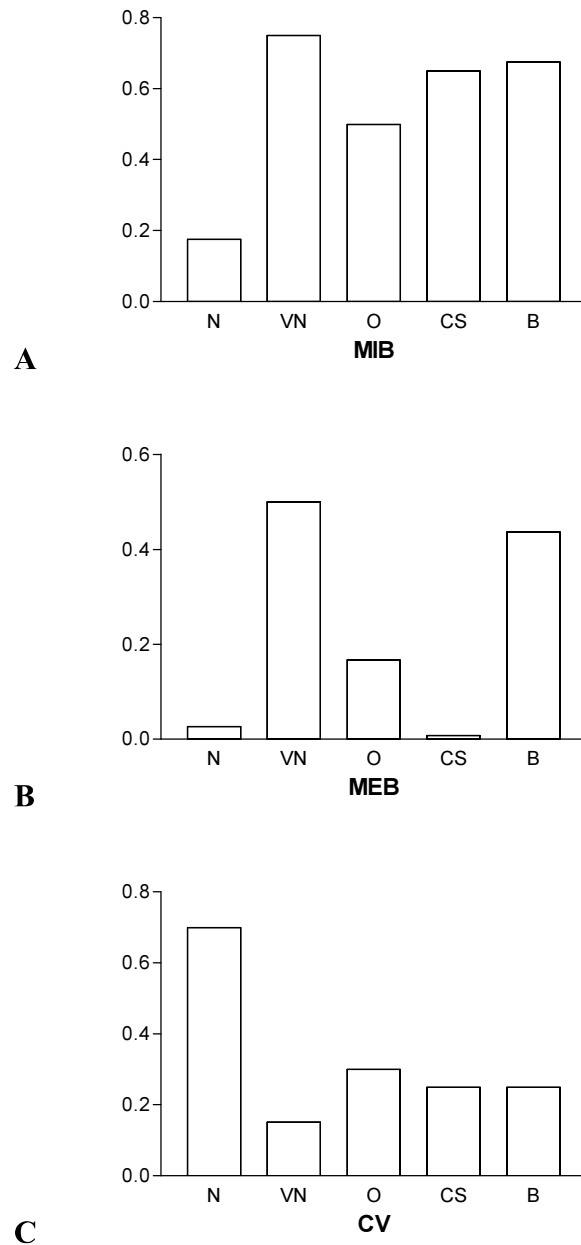


Figura 20: Gráficos ilustrando as análises comparativas da barreira de infecção (MIB), barreira de escape (MEB) e competência vetorial (CV) entre as populações de *A. aegypti* das regionais Norte (N), Venda Nova (VN), Oeste (O), Centro-Sul (CS) e Barreiro (B). **Legenda:** (A) análise comparativa de MIB (B) análise comparativa de MEB (valores de MEB foram multiplicados por -1 para facilitar visualização) e (C) análise comparativa de CV.

De acordo com a figura 21A as populações estudadas exibiram uma pequena variação para MIB. A população Pampulha exibiu a maior MIB (93%), seguida pela Noroeste (80%), Nordeste (75%) e Leste (70%). Através da figura 21B observa-se que a população com maior MEB foi a Noroeste (20%), seguida pela Pampulha (18%) e Nordeste (11%). O menor percentual de MEB foi exibido pela população Leste (2%).

Através da figura 21C observa-se a população que apresentou maior CV foi a Leste (13%) e a de menor competência foi a Pampulha (3%). A região Noroeste apresentou CV de 10% e Nordeste 5%.

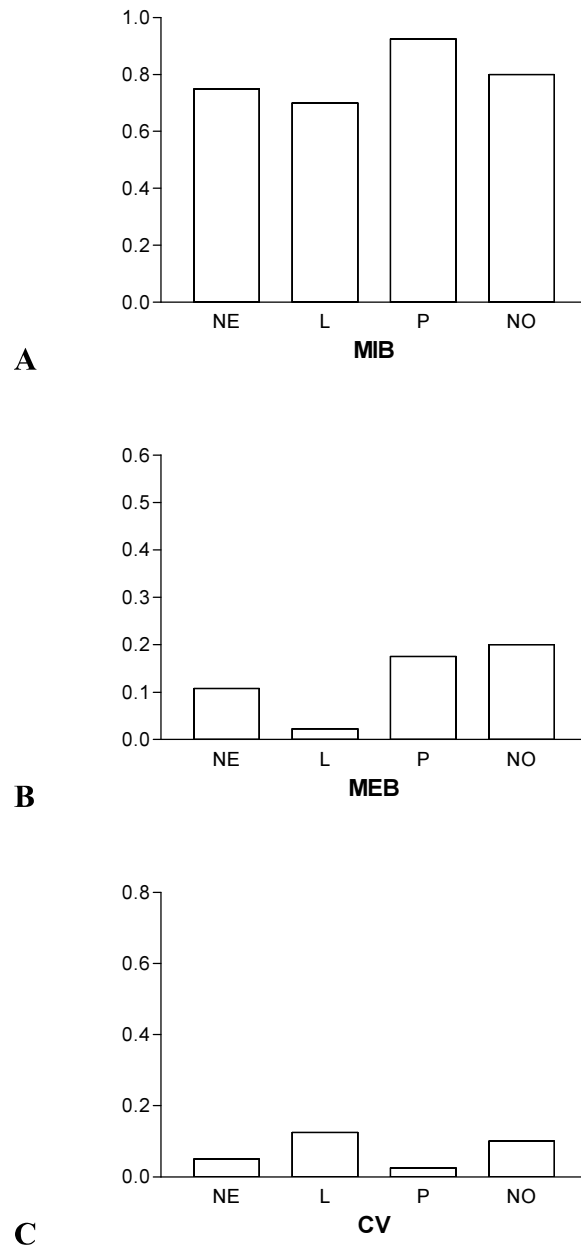


Figura 21: Gráficos ilustrando as análises comparativas da barreira de infecção (MIB), barreira de escape (MEB) e competência vetorial (CV) entre as populações de *A. aegypti* das regionais Nordeste (NE), Leste (L), Pampulha (P) e Noroeste (NO). **Legenda:** (A) análise comparativa de MIB (B) análise comparativa de MEB (valores de MEB foram multiplicados por -1 para facilitar visualização) e (C) análise comparativa de CV.

6 Discussão

O *A. aegypti* tem sido objeto de inúmeros estudos devido a sua grande importância na saúde pública e por apresentar ampla variação na competência vetorial dentro e entre populações por todo o mundo (Black IV *et al.*, 2002). Entretanto, tais estudos necessitam ser aprofundados, especialmente para populações brasileiras de mosquitos.

O Laboratório de Entomologia Médica há alguns anos estuda a biologia da interação de insetos vetores com vários patógenos, incluindo o DENV. Seguindo modelos de infecção utilizados por outros grupos de pesquisa, o sobrenadante de culturas de células de inseto infectadas com DENV é adicionado a sangue de camundongo e oferecido a fêmeas de mosquitos, conforme descrito na metodologia.

A vantagem da utilização de sobrenadante de células que não tenha sido congelado, quando comparado a utilização de alíquotas já congeladas, é o maior título viral, uma vez que uma etapa de congelamento e descongelamento de uma suspensão de vírus resulta na diminuição do título viral de no mínimo dez vezes. No entanto, a utilização de alíquotas congeladas de vírus apresenta vantagens. Como estas alíquotas podem ser preparadas e tituladas uma única vez a ocorrência de variações nos títulos virais entre os experimentos teriam mínimas alterações. Além disso, titulações concomitantes com os experimentos de infecção seriam dispensadas, o que reduziria o tempo e o custo destes experimentos.

Como o estudo da competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte necessitaria de vários experimentos de infecção artificial decidimos avaliar inicialmente a viabilidade da utilização de alíquotas congeladas de vírus numa tentativa de aperfeiçoar o modelo de infecção artificial de mosquitos já empregado em nosso laboratório. Os resultados apresentados na tabela 6 mostraram que as taxas de infecções dos *A. aegypti* alimentados com o DENV congelado (1×10^4 TCID₅₀/ml) foram, significativamente, menores quando comparados com os alimentados com o DENV fresco (1×10^6 TCID₅₀/ml). Portanto, avaliamos que deveríamos manter a utilização de alíquotas de DENV fresco nas infecções, pois, esta é a única maneira de obtenção de vírus com altos títulos virais. Além disso, a utilização de vírus com baixos títulos resulta numa diminuição significativa da taxa de infecção dos mosquitos, o que

poderia dificultar a comparação de competência vetorial de populações mais resistentes, mas não necessariamente similares quanto a CV, pois elas poderiam não ser infectadas em um experimento utilizando baixos títulos virais.

Tentativas da utilização de alíquotas de *Flavivirus* congelados, com o propósito de aperfeiçoamento de modelos de infecção, têm sido também descritos por outros grupos. Em um estudo recente, *Culex quinquefasciatus* e *A. aegypti* foram submetidos a um processo de alimentação artificial contendo sangue misturado com vírus congelado e fresco, vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e DENV-2 respectivamente. Verificou-se que as taxas de infecção e a avaliação da competência vetorial foram significativamente menores para mosquitos alimentados com sangue contendo vírus congelado (Richards SL *et al.*, 2007).

Resultados semelhantes foram encontrados por Miller (1987) utilizando o vírus da febre amarela (YFV) como modelo. Neste trabalho, *A. aegypti* foram alimentados através de um sistema de membranas contendo YFV não congelado e com um título viral relativamente baixo, estes exibiram um aumento de aproximadamente cinco vezes nas taxas de infecção quando comparados aos mosquitos alimentados com YFV congelado. Baixos índices de infecção também foram observados por Turell (1988), utilizando *Cx. pipens* e vírus da febre do Valley Rift (RVFV) congelado.

A razão da diminuição da infectividade com vírus congelado certamente está relacionada à diminuição do seu título viral provocada por mudanças estruturais nos vírions, podendo assim restringir a ligação de seus receptores com as células dos mosquitos (Miller BR, 1987). Portanto, a utilização de vírus não congelado apresenta uma grande vantagem, pois, acredita-se que as características destes vírus sejam mais próximas do real, apesar de seus títulos serem menos previsíveis que os títulos do congelado (Richards SL *et al.*, 2007). Portanto, a partir da interpretação dos nossos resultados e dos já descritos na literatura, decidimos utilizar alíquotas não congeladas de vírus em nossos experimentos, mesmo que a cada infecção tenha sido necessário realizar uma nova titulação.

Ainda buscando adequar as metodologias a serem utilizadas neste trabalho e devido à nossa grande demanda de análises, avaliamos duas técnicas de diagnóstico molecular para detecção de DENV-2 em mosquitos infectados.

Dentre os vários métodos diagnósticos relatados na literatura o mais amplamente usado é a “semi-nested” RT-PCR desenvolvida por Lanciotti *et al.*, 1992. Esta técnica foi desenvolvida com o objetivo de detectar e identificar os quatro sorotipos do DENV, tanto em soro de pacientes quanto em mosquitos infectados, e possui a combinação de dois passos (1ª e 2ª PCR's). Entretanto, devido às várias etapas necessárias para amplificação do cDNA viral as chances de contaminação são altas, demandam de um grande tempo para execução além de ser muito laboriosa.

Em função disso, adaptações deste método vêm sendo descritas na literatura a fim de simplificá-lo. Harris (1998) modificou esta técnica em um único passo e minimizou o número de primers requeridos. Gomes *et al.* (2007), também adaptaram a técnica para um novo formato de “nested” PCR em um único passo (STNPCR) a qual foi menos passível de contaminação, reduziu o tempo e o custo da reação.

Em 2006, Ayres e colaboradores descreveram uma técnica em passo único, RT-PCR “One Step”, que utiliza apenas um par de iniciadores para detecção de *Flavivirus* em mosquitos vetores. Os amplicons gerados por estes iniciadores apresentam alto peso molecular (aproximadamente 830pb) e não apresentam grandes variações de tamanho, o que torna difícil a identificação dos sorotipos. Entretanto, como utilizamos sempre um sorotipo conhecido (DENV-2) nas infecções, esta particularidade não seria um problema.

Na RT-PCR semi-nested desenvolvida por Lanciotti a presença do DENV-2 é caracterizada pela geração de um amplicon de 119pb, como observado na figura 17. Este é um fragmento de baixo peso molecular que muitas vezes é difícil de ser detectado ou mesmo diferenciado das bandas geradas por excesso de iniciadores. Além disso, devido ao seu baixo peso molecular, a revelação dos produtos amplificados só podem ser realizadas através da eletroforese em géis de poliacrilamida, que é um método mais laborioso e que demanda mais tempo quando comparado a eletroforese em géis de agarose.

Já na RT-PCR “One Step”, a presença do DENV-2 foi caracterizada por um amplicon de 854pb, como pôde ser observado na figura 18. Este é um fragmento com alto peso molecular e de fácil visualização. Com esta metodologia foi possível realizar várias amplificações simultâneas em placas de 96 poços e a utilização do gel de agarose possibilitou a resolução de uma quantidade maior de amostras simultaneamente. Além disso, o tempo total demandado para fazer a análise, desde o RNA até a visualização do

amplicon, foi significativamente menor quando comparado com a outra metodologia. Contudo, embora este seja um procedimento mais caro, ele mostrou-se confiável e prático sendo, portanto, utilizado como método de diagnóstico durante todo o trabalho.

Vencidas as etapas de uniformização do tipo de vírus e do método molecular a serem utilizados neste trabalho, partimos para o estabelecimento e manutenção da colônia das populações de mosquitos das nove regionais de Belo Horizonte.

Apesar das particularidades de cada regional, como descritas na introdução, a exceção da regional Barreiro, que é fisicamente delimitada pelo anel rodoviário, nenhuma das demais regionais apresentou um componente geográfico que pudesse limitar a dispersão dos insetos e, conseqüentemente, resultar num isolamento populacional que pudesse derivar em significativas diferenças fenotípicas.

Entretanto, no decorrer do processo de colonização e dos experimentos de infecção artificial, observamos que os mosquitos destas regionais apresentaram diferenças morfológicas. Os ovos derivados da regional Barreiro desenvolveram mosquitos muito pequenos em relação ao tamanho dos mosquitos das outras regionais, bem como, em relação aos mosquitos da colônia do LEM. Já os derivados da regional Oeste desenvolveram mosquitos com tamanho muito superior (resultados não mostrados).

Diferenças comportamentais também foram evidenciadas durante os repastos infectantes em relação ao estímulo alimentar. Mosquitos das regionais, Norte, Nordeste e Leste alimentavam-se muito bem nos primeiros 30 minutos quando expostos ao alimento, numa porcentagem superior a 80%. Já os mosquitos das regionais Barreiro, Venda Nova e Pampulha, as fêmeas não eram, a princípio, atraídas pelo alimento. Isto pode ser devido ao odor da membrana animal e/ou temperatura do sistema utilizado para o repasto. Deste modo, foram necessárias adição de estímulos mecânicos tais como, a liberação de CO₂ nas gaiolas e intervalos de penumbra e luz, para que após um período médio de 2 horas, algumas poucas fêmeas se alimentassem (15%).

Em um trabalho recente, os autores observaram que o estresse nutricional afetava a sobrevivência diária, a susceptibilidade para infecção, bem como, a competência de *Cx. pipiens* mantidos em laboratório para WNV (Vaidyanathan *et al.*, 2008). Outros autores demonstraram que a susceptibilidade à infecção e a disseminação

do DENV entre *A. aegypti* adultos é alterada pelo tamanho do corpo, onde indivíduos menores foram mais propensos a se infectar e a disseminar o vírus do que os indivíduos maiores (Alto BW *et al.*, 2008). Além disso, existem evidências de que as condições de criação das larvas e a origem geográfica dos mosquitos também podem afetar a sua taxa de infecção pelo DENV (Sumanochitrapon *et al.*, 1998).

Estas observações, juntamente com relatos descritos na literatura que correlacionam o estresse nutricional e o tamanho do corpo do animal com sua habilidade em transmitir patógenos, sugerem que estas diferenças morfológicas e comportamentais entre as populações podem influenciar diretamente as suas competências em transmitir o vírus dengue.

Embora a transmissão vetor-homem-vetor seja um mecanismo bem compreendido de transmissão do DENV, vale ressaltar que o vírus também é mantido na natureza através da transmissão transovariana, ou seja, a fêmea infectada é capaz de transmiti-lo à sua progênie. Este é um fenômeno complexo e dependente de múltiplos fatores, que apesar de não ser evidenciado em todos os indivíduos, é responsável pela persistência do vírus durante os períodos inter-epidêmicos da doença (Arunachalam N, 2008 e Angel B, 2008).

Estudos da verificação das taxas de transmissão vertical natural do DENV em populações de *A. aegypti* do sul da Índia sugerem que é freqüente a detecção de DENV em mosquitos e em larvas coletados no campo (Thenmozhi 2000). Entretanto, apesar da ocorrência de casos esporádicos de dengue durante todo o ano em Belo Horizonte (figura 5), a análise das taxas de transmissão vertical natural dos mosquitos de cada uma das regionais não acusou a presença de DENV em nenhuma população (figuras 19A e B).

Estes resultados podem ter ocorrido pelo fato das análises terem sido feitas na geração F1 das populações e não na geração parental (proveniente do campo). Dessa forma, é bem provável que os mosquitos parentais pudessem apresentar uma baixa taxa de infecção que poderia ter sido determinada se os mesmos tivessem sido empregados nesta análise. Contudo, vale ressaltar que o objetivo deste trabalho é estudar os fatores determinantes da CV entre as populações de mosquitos e não a determinação da taxa de infecção dos mosquitos coletados no campo ou de indivíduos derivados imediatamente deles, ou seja, dos mosquitos derivados diretamente dos ovos presentes nas palhetas.

Cumpridas as etapas de colonização e da análise da transmissão vertical natural dos mosquitos, partimos para o estudo da competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte. Os resultados mostraram uma variação nos valores de MIB entre as populações do primeiro (figura 20A) e do segundo grupo (figura 21A) de mosquitos analisados. Dentre todas as populações analisadas, os mosquitos da regional Pampulha apresentaram maior MIB (93%). O contrário pôde ser observado na população Norte com uma MIB de 18%.

Nos vetores potenciais com uma MIB eficiente, os vírus não conseguem infectar e/ou replicar nas células do intestino do mosquito. Variações nas taxas de infecção do intestino também podem ser observadas entre populações de mosquitos separadas geograficamente, como foi observado em populações de mosquitos do México que exibiram MIBs variando de 59% para população de Ixtapa Zihuatanejo a 14% para a população de Chetumal. Entretanto, variações de MIB podem também ser evidenciadas entre populações próximas, sugerindo que estas podem ser governadas por outros fatores além do isolamento geográfico (Bennett *et al.* 2002).

Como já comentado, estas barreiras podem ser determinadas por fatores genotípicos e ou fenotípicos, como o tamanho do corpo. No entanto, as suposições descritas na literatura a respeito do tamanho do corpo não foram observadas em nosso estudo, já que os mosquitos com corpo pequeno (Regional Barreiro) foram menos susceptíveis à infecção que os mosquitos com corpo grande (Regional Oeste). Apesar das diferenças terem sido muito pequenas estes resultados sugerem que a infecção do vetor depende de outras particularidades além do tamanho do corpo.

Tais particularidades envolvem interações complexas entre fatores biológicos intrínsecos e extrínsecos dos vírus e do vetor, bem como fatores ambientais (Black IV *et al.*, 2002 e Bennett *et al.* 2002).

Dentre os fatores intrínsecos do vetor destacam-se as características dos receptores para a adsorção dos vírus na superfície de células do intestino, ou na baixa permissividade destas células à infecção, que podem ser determinadas por múltiplos fatores como a interação entre proteínas celulares e virais (Black IV *et al.*, 2002).

Trabalhos acerca deste tema demonstraram a interação de DENV-2 com dois polipeptídeos, um de 67kDa e outro de 80kDa, expressados em células C6/36, derivadas de *A. albopictus*, sugerindo que estes peptídeos podem atuar como receptores para

DENV-2 (Muñoz *et al.* 1998). Posteriormente, estes peptídeos foram confirmados como receptores, R60 e R80, para os quatro sorotipos do vírus dengue nas células do intestino de *A. aegypti* e em células C6/36 de *A. albopictus* (Mercado-Curiel *et al.* 2006).

Outro elemento sugerido como determinante na infecção do intestino por vírus é a tripsina. Recentemente foi demonstrado que a inibição da atividade da tripsina afeta a infecção por DENV-2 diminuindo em até 97% a quantidade de vírus no intestino do *A. aegypti*, bem como diminuindo a sua disseminação para outros órgãos (Molina-Cruz *et al.* 2005). Entretanto, não há consenso a respeito deste tema, pois outro grupo de pesquisa reportou que a adição do inibidor de tripsina na alimentação sanguínea aumentou, significativamente, as taxas de infecção do intestino. Esta discrepância no resultado é justificada pelos autores como sendo a origem de uma possível alteração do inibidor de tripsina usado nos experimentos do primeiro autor (Brackney *et al.* 2008).

Há também os fatores extrínsecos do vírus e mosquitos que podem interferir nas taxas de infecção do intestino que é a composição da microbiota intestinal. Estudos recentes sugerem que a presença da bactéria *Wolbachia* limita a infecção de *A. aegypti* por DENV, apesar desta bactéria não fazer parte da flora natural deste vetor. Segundo autores, este efeito inibitório pode ser devido a uma competição entre bactéria e vírus, ambos patógenos intracelulares, por recursos celulares requeridos para suas replicações. (Moreira L *et al.* 2009).

Sendo assim, não podemos descartar a possibilidade de que alguns destes fatores também estejam influenciando a taxa de infecção do intestino dos mosquitos das populações estudadas, como já foi observado em nossos resultados, além da grande variação entre as taxas de MIB foram verificadas também diferenças comportamentais e morfológicas entre os indivíduos destas populações.

Uma vez que a infecção viral esteja estabelecida no intestino, vetores potenciais com MEB permitem a replicação do vírus nas células epiteliais, ou seja, a infecção do intestino, mas impedem o seu escape e conseqüentemente a disseminação da infecção. (Bennett KE *et al.*, 2002). Esta barreira está associada com a montagem e a maturação ineficiente das partículas virais nas células do intestino médio e na incapacidade do escape dos vírions maduros.

Na análise das variações nos valores de MEB (figuras 20B e 21B), dentre todas as populações analisadas, os mosquitos da regional Venda Nova apresentaram maior

MEB (50%), ou seja, possuem uma barreira de escape do intestino relativamente alta, o que, conseqüentemente, impede a disseminação do vírus para outros órgãos. Já os mosquitos da população Centro-Sul apresentaram uma MEB muito baixa (1%) o que favorece a disseminação do vírus e a infecção de outros órgãos como os ovários e a glândula salivar. Similarmente, variações nos valores de MEB foram também reportadas entre populações de mosquitos do México que exibiram valores de MEB variando de 43% para população de Ixtapa Zihuatanejo e a 4% para a população de Chetumal (Bennett *et al.* 2002).

Apesar dos mecanismos pelos quais o DENV se dissemina através do intestino não serem bem compreendidos, vários trabalhos têm sido realizados a fim de esclarecer os principais fatores envolvidos na disseminação do vírus em seu inseto vetor e que podem influenciar a MEB, tais como: a presença de receptores, o período de incubação extrínseco do vírus, a presença da matriz peritrófica e o papel das traquéias e dos hemócitos na disseminação do vírus.

Em 2002, Yazı Mendoza *et al.* identificaram uma glicoproteína de 45 kDa em células C6/36 de *A. albopictus*, a qual também foi detectada em extratos de ovos, larvas, pupas, bem como em intestino, ovários e glândula salivar de mosquitos adultos. Estes resultados indicam que a glicoproteína inicialmente caracterizada na superfície de células C6/36, também está correlacionada com o tropismo do DENV em tecidos de mosquitos infectados sugerindo que esta molécula pode funcionar como um complexo de receptor para o DENV.

Já Salazar *et al.*, em 2007, estudando o tropismo e a replicação do DENV-2 em *A. aegypti* infectados oralmente, verificaram que o PIE do DENV em seu vetor pode ser menor que o período já descrito (14 dias) o que possivelmente irá acarretar importantes conseqüências epidemiológicas na transmissão da dengue. Verificaram também que o sistema traqueal do vetor pode facilitar a disseminação do DENV-2 para fora do intestino e que outros órgãos dos mosquitos como: intestino, tecido nervoso e glândula salivar diferem em sua resposta para a infecção com DENV. O estudo desenvolvido por Romoser, *et al.* (2004) também demonstrou o envolvimento das traquéias e dos músculos viscerais como facilitadores na disseminação do vírus através da lâmina basal do intestino.

Já a matriz peritrófica (MP) é considerada por alguns autores como sendo uma barreira física para infecção das células intestinais com arbovírus e outros patógenos

(Chamberlain e Sudia 1961; Hardy *et al.* 1983; Orihel 1975; Stohler 1961). Porém em 2008, Kato demonstrou que a MP não representa uma barreira física para disseminação do DENV em seu vetor. Segundo observações feitas pelo autor o DENV infecta as células epiteliais do intestino antes mesmo da formação da MP.

Apesar do papel dos hemócitos de mosquitos na replicação e disseminação do vírus e na resposta antiviral a infecção por arbovírus não ser bem compreendida, a infecção destas células por arbovírus tem sido relatada na literatura, mas não caracterizada (Foy *et al.* 2004; Salazar *et al.* 2007; Sriurairatna e Bhamarapavati 1977). O primeiro estudo que demonstrou que os arbovírus infectam e se replicam em hemócitos foi desenvolvido por Parikh (2009). Neste estudo o autor mostra que os hemócitos na hemolinfa podem ser infectados por dois tipos diferentes de vírus sindbis (SINV) e em duas espécies distintas de mosquitos, *A. aegypti* e *Cx. pipiens*, além do mais, foi apresentado que estes arbovírus utilizam os hemócitos como um alvo para replicação, desde que estejam livres na hemolinfa. A partir desta infecção os vírus são disseminados por todo o corpo do mosquito através da hemolinfa.

Deste modo, não podemos descartar a possibilidade de que alguns destes fatores também estejam influenciando a taxa de disseminação do vírus em alguma das populações estudadas, pois a partir dos resultados apresentados observamos variações nas taxas de MEB entre as populações.

Como já descrito na literatura, a competência vetorial é restrita ao processo de interação vetor-patógeno, é controlada por fatores genéticos e está associada com o número de barreiras anatômicas que determinam a eficiência da infecção no vetor (Beerntsen *et al.* 2000). Estudos também têm mostrado que o *A. aegypti* exibe uma variação contínua na sua competência para transmitir *Flavivirus*. (Gubler *et al.* 1979, Black IV *et al.* 2002, Severson *et al.* 2004, Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2005).

Vários trabalhos envolvendo análises da competência vetorial em populações de *A. aegypti* para *Flavivirus* vêm ocorrendo por todo o mundo. O estudo pioneiro na avaliação da competência vetorial de populações de *A. aegypti* para o DENV foi realizado por Bennett *et al.* (2002). Neste estudo foi analisada a variação da competência vetorial de 24 populações *A. aegypti* do México e Estados Unidos para o DENV-2 mostrando que estas populações apresentam uma variação significativa em suas competências para transmitir o DENV. Johnson *et al.* (2002) também avaliaram a competência vetorial de populações brasileiras de *A. aegypti* e *A. albopictus* para

isolados de YFV. Em 2008, Diallo *et al.* pesquisaram a competência vetorial de populações de *A. aegypti* de seis regiões, com bioclimas e habitat diferentes no Senegal. Van den Hurk AF (2009) mostrou a competência vetorial de mosquitos australianos por vírus Chikungunya.

A partir dos resultados observados nas figuras 20C e 21C verificamos uma considerável variação na competência vetorial entre as populações analisadas. Podemos sugerir que a CV é primeiramente condicionada pela MIB, devido aos seus maiores valores em relação aos de MEB. No primeiro grupo (figura 20C) a população mais competente para transmitir o DENV foi a Norte (70%), seguida pela Oeste (30%), Centro-Sul (25%), Barreiro (25%) e Venda Nova (15%). Já no segundo grupo (figura 21C) os valores de CV foram muito baixos sendo de 13% para Leste, 10% para Noroeste, 5% para Nordeste e de apenas 3% para Pampulha, sugerindo que estas populações são pouco competentes na transmissão do DENV. Dentre todas as populações analisadas a de maior competência para transmitir o DENV-2 foi a Norte (70%) e a de menor CV foi a Pampulha (3%).

Dentre os fatores já citados anteriormente, que são importantes por influenciarem na susceptibilidade e/ou resistência de uma determinada população de vetor, vale ressaltar que o entendimento do controle genético da competência vetorial de um mosquito vetor e seu patógeno requer um estudo particular, pois este complexo é responsável pela manutenção da doença em uma área geográfica. (Beerntsen *et al.*; 2000).

Este tipo de estudo também tem sido possível devido ao desenvolvimento de marcadores genéticos e a procura por genes que controlam a susceptibilidade do vetor por patógenos, como a proteína de 67 kDa, descrita anteriormente como receptor de dengue por está relacionada à competência vetorial de *A. aegypti* para DENV e que hoje é sugerida como um marcador de CV para DENV em populações de *A. aegypti* (Mercado-Curiel *et al.* 2008).

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos acerca deste tema, pesquisas recentes têm demonstrado a existência de múltiplos e complexos fatores que controlam a interação de patógenos e vetores. Em 2008, Xi *et al.* demonstraram que a via Toll de *A. aegypti*, possui um papel importante na regulação da resistência para DENV e que a microbiota natural do mosquito também possui influência na regulação da infecção por dengue através da estimulação do nível basal desta via.

Ainda em 2008, a participação do óxido nítrico (NO) nas respostas às infecções com DENV em *A. aegypti* foi avaliada e verificou-se que o mesmo possui participação no controle da carga viral destes mosquitos (Ramos-Castañeda J *et al* 2008).

Já em 2009 Souza-Neto *et al.* mostraram que o *A. aegypti* usa a via JAK-STAT para controlar a infecção com DENV e que esta via faz parte da defesa anti-dengue do mosquito atuando de modo independente da via Toll e das defesas anti-viral mediada por RNAi. Além disso, Lambrechts *et al.* (2009) demonstraram que a CV do *A. aegypti* para DENV-1 é determinada pela interação do genótipo do vetor x genótipo do vírus e que o potencial para infecção do mosquito e para a transmissão do vírus depende da combinação específica de ambos os genótipos.

Outro avanço tecnológico, o seqüenciamento de genomas, tem contribuído muito para os estudos de CV. A recente obtenção da seqüência genômica do *A. aegypti* (Nene V. *et al.*; 2007) têm possibilitado a realização de análises de genômica comparativa entre os genes responsáveis pela competência vetorial de populações resistentes e susceptíveis, pois a partir da descrição destes genes específicos e dos seus promotores novas abordagens de combate a doenças transmitidas por vetores poderão ser encontradas.

Contudo, apesar das intensas pesquisas nas últimas seis décadas, ainda não há vacina disponível para Dengue. Estas investigações têm sido complexas, uma vez que a vacina deve ser tetravalente, ou seja, conferir imunidade aos quatro sorotipos do DENV simultaneamente (Pugachev KV *et al.*, 2005). Deste modo, até o presente momento, a única ação efetiva de controlar a transmissão da Dengue é o combate ao mosquito vetor.

Nosso estudo é pioneiro no Brasil e analisamos, comparativamente, a competência vetorial das populações de *A. aegypti*, das nove regionais da cidade de Belo Horizonte, para DENV-2 de acordo com o estudo realizado por Bennett *et al.* (2002) no México.

Portanto, o desenvolvimento de novas metodologias que visam auxiliar o controle do vetor e o entendimento dos mecanismos da interação vírus-vetor, são de suma importância nos dias de hoje. Foi a partir daí que nosso trabalho foi desenvolvido buscando avaliar comparativamente a competência vetorial das populações de *A.*

aegypti da cidade de Belo Horizonte a fim de apontar regiões onde o vetor possui a maior capacidade de transmitir o DENV.

7 Conclusões

A partir dos nossos resultados podemos concluir que:

1-As populações de *A. aegypti* das nove regionais de Belo Horizonte variaram nas suas competências para transmitir o DENV.

2-As taxas de infecção do *A. aegypti* em um sistema de infecção artificial mostrou-se mais eficiente quando utilizadas alíquotas de vírus fresco.

3-A técnica de RT-PCR em passo único (“One Step”) mostrou-se eficiente para análise das amostras infectadas com DENV-2 sendo mais prática e rápida que a técnica de RT-PCR “semi-nested” desenvolvida por Lanciotti em 1992.

4-A avaliação da taxa de transmissão vertical natural na geração F1 das populações estudadas não acusou a presença de DENV.

5-As análises das taxas de MIB, MEB e CV permitiram a identificação de populações mais ou menos susceptíveis a infecção pelo DENV-2.

8 Referências Bibliográficas

Almeida MCM, Assunção RM, Proietti FA, Caiaffa WT. Dinâmica intra-urbana das epidemias de dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1996-2002. *Cad Saúde Pública*. 2008; 24(10): 2385-2395.

Alto BW, Reiskind MH, Lounibos LP. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79 (5): 688–695.

Angel B, Joshi V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Vector Borne Dis*. 2008, (45): 56–59.

Arunachalam N, Tewari S.C., Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, Ayanar K, Tyagi BK. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res*. 2008, (127): 395-397.

Ayres M, Adachi D, Johnson G, Andonova M, Drebot M, Tellier R. A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. *J Virol Methods*. 2006; (135): 235-239.

Beerntsen BT, James AA, Christensen B M. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev*. Madison. 2000; 64 (1):115–137.

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

Black IV WC, Bennet KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernandez-Salas I, Munoz MDL, Farfán-Ale JA, Olson KE, Beaty BJ. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arc Med Res*. 2002; 33: 379-388.

Borges SMAA. Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas [dissertação]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da USP; 2001.

Brackney DE, Foy BD, Olson KE. The effects of midgut serine proteases on dengue virus type 2 infectivity of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79 (2): 267–274.

Brasil. Ministério da Saúde. 2008. Programa Nacional de Combate a Dengue. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância a Saúde. Brasil. 2009. Notícias: Casos de Dengue Caem no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10716.

Campanelli ES, Botelho ACC, Souza KPR, Secundino NFC, Cecílio A; Pimenta PFP. Dengue-2 virus artificial infection of Brazilian colonized *Aedes aegypti*. *Virus Res.* 2006, 1-2 vol. 11:12 – 16.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Dengue. World distribution of dengue viruses and their mosquito vector, *Aedes aegypti*, in 2008. Atlanta, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-distribution-2008.htm>.

Chamberlain RW, Sudia WD. Mechanism of transmission of viruses by mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* 1961;6: 371–390.

Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In Gubler DJ, Kuno G. (Eds.) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB international. 1997; p.175-198.

Chaturvedi UC. The curse of Dengue. *Indian J Med Res* 124. 2006 Nov; 467-70.

Christophers SR. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Cambridge. University Press, 1960.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 1994; 225 p. Brochura, il. ISBN 85-85676-03-5.

Corrêa PRL, França E, Bogutchi TF. Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais. Rev. Saúde Pública. 2005; 39(1): 33-40.

Després P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. Virology. 1993; 196(1):209-219.

Diallo M, Ba Y, Faye O, Soumare ML, Dia I, Sall AA. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2002; 67(1):.85–92.

Donalísio MR, Glasser CM. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. Rev. Bras. Epidemiol. 2002; 5(3): 260-272.

Figueiredo RMP, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MPG, Costa CA, Farias IP. Dengue Vírus Type 4, Manaus, Brazil. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 667-669.

Forattini, OP. Culicidologia médica: identificação: biologia: epidemiologia. São Paulo: EDUSP, 2002. 860p. ISBN: 85-314-0669-4. Volume 2.

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

Foy BD *et al.* Development of a new Sindbis virus transducing system and its characterization in three Culicine mosquitoes and two Lepidopteran species. Insect Mol. Biol. 2004; 13: 89–100.

Fraiha H. Reinfestação do Brasil pelo *Aedes aegypti* - Considerações sobre o risco de urbanização do vírus da febre amarela silvestre na região reinfestada. Rev Inst Med Trop. São Paulo, 1968; 10(5): 289-94.

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

Gomes ALV, Silva AM, Cordeiro MT, Guimarães GF, Marques Jr ETA, Abath FGC [in memorium]. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. J Virol Methods. 2007; 145(1): 76–79.

Gomes I. Sistemas Naturais em áreas urbanas: estudo da Regional Barreiro, Belo Horizonte (MG). Cam Geogr. 2005; 13(14): 139-150. Disponível em: <<http://www.caminhosdegeografia.ig.ufu.br/include/getdoc.php?id=393&article=139&mode=pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2010.

Gorochotegui-Escalante N, Lozano-Fuentes S, Bennett KE, Molina-Cruz A, Beaty BJ, Black IV WC. Association mapping of segregating sites in the early trypsin gene and susceptibility to dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochem and Mol Biol. 2005; 35: 771-88.

Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. Emerg Infect Dis. 1995, 1(2):55-7.

Gubler DJ. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Clin Microbiol Rev. 1998 Jul; 11 (3): 480-496.

Gubler DJ, Nalim S, Tan R, Saipan H, Sulianti Saroso J. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 1979, 28(6):1045-52.

Halstead SB. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. *In*: Gubler DJ, Kuno G, Editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: CAB International. 1997; 23-44.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Meyer RP. Mosquitoes as carriers of viral diseases. Calif Agric. 1980; 34: 8.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol* 1983; 28: 229–262.

Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J of Clin Microbiol.* 1998; 2634-2639.

Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990 Oct; 3 (4):376-96.

Holmes E, Bartley LM, Garnet GP. The emergence of dengue past, present and future. In: Krause, R.M. (ed). *Emerg Infec.* London: Academic Press. 1998; p. 301-25.

Howe GM. *A World geography of human diseases.* Academic Press, Inc, New York, N.Y. 1977.

Ibáñez-Bernal S, Briseno B, Mutebi JP, Argot E, Rodriguez G, Martinez-Campos C, Paz R, Roman PF, Tapia-Conyer R, Flisser A. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med Vet Entomol.* 1997; 11:305-309.

IBGE. 2009. Cidades: Minas Gerais: Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>

Igarashi A. Impact of dengue virus infection and its control. *Immunol Med Microbiol.* 1997; 18: 291-300.

Jobling B, Lewis DJ. *Anatomical drawings of biting flies.* London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust. 1987, 49-68.

Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Filippis AMB, Vilarinhos PTR, Resende MC, Macoris MLG, Miller BR. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: 611-613.

Joshi V, Singhi M, Chaudhary RC. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1996; 90: 643.

Joshi V, Mouyra DT, Sharma RC. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 2002; 67: 158-61.

Kantoch M. Cytopathic and pathogenic properties of dengue type 2 virus reproduced in Quail embryo fibroblast cultures. Arch. Virol. 1980; 24:335-340.

Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, McElroy K, Wessely V, Higgs S, Christensen BM. Evaluation of the function of a type I peritrophic matrix as a physical barrier for midgut epithelium invasion by mosquito-borne pathogens in *Aedes aegypti*. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8(5):701-12.

Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. Comp Immunol Microbiol Infec Dis. 2007 (30): 329-340.

Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto. 2008; (62): 71-92.

Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, Scott TW. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. BioMed Central. 2009; 9(160): 1-11.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Journal of clinical microbiology. 1992, 545-551. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. J Gen Virol. 1994; 75 (1):65-75.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flavivirus. Adv. Virus. Res. 2003; 59: 23-61.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CMC. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. Fields Virology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007, p. 1101-1152.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004; 98: 43-54.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. Nat Med. 2004; 10: 98-109.

Mairuhu ATA, Wagenaar J, Brandjes DPM, Van-Gorp ECM. Dengue: an arthropode-borne disease of global importance. Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis. 2004; (23): 425-433.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue Viral Infections. Postgrad. Med. J. 2004; (80): 588-601.

Mercado-Curiel RF, Black WC, Munoz Mde L. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. BMC microbiol. 2008; 8:118.

Mercado-Curiel RF, Esquinca-Avilés HA, Tovar R, Díaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Muñoz ML. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. BMC Microbiol. 2006; 6 (85): 1-10.

Miller BR. Increased yellow fever virus infection and dissemination rates in *Aedes aegypti* mosquitoes orally exposed to freshly grown virus. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987;81(6):1011–1012.

Minas Gerais. Secretária de Estado de Saúde. 2009. Informe Epidemiológico sobre a Dengue. Disponível em: <http://gaia.saude.mg.gov.br>.

Molina-Cruz A, Richardson J, Bennett K, Black IV W, Barillas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 72(5): 631–637.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell.* 2009; 139 (7): 1268-78.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A Structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev. Microbiol.* 2005; 3: 13-22.

Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A. Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Letters.* 1998; 168: 251-258.

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science.* 2007; 316 (5832):1718-23.

Ngo Thi Nhan, Cao Xuan Thanh Phuong, Rachel Kneen, Bridget Wills, Nguyen Van My, Nguyen Thi Que Phuong, *et al.* Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. *Clin Infect Dis.* 2001; (32): 204-213.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Araújo ESM, Santos FB, Filippis AMB, *et al.* Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986–1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(3):297–304.

Orihel, TC. The peritrophic membrane: its role as a barrier to infection of the arthropod host. In: Maramorosch, K.; Shope, RE., editors. *Invertebrate Immunity Mechanisms of Invertebrate Vector-Parasite Relations.* Academic Press; New York: 1975; 65-73.

Parikh GR, Oliver JD, Bartholomay LC. A haemocyte tropism for an arbovirus. *J Gen Virol.* 2009, 90: 292-296.

Pereira ST, Secundino NF, Botelho AC, Pinheiro VC, Tadei WP, Pimenta PF. Role of egg buster in hatching of *Aedes aegypti*: scanning electron microscopy study. *J Med Entomol*. 2006;43 (1):68-72.

Prefeitura de Belo Horizonte. 2009. Sala de notícias: Balanço da dengue. Disponível em:<http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/noticia.do?evento=portlet&pAc=not&idConteudo=35101&pIdPlc=&app=salanoticias>.

Prefeitura de Belo Horizonte. 2009. Dengue. Disponível em: <http://www.pbh.gov.br/smsa/bhdengue>.

Prefeitura de Belo Horizonte. 2010. Regionais de Belo Horizonte. Disponível em: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=pbh&tax=5627&lang=pt_BR&pg=5120&taxp=0&.

Pugachev K, Guirakhoo F, Monath TP. New developments in flavivirus vaccine with special attention to yellow fever. *Curr Opin Infect Disease*. 2005; 18: 387-394.

Ramos-Castañeda J, González C, Jiménez MA, Duran J, Hernández-Martínez S, Rodríguez MH, Lanz-Mendoza H. Effect of Nitric Oxide on Dengue Virus Replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Intervirology*. 2008; 51: 335-341.

Rebelo JMM, Costa JML, Silva FS, Pereira YNO, Silva JM. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1999; 15: 477-86.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*. 1938; (27): 493–497.

Rey, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p. il., tab. ISBN 85-277-0677-6.

Richards SL, Pesko K, Alto BW, Mores CN. Reduced infection in mosquitoes exposed to blood meals containing previously frozen flaviviruses. *Virus Res.* 2007; 129 (2): 224-227.

Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gluber DJ, Sanders EJ, Vorndam VA. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet.* 1998; (352): 971-977.

Rocco IM, Kavakama BB, Santos CLS. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2001; 43(1):55-57.

Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: Gubler DJ, Kuno G. (Eds.) *Dengue and Dengue hemorrhagic fever.* New York: CAB Intern. 1997; p.45-60.

Romoser WS, Wasieloski LP Jr, Pushko P, Kondig JP, Lerdthusnee K, Neira M, Ludwig GV. Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. *J Med Entomol.* 2004, 41 (3): 467-75.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* 2007; 30 (7): 1-13.

Schatzmayer HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro—1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 81(2): 245–6.

Severson DW, Knudson DL, Soares MB, Loftus BJ. *Aedes aegypti* genomics. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004; 34: 715-21.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *PNAS.* 2009, 106 (42): 17841-17846.

Sriurairatna S, Bhamarapravati N. Replication of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Am. J Trop Med. Hyg.* 1977; 26 (6): 1199-1205.

Stohler HR. The peritrophic membrane in blood sucking Diptera in relation to their role as vectors of blood parasites. *Acta Trop* 1961; 18: 263–266.

Sumanochitrapon W, Strickman D, Sithiprasasna R, Kittayapong P, Innis BL. Effect of size and geographic origin of *Aedes aegypti* on oral infection with dengue-2 virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1998, 58(3): 283-6.

Sylla M, Bosio C, Urdaneta-Marquez L, Ndiaye M, Black IV WC. Gene flow, subspecies composition, and dengue virus-2 susceptibility among *Aedes aegypti* collections in Senegal. *Plos Negl Trop Dis.* 2009; (3): 1-14.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Inf Epidemiol SUS.* 1999, 8(4):5-33. Disponível em: < <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/iesus/v8n4/v8n4a02.pdf> > Acesso: 18 mar. 2010.

Teixeira MG, Costa MCN, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saúde Pública.* Rio de Janeiro, 2005; 1(5):1307-1315.

Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med.* 1937; 65: 787-800.

Thenmozhi V, Tewari SC, Manavalan R, Balasubramanian A, Gajanana A. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in southern India. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg – Short Report.* 2000; 94: 507.

Torres, EM. Dengue. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. 344 p. ilustr.; tab.; Graf.

Turell MJ. Reduced Rift Valley fever virus infection rates in mosquitoes associated with pledget feedings. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39(6):597–602.

Vaidyanathan R, Fleisher AE, Minnick SL, Simmons KA, Scott TW. Nutritional stress affects mosquito survival and vector competence for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 727-732.

Van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Smith GA, Mackenzie J S. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009, 1-7.

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin A P, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 518-528.

Wills BA, Nguyen MD, Ha TL, Dong TH, Tran TN, Le TT, Tran VD *et al.* Comparison of Three Fluid Solutions for Resuscitation in Dengue Shock Syndrome. *N Engl J Med.* 2005; 9 (353): 877-889.

Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ. Biology of Disease Vectors. In Marquardt WC, Beaty BJ, editores. *Natural cycles of vector-borne pathogens.* Colorado: University Press of Colorado. 1996; 51–72.

World Health Organization (WHO) .Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. Disponível: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html>.

World Health Organization (WHO). Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet N° 117. Revisado: 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

World Health Organization (WHO). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 1997; p. 1-84.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 2008; 4(7): e1000098.

Yazi Mendoza M, Salas-Benito JS, Lanz-Mendoza H, Hernández-Martínez S, del Angel RM. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67(1):76-84.