

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

**A competência vetorial do *Aedes aegypti* associada à genética populacional na cidade de
Belo Horizonte, Minas Gerais**

por
Karine Renata Dias Silveira

Belo Horizonte

2017

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR

K.R.D.SILVEIRA 2017

KARINE RENATA DIAS SILVEIRA

**A competência vetorial do *Aedes aegypti* associada à genética populacional na cidade de
Belo Horizonte, Minas Gerais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Nágila Francinete Costa Secundino

Coorientação: Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Belo Horizonte

2017

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

S587c Silveira, Karine Renata Dias.
2017

A competência vetorial do *Aedes aegypti* associada à genética populacional na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais / Karine Renata Dias Silveira. – Belo Horizonte, 2017.

xvii, 50 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 62 -67

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Dengue/transmissão 2. *Aedes*/parasitologia 3. Vírus da Dengue/patogenicidade I. Título. II. Secundino, Nágila Francinete Costa (Orientação). III. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.918 52

KARINE RENATA DIAS SILVEIRA

A competência vetorial do *Aedes aegypti* associada à genética populacional na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Fabiano Duarte Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Alzira Batista Coelho (FUNED) Titular

Prof. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 16/02/2017.

Dedico com todo amor,

À meu sobrinho e afilhado, Eduardo

Que chegou no início desse projeto,

E foi a maior fonte de alegrias e força durante o caminho

AGRADECIMENTOS

Suporte financeiro

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou;

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Programa Ciência Sem Fronteiras);

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Nágila Secundino, por sempre ter acreditado em meu potencial, pela orientação, oportunidade, carinho, força e exemplo;

Ao meu coorientador, Dr. Paulo Pimenta, pela oportunidade, confiança e ensinamentos;

Ao amigo e Dr. Nilton Barnabé, por todos os ensinamentos, análises e conselhos acerca desse trabalho;

Aos Professores e à Secretaria Acadêmica do programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do CPqRR, por todo o suporte durante os últimos dois anos;

À Secretaria Municipal de Saúde, pela colaboração e confiança no trabalho;

À Plataforma de Sequenciamento do CPqRR;

À todos os amigos do LEM, por todo o apoio nessa jornada, pela ajuda durante os experimentos, e também por todas as conversas e risadas que facilitaram o caminho;

Às princesas do LEM, pela companhia diária, por cada almoço, lanche, conversas, conselhos, ajudas nos experimentos, brincadeiras e por todas as risadas! Em especial à “princesa” Raphaela, pelos milhares de tubos identificados e extrações realizadas;

Aos meus pais, Cláudia e Arimatéia, por nunca terem medido esforços para que eu tivesse acesso à melhor educação possível; por serem meus maiores exemplos, meu porto seguro, e me lembrarem sempre que *“I can Always come back home”*;

À minha irmã Kelly e meu cunhado Elias, por todo apoio e torcida, e por terem me dado os dois melhores presentes de minha vida nos últimos 2 anos;

Aos amigos do Comitê Estudantil, por abrirem meu caminho para outros olhares e possibilidades dentro e fora de nossa instituição e por todo crescimento profissional e pessoal que nossa convivência proporcionou;

Aos amigos e companheiros do mestrado e à todos os amigos de outros laboratórios e setores da instituição, em especial Mari Freire, Kathy, Nay e Elizinha, o suporte e apoio de todos, dentro e fora da instituição, foram fundamentais para que esse trabalho fosse concluído;

Aos amigos Luiz Gustavo e Juliana Saliba, por todo incentivo e conselhos ao longo dos anos e por serem os gigantes que me apoiaram nos ombros quando precisei olhar por cima e encontrar novos caminhos;

À Natália e Núbia, profissionais incríveis, que me auxiliaram a encontrar o melhor

caminho para a realização de meus sonhos;

À todos os amigos de Betim e BH, pelos momentos de distração, incentivo e apoio sempre;

À toda minha família: tios, tias, primos e primas, por todo estímulo, confiança, apoio e torcida;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto, deixo meu muito obrigada;

Por fim, mas acima de tudo, agradeço à Deus e Nossa Senhora do Carmo, meus refúgios de fé e força, sem os quais não chegaria até aqui.

RESUMO

A Dengue é uma doença emergente, causada por quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) pertencentes ao gênero *Flavivirus* e à família Flaviviridae. O vírus é transmitido pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o vetor primário. Estima-se 390 milhões de infecções anuais e 22.000 mortes, principalmente em crianças no mundo (WHO, 2016). A presença e a alta densidade dos vetores intensifica a necessidade de ações de controle. No entanto, um importante fato precisa ser considerado: as populações de mosquitos variam na sua permissividade para o desenvolvimento do flavivírus. A cidade de Belo Horizonte, alvo desse estudo, passou por 6 epidemias da doença nos últimos 20 anos (PBH, 2016). Os ovos dos *Ae. aegypti* de cada regional administrativa foram coletados pela Secretaria Municipal de Saúde separadamente e colonizados no insetário do LEM. Os adultos foram submetidos à extração de DNA, o qual foi amplificado para a sequência total de ITS. As análises filogenéticas foram realizadas com o software MEGA6. Em nosso estudo filogenético com as populações de *Ae. aegypti* de Belo Horizonte, observamos clusters melhores definidos e valores mais altos de *bootstrap* para três regionais: Oeste (O), Leste (L) e Nordeste (ND). Essas foram selecionadas para as demais análises. Mosquitos fêmeas dessas regionais foram infectadas experimentalmente com DENV-2 e o vírus foi detectado através da RT-qPCR nas amostras dissecadas dos corpos e cabeças contendo as glândulas salivares. As análises das regionais ND, L e O revelou, em 7dpi taxas de infecção de 70, 80 e 70%, respectivamente. Em 14 dpi, as taxas foram de 80% para a regional ND e de 90% para as regionais L e O. A competência vetorial das três populações em estudo variou de 50 à 70%. Não observamos diferenças estatísticas entre nenhum os grupos. Realizamos a análise do ITS dos indivíduos submetidos à infecção experimental. Não observamos o padrão de clusters encontrado anteriormente. No entanto, foi possível observar dois indivíduos negativos agrupados, ambos provenientes da regional nordeste, o que pode ser um fraco indicativo (devido ao número de amostras) de fenótipo característico para as amostras negativas.

Palavras chave: DENV (*Dengue Virus*), “ITS”, Competência Vetorial, Belo Horizonte, *Aedes aegypti*, marcador molecular

ABSTRACT

Dengue is an emerging disease caused by four serotypes of DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) belonging to the genus *Flavivirus* and to the *Flaviviridae* family. The virus is transmitted by the bite of female mosquitoes of the genus *Aedes*, with *Aedes aegypti* being the primary vector. An estimated 390 million annual infections and 22,000 deaths, especially in children worldwide (WHO, 2016). The presence and high density of vectors intensifies the need for control actions. However, one important fact needs to be considered: mosquito populations vary in their permissiveness for the development of flavivirus. The city of Belo Horizonte, the target of this study, has undergone 6 epidemics of the disease in the last 20 years (PBH, 2016). Eggs from *Ae. aegypti* from each administrative region were collected by the Municipal Health Department separately and colonized in the LEM insetário. Adults were submitted to DNA extraction, which was amplified for the total sequence of STIs. Phylogenetic analyzes were performed with the MEGA6 software. In our phylogenetic study with *Ae. aegypti* from Belo Horizonte, we observed better defined clusters and higher bootstrap values for three regional: West (O), East (L) and Northeast (ND). These were selected for the other analyzes. Female mosquitoes from these regional mosquitoes were experimentally infected with DENV-2 and the virus was detected by RT-qPCR in the dissected samples from the bodies and heads containing the salivary glands. Regional analyzes of ND, L and O revealed 7dpi infection rates of 70, 80 and 70%, respectively. At 14 dpi, the rates were 80% for the regional ND and 90% for the regional L and O. The vector competence of the three populations under study ranged from 50 to 70%. We did not observe statistical differences between any of the groups. We performed the STI analysis of the individuals submitted to the experimental infection. We did not observe the cluster pattern found previously. However, it was possible to observe two negative individuals grouped together, both coming from the northeast region, which may be a weak indicative (due to the number of samples) of characteristic phenotype for the negative samples.

Key words: DENV (*Dengue Virus*), ITS, Vector Competence, Belo Horizonte, *Aedes aegypti*, molecular marker.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Mapa da Dengue em 2016 (CDC) | 19 |
| Figura 2: Desenho esquemático mostrando a partícula viral | 21 |
| Figura 3: Mapa de Risco (LIRAA/Ovitrapas)..... | 25 |
| Figura 4: Foto de uma fêmea de <i>Ae. aegypti</i> | 26 |
| Figura 5: Foto de uma fêmea de <i>Ae. albopictus</i> | 28 |
| Figura 6: Barreiras naturais à infecção pelo <i>Dengue virus</i> | 30 |
| Figura 7: Desenho esquemático do DNA ribossomal | 33 |
| Figura 8: Imagem de uma ovitrapa | 35 |
| Figura 9: Mapa de distribuição espacial das ovitrapas da cidade de Belo Horizonte | 36 |
| Figura 10: Imagem representativa das palhetas | 37 |
| Figura 11: Árvore Filogenética representativa das 9 regionais + insetos de colônia (Grupo controle-PP), a partir da sequência total de ITS | 47 |
| Figura 12: Árvore Filogenética dos 3 grupos selecionados + insetos de colônia (PP), a partir da sequência total de ITS..... | 49 |
| Figura 13: Árvore filogenética das regionais de estudo, após infecção..... | 53 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1: Número de cópias virais por indivíduo de cada regional de estudo nos 7 e 14 dias após infecção. | 51 |
| Gráfico 2: Número de cópias virais por indivíduo das populações de <i>Ae. aegypti</i> de BH e PP nos 7 e 14 dpi..... | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Reagentes utilizados para a reação de PCR..... | 39 |
| Tabela 2: Condições para a reação de PCR do DNA extraído de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> | 39 |
| Tabela 3: Taxa de infecção (IR), taxa de disseminação (DIR) e competência vetorial (CV) das populações de <i>Ae. aegypti</i> estudadas e infectadas com DENV-2..... | 50 |
| Tabela 4: Índice de infecção (IR) das populações de <i>Ae. aegypti</i> estudadas, infectadas com DENV-2, nos anos de 2009, 2011 e 2016. | 57 |
| Tabela 5: Competência vetorial (CV) das populações de <i>Ae. aegypti</i> estudadas, infectadas com DENV-2, nos anos de 2009, 2011 e 2016 | 58 |
| Tabela 6: Número de casos confirmados de Dengue em Belo Horizonte das populações de <i>Ae. aegypti</i> selecionadas nos anos de 2009, 2011 e 2016..... | 59 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å: angstrom

C: Proteína estrutural do capsídeo da partícula viral

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDC: Centers of Disease Control

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*

CHIKV: vírus da Chikungunya

CNPQ: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

CT: ciclo de threshold

d.C.: depois de Cristo

DC: Dengue Clássica

DCC: Dengue com Complicações

DENV: vírus da dengue (ou Dengue vírus)

DENV-1: Dengue vírus 1

DENV-2: Dengue vírus 2

DENV-3: Dengue vírus 3

DENV-4: Dengue vírus 4

DNA: ácido desoxirribonucleico do inglês *desoxyribonucleic acid*

DS: Distrito Sanitário

E: Proteína estrutural do envelope da partícula viral

FAPEMIG: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FHD: Febre Hemorrágica da Dengue

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

hab.: habitante

hab./Km²: habitantes por quilometro quadrado

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ITS: Espaçador Transcrito Interno, do inglês *Internal Transcribed Space*

Km²: quilometro quadrado

LIRAA: Levantamento Rápido do Índice de Infestação de *Aedes aegypti*

m: metro

m²: metro quadrado

M: Proteína estrutural da membrana da partícula viral

MG: Minas Gerais

mL: mililitro

mm: milímetro

mm³: milímetro cúbico

MS: Ministério da Saúde

nm: nanômetro

p: valor de p

PBH: Prefeitura de Belo Horizonte

pmol: picomol

prM: Proteína precursora M

RNA: ácido ribonucleico do inglês *Ribonucleic Acid*

RT-PCR: Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase do inglês *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR: Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa do inglês *Reverse Transcriptase- Quantitative Polymerase Chain Reaction*

SCD: Síndrome do Choque da Dengue

SMS: Secretaria Municipal de Saúde

T_m: temperatura de melting

μL: Microlitro

WHO: Organização Mundial de Saúde do inglês *World Health Organization*

ZIKV: Zika vírus

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1.1 DENGUE | 18 |
| 1.1.1 A doença: breve histórico..... | 18 |
| 1.1.2 Descrição..... | 19 |
| 1.2 O <i>DENGUE VÍRUS</i> | 20 |
| 1.3 DENGUE NO BRASIL | 21 |
| 1.4 DENGUE EM BELO HORIZONTE | 23 |
| 1.5 VETORES | 25 |
| 1.5.1 Vetor primário: <i>Aedes aegypti</i> | 25 |
| 1.5.2 <i>Aedes albopictus</i> | 27 |
| 1.6 <i>AEDES AEGYPTI</i> E A COMPETÊNCIA VETORIAL..... | 29 |
| 1.7 GENÉTICA POPULACIONAL DO VETOR | 31 |
| 1.8 ITS | 32 |
| 2 OBJETIVOS..... | 34 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 34 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 34 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 COLETA DOS OVOS..... | 35 |
| 3.2 MANUTENÇÃO DOS MOSQUITOS | 37 |
| 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA | 37 |
| 3.4 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) | 38 |
| 3.5 ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA | 39 |
| 3.6 PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DE PCR E SEQUENCIAMENTO..... | 40 |
| 3.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS | 41 |
| 3.8 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO DENV NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS | 41 |
| 3.9 INFECÇÃO EXPERIMENTAL | 41 |
| 3.9.1 Células C6/36..... | 41 |
| 3.9.2 Cultura viral..... | 42 |

| | |
|--|----|
| 3.9.3 Infecção Experimental dos Mosquitos | 42 |
| 3.10 DISSECÇÃO DOS MOSQUITOS | 43 |
| 3.11 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL | 43 |
| 3.12 RT-PCR EM TEMPO REAL | 44 |
| 3.13 CRITÉRIO DE POSITIVIDADE E NEGATIVIDADE | 44 |
| 3.14 COMPETÊNCIA VETORIAL | 44 |
| 4 RESULTADOS | 46 |
| 4.1 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO DENV NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS | 46 |
| 4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS ITS | 46 |
| 4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL | 50 |
| 4.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS APÓS INFECÇÃO | 52 |
| 5 DISCUSSÃO | 54 |
| 6 CONCLUSÕES | 61 |
| REFERÊNCIAS | 62 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

1.1.1 A doença: breve histórico

Relatos iniciais sobre uma doença semelhante à Dengue são encontrados em enciclopédias chinesas das dinastias Chin (265 a 420 d. C.), Tang (610 d. C.) e Northern Sung (992 d. C.) (NOBUCHI, 1979). Um agente etiológico, semelhante ao *Dengue vírus* (DENV) também pode ter sido responsável por surtos de doença febril ocorridos no século XVII em ilhas a oeste do Oceano Pacífico e no Panamá. Adicionalmente, em Jacarta, Indonésia e Egito, no século XVIII, várias epidemias foram associadas a presença do DENV (CAREY, 1971; HOWE, 1977; MCSHERRY, 1982).

Embora existam indícios anteriores, a primeira descrição detalhada da doença foi realizada somente em 1780, na Filadélfia, Estados Unidos da América (EUA). No século XIX, várias epidemias dessa enfermidade foram registradas em Zanzibar, Calcutá, Grécia e Japão (FIGUEIREDO, 2005; FONSECA, 2015).

Na primeira metade do século XX, constatou-se que as mudanças ambientais associadas à intensa migração humana, ao acelerado crescimento populacional e a urbanização descontrolada do período pós-guerra, contribuíram para o aumento de casos de Dengue no mundo (GUBLER *et al*, 1978; GUBLER *et al*, 1981; GUBLER, 1988).

Em 1960, nas Filipinas, descreveu-se pela primeira vez, a forma grave da doença caracterizada por hemorragia grave e/ou choque que provocava óbito em 40% dos enfermos: era chamada de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)/Síndrome do Choque da Dengue (SCD) (HAMMON *et al.*, 1960). A partir da década de 1970, observou-se agravamento das epidemias de Dengue, em especial nos países tropicais e subtropicais, tornando a doença, um problema de saúde pública mundial. Nas Américas, a primeira epidemia de Dengue foi registrada em 1981 em Cuba, totalizando 344.203 casos notificados, dos quais 10.312 corresponderam à forma grave da doença, com o registro de 158 óbitos (MARTINEZ, 2006).

No Brasil, o primeiro surto de Dengue ocorreu entre os anos de 1981 e 1982, em Roraima (MS, 2016).

1.1.2 Descrição

A Dengue é uma doença emergente, de rápida expansão e propensa à pandemias em várias partes do mundo. Estimam-se 390 milhões de infecções anuais e 22.000 mortes, principalmente em crianças. Trata-se de uma doença aguda, infecciosa, não contagiosa, sistêmica e de etiologia viral, causada por quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) pertencentes ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. O *Dengue vírus* é transmitido pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o vetor primário nas Américas (WHO, 2016).

O mosquito *Ae. aegypti* é distribuído em áreas tropicais e subtropicais do globo e está presente em mais de 100 países nas diferentes regiões do mundo: Sudeste Asiático, Américas (Sul, Central e Norte), África, Pacífico e Mediterrâneo (Figura 1). Nas Américas, o *Ae. aegypti* encontra-se predominantemente em áreas urbanas e semiurbanas de 35 países e 9 territórios embora nos últimos anos, a sua presença tenha também sido relatada em áreas rurais (WHO, 2016). Todos os estados brasileiros estão infestados com a espécie e conseqüentemente, correm o risco de transmissão da Dengue (MS, 2016).

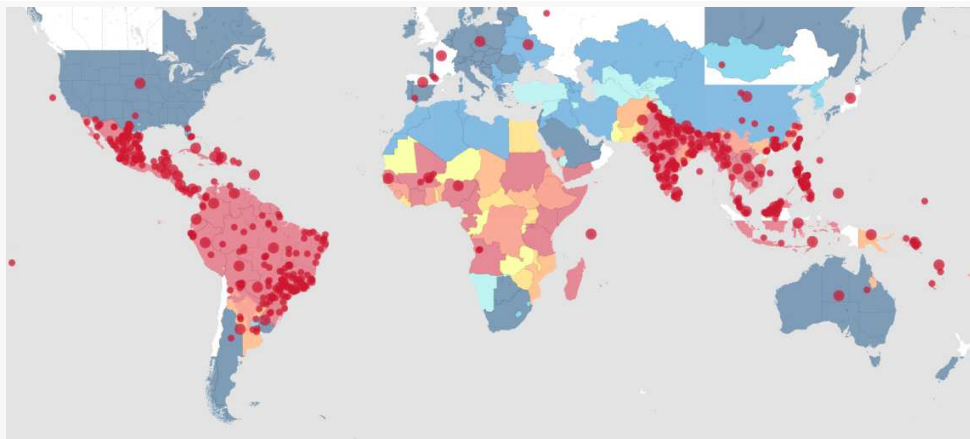


Figura 1: Mapa da Dengue em 2016. As regiões com pontos vermelhos indicam áreas de risco para a doença em 2016, definidas pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC), conforme relatos obtidos por organizações de saúde internacionais. Fonte: Adaptado de CDC – Health Map Colaboration – 2016. Disponível em: <http://www.healthmap.org/Dengue/pt/>

Devido às epidemias de proporções gigantescas, rápida propagação viral e a gravidade considerável dos casos de Dengue grave (anteriormente FHD/SCD), a doença tem grande impacto na saúde e economia, especialmente em países em desenvolvimento. A infecção pelo DENV possui grande variação clínica e patológica, que vai de quadros assintomáticos aos

quadros sintomáticos como na Dengue com sinais de alarme e Dengue grave, sendo os últimos de maior gravidade e que podem evoluir para óbito. Indivíduos infectados com um determinado sorotipo viral adquirem imunidade duradoura específica para tal, mas não para os demais três tipos. Habitantes de áreas endêmicas da Dengue podem apresentar várias infecções por sorotipos diferentes no decorrer da vida. Observações epidemiológicas sugerem que infecções sucessivas por diferentes sorotipos aumentam o risco de desenvolver Dengue grave (HALSTEAD, 1997; HALSTEAD, 2007).

O Brasil passou a adotar desde janeiro de 2014, a nova classificação para os casos de Dengue segundo a revisão da Organização Mundial de Saúde em 2009. Na nova classificação, as formas clínicas adotadas são: *i*) Dengue ou Dengue sem sinais de alarme (com sintomas de febre alta, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, petéquias, entre outros); *ii*) Dengue com sinais de alarme (caracterizada pelo agravamento dos sintomas anteriores e ocorrência de processo hemorrágico, em especial nas mucosas); *iii*) e Dengue grave (forma mais grave na qual o indivíduo acometido entra em estado de choque e pode evoluir para óbito) (WHO, 2009; SINAN 2014).

Não é possível determinar se o indivíduo ao se infectar, desenvolverá formas mais leves da doença ou evoluirá para a Dengue grave, pois a patogênese desta última ainda não é totalmente esclarecida. Contudo, observa-se que o risco de Dengue grave é cerca de quinze vezes maior na infecção secundária que na primária (HALSTEAD, 1988; GUBLER, 1997; GUBLER, 1998; GUBLER, 2002). Dentre os fatores associados à ocorrência de casos graves, destacam-se altas taxas de infestação pelo vetor, elevadas densidades populacionais humanas em uma determinada região, circulação concomitante de mais de um sorotipo do DENV e intenso deslocamento geográfico de pessoas para áreas de alta endemicidade. Em relação ao homem, idade, susceptibilidade genética e infecção prévia podem ser fatores que aumentam as chances de complicações (HALSTEAD, 1988; GUBLER, 1997; GUBLER, 1998; GUBLER, 2002).

1.2 O DENGUE VÍRUS

O DENV pertence à família *Flaviviridae* que é constituída por patógenos virais responsáveis por causar doenças graves e morte 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), West Nile vírus (WNV), o Zika Vírus (ZIKV) e o vírus da febre amarela (YFV) (MUKHOPADHYAY *et al.* 2005).

Os vírus desse 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 proteico e uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, coberta por mais de 180 cópias de duas glicoproteínas virais (LINDENBACH BD E RICE CM, 2001). O genoma dos Flavivirus possui aproximadamente 11 Kb 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), 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 2 ilustra a partícula viral com suas proteínas estruturais e seu genoma.

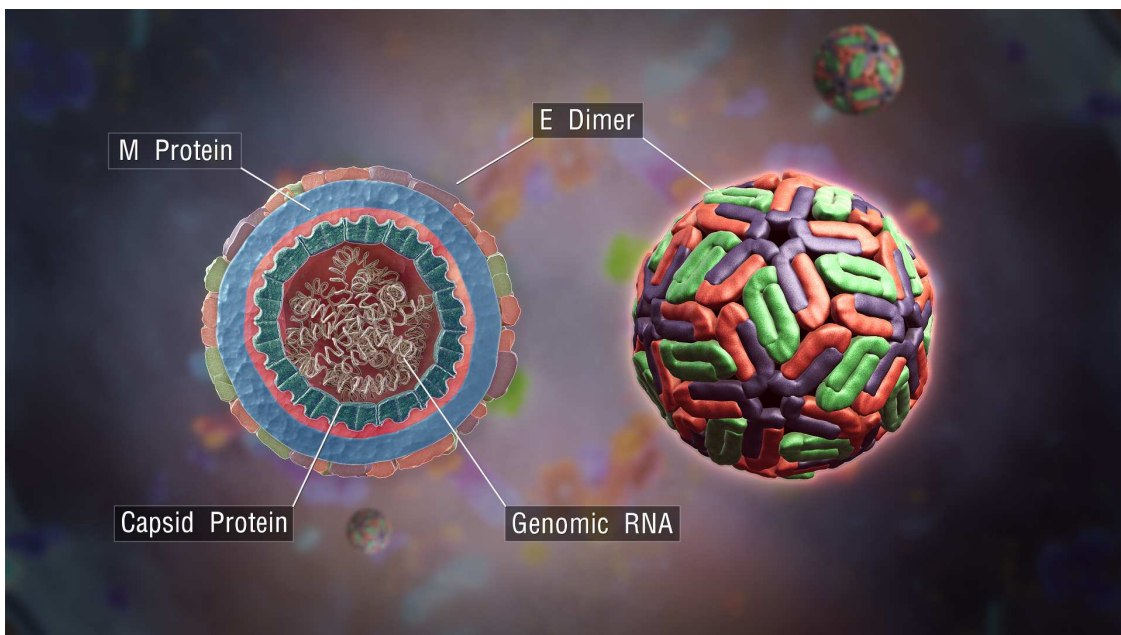


Figura 2: Desenho esquemático mostrando a partícula viral. Diagrama mostrando regiões do genoma dos Flavivirus codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais. O polipeptídeo é processado em três proteínas estruturais (*Capsid Protein*, proteína do nucleocapsídeo; *M Protein*, proteína associada à membrana; *E Dimer* a proteína do envelope; e *Genomic RNA*, o material genético do vírus). Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Dengue_virus

1.3 DENGUE NO BRASIL

No Brasil, as arboviroses, que são doenças virais transmitidas por vetores, como Dengue, Zika e Chikungunya são hoje grande problema de saúde pública, as ações se concentram principalmente no controle do principal vetor, o *Ae. aegypti*. Este mosquito está adaptado a se reproduzir nos ambientes doméstico e peridoméstico, utilizando-se de recipientes descartáveis e/ou que armazenam água potável e/ou água de chuva.

A primeira epidemia de Dengue documentada no país ocorreu em 1981 e 1982, em Boa Vista, capital do estado de Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4. Após alguns anos de queda nas notificações, o DENV-1 chegou ao Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco e Bahia) em 1986 e 1987, espalhando-se pelo país desde então. Notificou-se as entradas dos sorotipos DENV-2 em 1990 e 1991, DENV-3 em 2001 e 2002 e novamente o DENV-4 em 2010 e 2011 (MS, 2013). Desde 1998, houve aumento na mortalidade por DC e FHD no Brasil, momento em que verificou-se grande expansão territorial da circulação viral. No mesmo ano, na região Nordeste foi observada alta incidência de casos (564,1 casos por 100 mil habitantes), e um maior número de notificações (258.441). Os sorotipos DENV-1 e DENV-2, até ao período de 1994-1998, circulavam em 49,0% dos 5.570 municípios do país e o vetor foi detectado em mais de 50,0% deles. Não houve relatos de casos autóctones na região Sul, área onde a proliferação do vetor pode ter sido dificultada pelo fator climático. Em 1999, a Dengue se espalhou para outras áreas do país, destacando-se a região Norte, que apresentou a maior taxa de incidência nos anos seguintes, com 408,1 casos por 100.000 habitantes em 2001 (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Nos últimos 20 anos, o país viveu quatro grandes epidemias, associadas à mudança do sorotipo viral predominante: DENV-1, DENV-3, DENV-2, e DENV-4, em 1998, 2002, 2008 e 2010, respectivamente (MS, 2016). Nos anos seguintes, a Dengue continuou preocupando os órgãos de saúde pública. Em 2011, foram notificados 764.032 casos da doença no Brasil, e em 2012 o número foi reduzido para 591.384. Em 2013, houve novo agravamento, tendo em vista que, somente nos meses de janeiro a março, registrou-se 635.100 casos da doença em todo o território nacional, totalizando 1.452.489 casos até o fim desse ano (MS, 2013). No ano de 2014, apesar da redução considerável em relação ao ano anterior, as notificações da doença chegaram a 589.107 em todo o país, sendo que a região Sudeste foi a que apresentou um maior número de casos com 311.639 (52,9%) (MS, 2014).

Em 2015 foram registrados 1.649.008 casos de Dengue no país. A região Sudeste teve novamente o maior número de casos notificados (1.026.226 casos; 62,20%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro-Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%) (MS, 2015). Nos meses de janeiro a abril de 2016, até a semana epidemiológica 16, o Ministério da Saúde notificou, 1.054.127 casos prováveis de Dengue em todo o país, com a confirmação de 340 casos de Dengue grave e 3.626 casos de Dengue com sinais de alarme (MS, 2016).

A Dengue encontra-se atualmente presente em todos os 27 estados da federação, e o Brasil é responsável por cerca de 60% das notificações nas Américas. Os quatro sorotipos do DENV estão circulando no país, contribuindo para a incidência das formas graves da Dengue nas cidades onde se registraram epidemias sequenciais por pelo menos dois sorotipos diferentes (MS, 2016).

1.4 DENGUE EM BELO HORIZONTE

O município de Belo Horizonte, localizado na região centro-sul de Minas Gerais, com uma população estimada de 2.502.550 habitantes, está situado a 852 metros de altitude, com clima tropical, temperaturas médias anuais entre 18 e 23°C e índices pluviométricos próximos de 1.300mm anuais (IBGE, 2016).

A cidade é dividida administrativamente em nove distritos sanitários (Norte, Centro-Sul, Pampulha, Barreiro, Venda Nova, Oeste, Noroeste, Leste e Nordeste). Entretanto, é importante lembrar que a divisão da cidade em regionais administrativas (os também denominados distritos sanitários) é apenas uma questão política e praticamente não existem barreiras geográficas entre elas.

O combate à Dengue na cidade é coordenado pela Secretaria Municipal de Saúde (SMS). Em três ocasiões no ano, os agentes fazem o Levantamento de Índice Rápido do *Aedes aegypti* (LIRAA), que mede a infestação larvária na capital. A pesquisa é realizada em períodos estratégicos: janeiro (período chuvoso), março (fim do período chuvoso) e outubro (início do período chuvoso ou antecedente a ele). O LIRAA tem o objetivo de fazer a análise da situação do município, checando em qual grau de infestação se encontra e saber em quais tipos de recipientes o mosquito coloca seus ovos (PBH, 2016).

Além do LIRAA, os agentes de controle de endemias visitam, a cada dois meses, cerca de 800 mil imóveis. Durante as visitas, realizam vistoria nas residências para identificar focos do *Ae. aegypti*, além de orientar a população sobre os cuidados que devem ser tomados para se evitar a propagação da doença. Quando encontram focos do mosquito, os eliminam, ou aplicam o larvicida (Diflubenzuron), inibidor da síntese de quitina, nos criadouros que não podem ser eliminados (PBH, 2016).

Em 1996, Belo Horizonte registrou sua primeira epidemia de Dengue, com 1.806 casos da doença na forma clássica, causada pelo DENV-1. Os primeiros casos foram confirmados no Distrito Sanitário (DS) de Venda Nova, de onde vieram 88% das notificações. Em 1997, entre os meses de fevereiro e outubro, constatou-se novamente a circulação de DENV-1, com o registro de 2.327 casos, sendo do DS Oeste, a maioria dos casos, isto é, 56% (CORRÊA *et al.*, 2005).

Nos anos seguintes, a Dengue alcançou maiores proporções no município. Em 1998, na terceira epidemia, verificou-se o registro de 86.791 casos ocasionados por DENV-1 e DENV-2. Neste ano também foram registrados os três primeiros óbitos atribuídos à doença no município. A maioria das notificações ocorreu nas regionais Leste, Nordeste, Noroeste e Venda Nova. Em 2002, foi observada a circulação do DENV-3, no entanto, não houve um grande número de registros (CORRÊA *et al.*, 2005; PESSANHA *et al.*, 2012).

De 1999 a 2005, observou-se baixo número de casos em Belo Horizonte. No entanto, em 2006 houve novo aumento na ocorrência de casos da doença. Pessanha e colaboradores. (2012) atribuíram o crescimento das notificações, à provável resistência do *Ae. aegypti* ao larvicida usado para seu controle.

Em 2012, foram notificados apenas 560 casos da doença no município. No entanto em 2013, de janeiro a agosto houve o registro de 73.148 casos, o que corresponde em 130 vezes o número de notificações do ano anterior. No ano de 2014, foram registrados 3.037 casos de Dengue na cidade, sem nenhum óbito (Figura 3) (PBH, 2016).

O LIRAA de outubro de 2015, demonstra que 0,6% dos imóveis pesquisados em Belo Horizonte contava com a presença da larva do mosquito. Ou seja, a cada 100 imóveis pesquisados, em menos de 1 foram encontrados focos do *Ae. aegypti*. A pesquisa foi realizada em 49.639 imóveis e revelou, ainda, aumento no percentual de focos do mosquito dentro dos domicílios, de 80% para 86,3%, na comparação entre outubro de 2014 e 2015. Em 2015 15.749 casos de Dengue foram confirmados na cidade (PBH, 2016).

Até novembro de 2016, a cidade apresentava 155.094 casos confirmados da doença, um aumento de aproximadamente 10 vezes em relação ao ano anterior, com 55 óbitos no período (PBH, 2016).

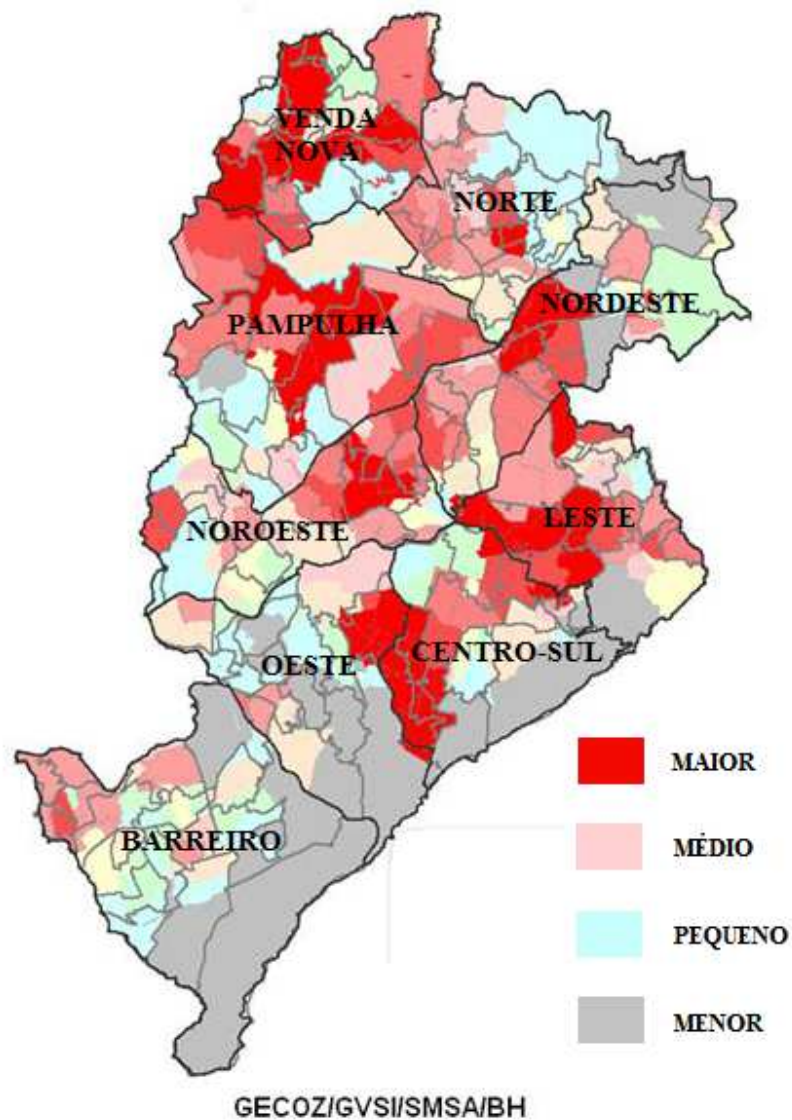


Figura 3: Mapa de Risco – baseado em medidas de presença do vetor (LIRAA/Ovitrapas), Out/2014, por bairro e regiões de Belo horizonte (PHB,2014).

1.5 VETORES

1.5.1 Vetor primário: *Aedes aegypti*

O *Ae. 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*.

O *Ae. aegypti* foi importado da África para a América durante a colonização e o tráfico de escravos, disseminou-se para toda a faixa tropical em vista de seu peculiar modo de reprodução e hoje é considerado cosmopolita. No Hemisfério Ocidental a espécie está inteiramente relacionada com a população humana. Depósitos artificiais de água, utilizados em abundância pela sociedade moderna constituem os mais importantes criadouros, responsáveis pela produção e manutenção de grandes populações deste vetor (POWELL; TABACHNICK, 2013; KRAEMER *et al.*, 2015).

Sendo um díptero, o *Ae. aegypti* se desenvolve através de metamorfose completa (holometabolía), e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvários), pupa e adulto (Figura 4) (FORATTINI, 2002).

Os ovos de *Ae. aegypti* embrionados são aptos a sobreviver por períodos prolongados em umidade e temperatura moderadas. Quanto à fase larvária, o desenvolvimento dos quatro estádios varia de cinco a dez dias em temperatura ambiente aproximada dos 25°C. Se houver baixa oferta de alimento durante esta fase pode ocorrer decréscimo no tamanho do adulto (HAWLEY, 1988).



Figura 4: Foto de uma fêmea de *Ae. aegypti*. Disponível em: www.britannica.com

O *Ae. 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 1 mm de comprimento, inicialmente brancos, após duas horas tornam-se negros devido ao processo de oxidação. Os embriões no interior dos ovos necessitam de um a três dias de alta umidade para atingirem seu desenvolvimento. Sendo durante esse período assegurado um perfeito desenvolvimento, os ovos se tornam resistentes à dessecação e podem sobreviver por vários meses e até um ano (FORATTINI 1996; FORATTINI, 2002).

A larva que emerge da ruptura do ovo é a primeira dos quatro estádios larvais. Ela cresce de 1 mm para 7 mm de comprimento. A passagem de um estágio larval para o próximo é feita pelo processo de muda durante o qual ocorre o desprendimento do exoesqueleto. A larva passa a maior parte do seu tempo se alimentando. O desenvolvimento larval se completa entre cinco e 10 dias, desde que ocorram condições favoráveis de temperatura (25°C a 29°C) e após essa, 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 do rompimento das pupas, passa-se a observar as características dos mosquitos adultos como asas, probóscide e patas.

Os mosquitos adultos alimentam-se de substâncias que contém açúcar (néctar, seiva, entre outros). As fêmeas necessitam da alimentação sanguínea para que ocorra a ovogênese (amadurecimento dos ovos). Quando o ciclo 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 (FORATTINI 1996; FORATTINI, 2002).

1.5.2 *Aedes albopictus*

O mosquito *Ae. albopictus* pertence ao grupo Scutellaris do subgênero Stegomyia. A espécie é considerada vetor primário do vírus da Dengue na Ásia (KNUDSEN, 1995) (Figura 5).



Figura 5: Foto de uma fêmea de *Ae. albopictus*. Disponível em: <https://ugaurbanag.com/tiger-tigeraedes-albopictus/>

Esse mosquito tem origem asiática, motivo pelo qual é também conhecido por “Tigre Asiático”. Sua distribuição original incluía o sudeste do continente Asiático, sendo considerado autóctone das regiões Oriental, Australásia (Austrália, Nova Zelândia e Nova Guiné), Oceania e Paleártica. Atribui-se ao comércio internacional de pneus usados a disseminação da espécie que atingiu localidades distantes de seu centro de origem, como os continentes Norte e Sul Americanos, África, Europa meridional, assim como algumas ilhas do Pacífico e Havaí, ocupando principalmente os ambientes urbano e periurbano (HUGHES; PORTER, 1956). No Brasil, *Ae. albopictus* foi relatado pela primeira vez em 1986, no estado do Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986). No mesmo ano, já se encontrava nos estados de São Paulo e Minas Gerais e, no ano seguinte, foi registrada sua presença no Espírito Santo. Em apenas um ano, *Ae. albopictus* já se encontrava instalado em todos os estados da região sudeste. Supõe-se que sua entrada em território brasileiro deveu-se ao comércio de minério de ferro com o Japão (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Semelhante ao *Ae. aegypti*, os ovos de *Ae. albopictus* embrionados são também aptos a sobreviver por períodos prolongados em umidade e temperatura moderadas. O desenvolvimento

dos quatro estádios larvários varia de cinco a dez dias em temperatura ambiente. Assim como o *Ae. Aegypti*, a oferta de alimentos pode interferir no tamanho do mosquito adulto (HAWLEY, 1988).

O *Ae. albopictus* apresenta cor negra, com uma faixa estreita longitudinal, mediana e branco-prateada, e patas marcadas de branco e preto. A espécie é encontrada preferencialmente em ambiente silvestre, o que dificulta sua eliminação pelos programas de controle urbanos. O mosquito é considerado vetor secundário do DENV nas Américas, por isso, ainda que haja a eliminação do *Ae. aegypti*, existe risco de transmissão do vírus pelo *Ae. albopictus*. Algumas áreas da Indonésia têm sido alvo de surtos de Dengue com frequência, nas partes rurais do país, onde o *Ae. albopictus* é a espécie predominante (HAWLEY, 1988; WERNER *et al.*, 2012). No Brasil, o *Ae. Albopictus* é considerado um potencial vetor, sendo que em Belo Horizonte, estudos comprovam a presença em campo, de larvas e adultos de *Ae. albopictus* infectados por DENV (PESSANHA *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2016).

1.6 AEADES AEGYPTI E A COMPETÊNCIA VETORIAL

A transmissão do DENV depende da interação do vírus com o mosquito. Quando o mosquito se alimenta do sangue de um indivíduo virêmico, este pode se infectar. Entretanto, o vírus pode encontrar no mosquito várias barreiras à infecção. A capacidade de ultrapassar essas barreiras imunofisiológicas define a competência vetorial da espécie (BLACK & SEVERSON, 2005). Como principal vetor de DENV, o *Aedes aegypti* pode transmitir os quatro sorotipos do DENV, e é objeto de vários estudos de competência vetorial, e globalmente, suas populações apresentam variações da mesma.

A competência vetorial de um artrópode refere-se à permissividade deste à infecção, replicação e transmissão de patógenos específicos. Diferentes linhagens de *Ae. aegypti*, por exemplo, apresentam grandes diferenças com relação à competência vetorial para Flavivírus, incluindo DENV (BLACK IV *et al.* 2002; BENNETT *et al.* 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 6. Sabe-se que a competência vetorial (CV) varia não só entre as diferentes espécies como também entre diferentes populações geográficas da mesma espécie (ROCCO IM, 2001).

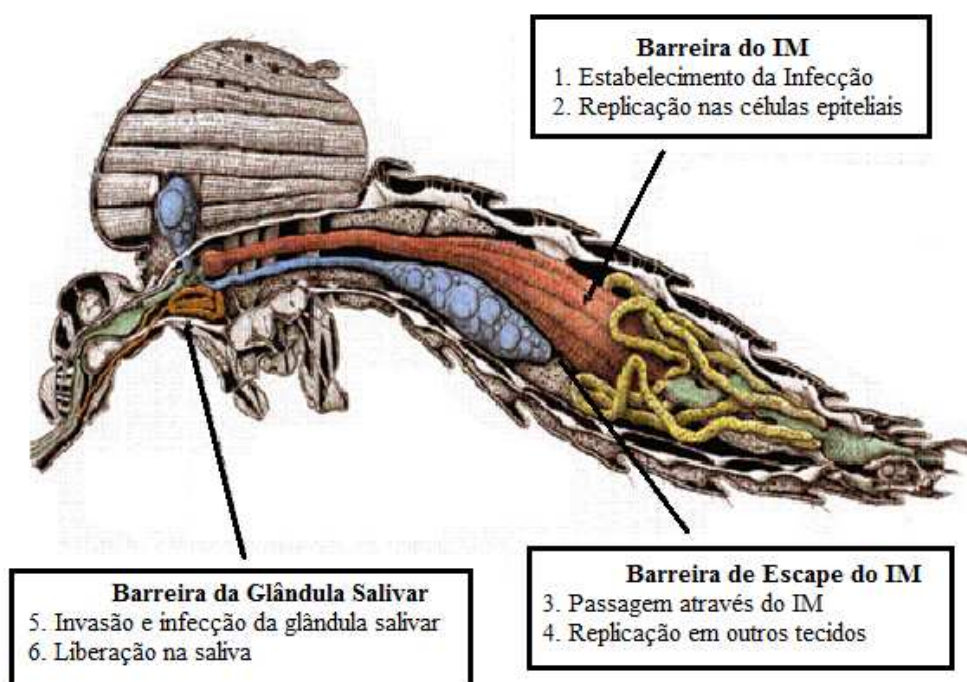


Figura 6: Barreiras naturais à infecção pelo *Dengue virus*. IM = intestino médio (Adaptado de: Jobling, 1987)

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

Após a ingestão do sangue infectado pelas fêmeas, o vírus deve ser capaz de invadir as células epiteliais do inseto e, então, se replicar. Fatores que bloqueiam um desses dois eventos fazem parte da barreira de infecção no intestino (MIB). Nos vetores potenciais com uma MIB, os vírus não podem infectar e/ou multiplicar nas células intestinais dos mosquitos. Tal fato 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 *et al.* 2002).

Em seguida, o vírus deve ser capaz de ultrapassar a lâmina basal que envolve o epitélio intestinal e, dessa forma infectar e se replicar em tecidos vizinhos. Fatores bloqueadores desses

eventos impedem a disseminação da infecção nos tecidos, e são nomeados barreira de escape do intestino (MEB). Vetores potenciais com MEB podem permitir a replicação do vírus no intestino, mas estes são incapazes de escapar e causar uma infecção disseminada. As barreiras de infecção podem variar entre as diferentes populações de *Ae. aegypti*, e portanto a competência vetorial para o DENV também pode variar (BENNETT *et al.* 2002).

Por fim, o arbovirus deve infectar e se replicar na glândula salivar antes de invadir o lúmen dos órgão para a transmissão do vírus na próxima picada. Fatores que impedem tal etapa constituem as barreiras da glândula salivar, ou barreiras de transmissão (TM).

Cada uma dessas barreiras deve ser compreendida do ponto de vista bioquímico e molecular para que seja possível entender os mecanismos que levam à infecção, replicação e transmissão do vírus no mosquito vetor, e conseqüentemente, sua competência vetorial (BENNETT *et al.* 2002; BLACK *et al.*,). Apesar de alguns genes específicos estarem associados a estas regiões, como por exemplo as tripsinas digestivas, ainda não foi determinada a identidade molecular dos genes responsáveis pela competência vetorial de uma espécie, o que se deve provavelmente ao fato de ser uma característica multifatorial bastante complexa (AMARAL & DANSA-PETRETSKI, 2012).

1.7 GENÉTICA POPULACIONAL DO VETOR

Ae. aegypti tem sido e continua a ser a espécie de mosquito mais comumente estudada, particularmente para análises genéticas de suas populações, interações com agentes patogênicos e transmissão de doenças, seus ovos são resistentes à dessecação e persistem num estado pré-embrionados, que facilita a adaptação do mesmo à cultura em laboratório (LOVIN *et al.*, 2009).

Desde a década de 70, vários estudos tem demonstrado a variabilidade genética presente em populações de *Ae. aegypti* (TABACHNICK & POWELL, 1978; 1979), e atualmente existem vários métodos que possibilitam a análise desta variabilidade (PADUAN, 2008). Loxdale & Lushai (1998) publicaram uma revisão sobre marcadores moleculares usualmente utilizados para examinar a variabilidade genética em populações de mosquito.

Um marcador molecular é qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de uma sequência de DNA, correspondente a uma região codificante ou não (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Os marcadores mais utilizados em estudos de polimorfismos são:

Isoenzimas, Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP), Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP), Microsatélites, SNPs, além do Sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) e de genes de RNA ribossomal (rRNA).

O estudo da variabilidade genética em populações naturais de *Ae. aegypti* através de marcadores moleculares tem sido utilizado com o objetivo de se estimar a variabilidade genética populacional e analisar os padrões dos fragmentos genômicos entre suas populações geográficas (PADUAN, 2008).

1.8 ITS

O genoma nuclear possui vasta complexidade e muitos genes mostram-se úteis para inferir relações filogenéticas. Um dos exemplos de utilização de genes nucleares em estudos filogenéticos é a unidade de repetição do DNA ribossômico (DNAr). A mesma apresenta sequências intercalares que variam dentro e entre populações e sequências codificadoras que são altamente conservadas e que servem como marcadores para comparação entre táxons divergentes (HILLIS *et al.*, 1996), ou mesmo entre reinos diferentes (PACE *et al.* 1986).

Nos eucariotos, o DNAr (Figura 7) é multigênico e organizado em unidades repetidas ou em tandem dentro da região nucleolar. Cada unidade repetida consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas por regiões variáveis de espaçadores não-codificantes. A quantidade de cópias do gene DNAr varia de 100 a 500 cópias no genoma nuclear na maior parte dos animais.

A unidade de transcrição, é composta de uma região promotora líder (ETS – External Transcribed Spacer), uma região codificadora do RNAr 18S, um espaçador transcrito interno (ITS-1), uma região codificadora de RNAr 5.8S, um outro espaçador transcrito interno (ITS-2), uma região codificadora de RNAr 28S, essas sequencias se repetem ao longo do DNAr e, são intercaladas por um segmento intergênico espaçador não-transcrito (NTS) (HILLIS *et al.* 1996).

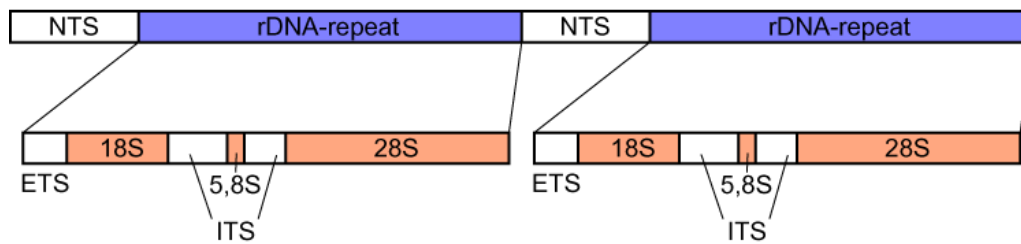


Figura 7: Desenho esquemático do DNA ribossomal. Disponível em <http://know.net/ciencterravida/biologia/dna-ribossomal/>

A partir do momento que as sequências do genoma nuclear possam ser eficientemente acessadas, elas passam a fornecer um estoque infindável de marcadores para estudos genéticos e evolutivos. A grande vantagem de trabalhar com sequências de *loci* conhecidos é que estes apresentam um potencial maior de verificação de sua variação em outras espécies e, assim, ser beneficiado pela comparação entre estudos de evolução e sistemática molecular (MATEUS *et al.* 2006).

A heterogeneidade na estrutura do DNAr pode ser atribuída a polimorfismos de tamanho e/ou mutações pontuais na sequência do espaçador intergênico (BOWEN E DOVER, 1995). Regiões não-codificadoras variáveis do DNAr são úteis na identificação de linhagens de *Leishmania donovani* (TIAN *et al.*, 2004), de espécies crípticas de diatomáceas (BESZTERI *et al.*, 2005) e de espécies de muitos insetos (SCOTT *et al.* 1993; TARTAROTTI & CERON 2005). Dentre estas regiões, o espaçador ITS-1 geralmente tem sido bem informativo (BAFFI E CERON, 2002). Em mosquitos anofelinos, as matrizes de DNAr têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de ensaios de identificação para distinguir membros de complexos de espécies (FAIRLEY *et al.* 2005). Em mosquitos do gênero *Aedes*, poucos estudos foram encontrados acerca dessa região. Estudos de Dhananjeyan e colaboradores (2010), Le Goff e colaboradores (2013), comprovam a eficiência de ITS como marcador molecular na determinação de espécies do gênero *Aedes*. Até o momento, ninguém associou essa região à estudos de competência vetorial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo da competência vetorial e sua associação com a variabilidade genética, usando ITS como marcador molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a utilização de sequências de ITS na caracterização de populações de *Ae.aegypti* representativas das nove populações de Belo Horizonte;

Seleção de populações de *Ae. aegypti* segundo os estudos com ITS;

Caracterizar a competência vetorial - CV (susceptibilidade e/ou refratariedade) das populações selecionadas de *Ae aegypti* em resposta à infecção experimental pelo DENV2;

Correlacionar a CV com a variabilidade das populações de *Ae aegypti*, segundo o ITS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DOS OVOS

Foram estudadas populações de *Ae. aegypti* originárias das nove regionais do município de Belo Horizonte, sendo elas: Norte, Barreiro, Venda Nova, Centro-sul, Oeste, Nordeste, Noroeste, Leste e Pampulha. Os ovos foram cedidos pela Secretaria Municipal de Saúde, sendo eles coletados utilizando armadilhas para oviposição (ovitrapas).

As ovitrapas são armadilhas constituídas de um recipiente de cor escura, que é preenchido com água e uma infusão à base feno. Este recipiente é normalmente feito com um vaso para plantas, podendo ser utilizados materiais reciclados em sua confecção, como garrafas pet pintadas. Nele, é colocada uma superfície rugosa, que serve de suporte à oviposição das fêmeas. Esta superfície deve ser de um material que, em contato com a água, permaneça úmido, de modo a proporcionar as condições ideais para a oviposição. No Brasil o material mais comumente usado é uma paleta de laminado de madeira, tipo “Eucatex”, que é deixado com a parte rugosa virada para cima. Este é afixado na lateral do recipiente com o uso de um clipe de papel (Figura 8).



Figura 8: Imagem de uma ovitrapa feita de vaso de plantas, utilizando um laminado de madeira para oviposição

(PBH, 2016).

As armadilhas foram distribuídas em pontos pré-determinados pela Secretaria Municipal de Saúde, em todas as regionais, respeitando a distância de 400 metros entre cada uma, com o objetivo de cobrir toda a área geográfica da cidade (figura 9).

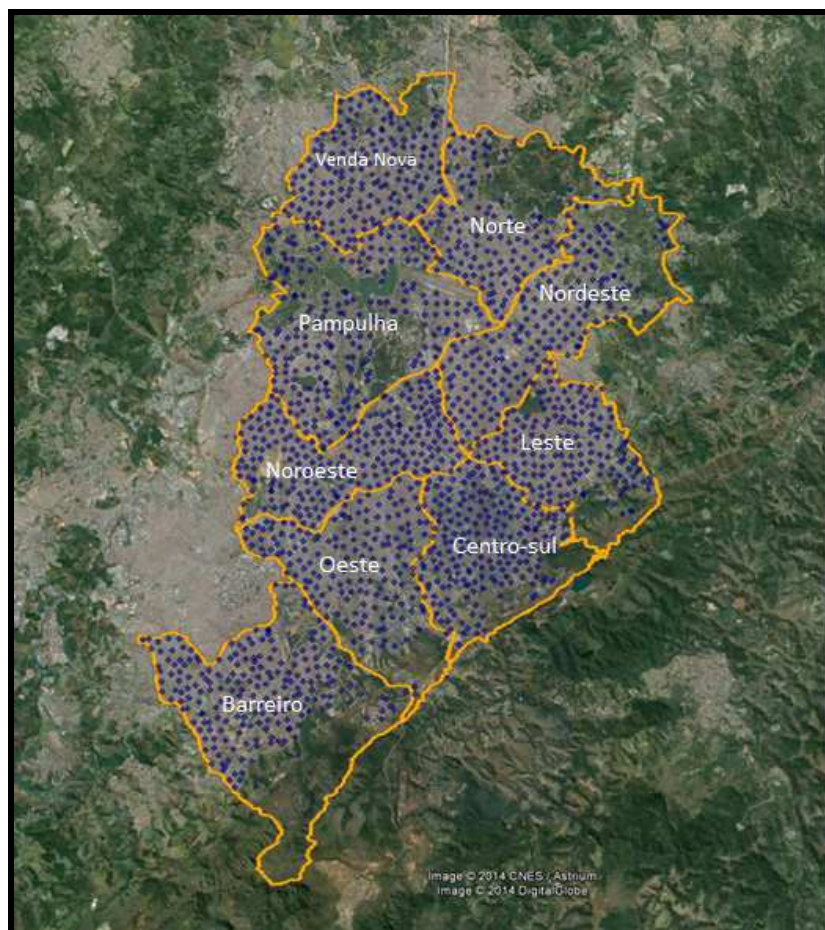


Figura 9: Mapa de distribuição espacial das ovitrampas: mapa dos 9 distritos sanitários da cidade de Belo Horizonte; os pontos azuis, representam a distribuição espacial das ovitrampas (PBH, 2016).

As palhetas contendo os ovos foram separadas por regionais e colocadas para eclosão no insetário do Laboratório de Entomologia Médica (LEM) do Centro de Pesquisas René Rachou da Fiocruz Minas (figura 10).



Fotos por: Karine Silveira

Figura 10: Imagem representativa das palhetas. A) Palhetas com ovos de *Ae. Aegypti*; B) ranhura de palheta; o círculo vermelho evidencia os ovos; C) Recipiente onde palhetas foram colocadas para eclosão dos ovos.

3.2 MANUTENÇÃO DOS MOSQUITOS

Colônias de *Ae. aegypti* representativas de cada uma das nove regionais foram estabelecidas e mantidas no insetário do LEM. As palhetas foram colocadas em recipientes plásticos tipo “bandeja” com água suficiente para cobri-las. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas com ração para peixes Goldfish da marca Alcon®, até chegarem à fase de pupa. As pupas foram coletadas em pequenos potes com água e transferidas para gaiolas até o nascimento dos mosquitos adultos. Os mosquitos adultos foram devidamente identificados de acordo com a chave para identificação das espécies que ocorrem no Brasil (CONSOLI; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, 1994) e mantidos à temperatura média de 28°C e umidade relativa do ar de 80%, a alimentação foi realizada com solução açucarada a 10% (GONÇALVES, 2010).

Larvas da geração parental foram testadas a fim de determinar a possível presença do DENV e determinar o índice de infecção natural.

Como grupo controle, utilizamos a colônia de *Ae. aegypti* (PP) originária de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, que é mantida rotineiramente no LEM desde 1999.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Dez fêmeas de cada uma das nove regionais foram individualizadas em tubos cônicos de 1,5 mL DNase/RNase free, maceradas em 200µl de Tampão Salina Fosfato (PBS – pH7.2) e centrifugadas à 7500rpm por 10min. A extração do DNA genômico prosseguiu de acordo com o kit DNeasy Blood & Tissue® (Quiagen): 180µl do macerado foram incubados à 37°C por 1h com 108µl de *Enzymatic Lysis Buffer* e 72µl de Lisozima. Em seguida adicionou-se 25µl de

proteínase K e as amostras foram incubadas à 56°C overnight. No dia seguinte, adicionou-se a cada amostra 200µl de *buffer AL*, seguidos de 200µl de etanol (96-100%). As amostras foram homogeneizadas em vortex e em seguida centrifugadas por 10min à 12000rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos coletores de 2mL com coluna e centrifugados por 1min à 8000rpm. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores, adicionou-se 500µl de *buffer AW1* e novamente foram centrifugadas à 8000rpm por 1min. Os tubos coletores foram substituídos por novos e adicionou-se às colunas 500µl de *buffer AW2*, prosseguindo com centrifugação por 3min à 14000rpm. As colunas foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf de 1,5mL, adicionou-se 50µl de *buffer AE* para eluição do DNA, incubou-se por 1min à temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se por 1min à 8000rpm.

O DNA foi quantificado e sua pureza analisada em um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram mantidas em freezer -70°C até o momento de uso.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

As amostras de DNAs de todas as regionais foram submetidos à amplificação em uma reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando primers capazes de amplificar toda a sequência de ITS, com homologia à extremidade 3' do gene 18S (5'CCT TTG TAC ACA CCG CCC GT3') do DNAr, e à extremidade 5' do gene 28S (5'ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA3') do DNAr, descritos por Fairley e colaboradores (2005, para mosquitos anofelinos).

As reações de PCR foram realizadas em tubos cônicos de 0,5mL em um volume total de 15µl por reação. O mix da reação continha os componentes listados na tabela 1.

Tabela 1: Reagentes utilizados para a reação de PCR.

| | [] Uso | μl/Tubo |
|-----------------------------|---------|---------|
| Tampão | 1 | 3 μl |
| dNTP (μM) | 200 | 0,3 μl |
| Taq (U/μl) | 0,80 | 0,24 μl |
| Primer (pmol/μl) 18S | 0,50 | 0,75 μl |
| Primer(pmol/μl) 28S | 0,50 | 0,75 μl |
| DNA | | 2 μl |
| Água | | 7,96 μl |

As reações da PCR foram processadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os ciclos foram realizados nas condições descritas na tabela 2.

Tabela 2: Condições para a reação de PCR do DNA extraído de fêmeas de *Ae. aegypti*

| Temperatura | Tempo | # de ciclos |
|-------------|-----------|-------------|
| 95°C | 4 minutos | 1 |
| 95 °C | 1 minutos | 35 |
| 55 °C | 1 minutos | 35 |
| 72 °C | 1 minutos | 35 |
| 72 °C | 5 minutos | 1 |
| 4 °C | ∞ | |

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA

Para confirmar a PCR, 3μl dos produtos de cada amplificação foram adicionados a 3μl de tampão de amostra 2X (0,125% de azul bromofenol, 0,125% de xilenocianol, e 15% de ficol) e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, em tampão de corrida TBE 1X, utilizando-se o sistema de mini gel (BIO-RAD). Os géis foram submetidos a uma corrente de 80 volts por aproximadamente 90 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, esses géis foram

corados pela prata, de acordo com o protocolo descrito por Sanguinetti *et. al.* (1994) para visualização dos fragmentos de interesse. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com um padrão de fragmentos molecular em escala de 100 pares de base.

3.6 PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DE PCR E SEQUENCIAMENTO

Os produtos da PCR foram purificados usando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Foi adicionado o mesmo volume de *Membrane Binding Solution* ao produto amplificado por PCR. A *SV Minicolumn* foi inserida no tubo de coleta. O produto de PCR preparado foi transferido para a para a *Minicolumn* e incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto em seguida, foi centrifugado a 16000×g durante 1 minuto e o tubo coletor foi esvaziado. Foram adicionados 700µl de *Membrane Wash Solution* e o tubo foi centrifugado a 16000×g durante 1 minuto, o tubo coletor foi esvaziado e reinsertado na *Minicolumn*. Novamente foram colocados 500µl de *Membrane Wash Solution* e o tubo foi centrifugado a 16 000xg durante 5 minutos. O tubo coletor foi esvaziado e o conjunto da coluna + tubo foi recentrifugado durante 1 minuto com a tampa da centrífuga aberta para permitir a evaporação de qualquer etanol residual. A *Minicolumn* foi transferida cuidadosamente para um tubo de eppendorf limpo de 1,5 ml. E então foram adicionados 50µL de *Nuclease-Free Water* à *Minicolumn* e incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto. O conjunto foi centrifugado a 16000xg durante 1 minuto e a *Minicolumn* descartada e o DNA armazenado a -20 ° C em freezer. e posteriormente, enviados para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz Minas, onde os produtos purificados foram sequenciados em ambas as direções (*forward* e *reverse*), utilizando os *primers* de PCR com um Kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* e sequenciadas num analisador de DNA ABI 3730.

Os resultados foram alinhados utilizando o software *DNA Baser*.

3.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O fragmento ITS foi amplificado como um fragmento único, utilizando primers que reconheciam no 18S e 28S. As sequências foram alinhadas por referência com as sequências da codificação de 18S e 28S e à subunidade ribossomal interna 5.8S utilizando o software DNA *Baser*. O comprimento do fragmento ITS foi em média, de 800 pares de base. Os fragmentos gerados foram cortados em ambos os lados nos limites dos primers. O algoritmo de ClustalW foi aplicado para produzir um alinhamento múltiplo completo destes consensos (Thompson *et al.*, 1994). Os desalinhamentos óbvios foram ajustados (Marrelli *et al.*, 2005). Utilizou-se a Análise de Genética Evolutiva Molecular 6 (MEGA6) para examinar as sequências e construir uma matriz de similaridade (Tamura *et al.*, 2013). As árvores ideais com a soma do comprimento dos ramos são mostradas. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os taxa associados se agrupam no teste de *bootstrap* (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da distância-p e estão nas unidades do número de diferenças de base por local.

3.8 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO DENV NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

Com o intuito de verificar a possível positividade dos ovos provenientes do campo, i.e., populações oriundas das distintas regionais administrativas de BH, foi analisado o índice de transmissão vertical natural do DENV. *Pools* de larvas da geração parental de todas as estudadas tiveram o RNA extraído e foram testadas por RT-PCR em tempo real.

3.9 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

3.9.1 Células C6/36

Foram utilizadas células C6/36, proveniente de linhagem contínua de larvas de *Ae. albopictus*, cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15) da marca Gibco, contendo 20µg/ml de estreptomicina, 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. por um período de aproximadamente 3 dias até a formação de uma monocamada de células.

Para manutenção da linhagem celular realizou-se repiques das células. Para tal, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Utilizou-se tripsina para desprendê-las da garrafa, logo após foram homogeneizadas e sobre as células repicadas acrescentou-se um novo meio L15 (Gonçalves *et al.*, 2014).

3.9.2 Cultura viral

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.

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. Em seguida adicionou-se 5 ml de meio L15 suplementado com antibióticos. Após um período de 1 hora adicionou-se 500 µl de SFB. Os vírus foram mantidos em estufa à 25°C por 3 dias. A infecção foi observada através da formação de sincícios e do efeito citopático característicos da infecção viral na cultura de células.

3.9.3 Infecção Experimental dos Mosquitos

Foram utilizadas nos experimentos de infecção 200 fêmeas (triplicata) com idade de três a cinco dias (geração parental) de *Ae. aegypti* representativas de cada uma das regionais de estudo. As fêmeas foram separadas em gaiolas identificadas por regional e a solução de açúcar foi suspensa 24 horas antes infecção experimental.

Ao alimentador, revestido com parafilme, foi (adicionado uma mistura de 2/3 de sangue de camundongo (*Mus musculus*) com o plasma previamente inativado e 1/3 do sobrenadante de células C6/36 infectadas com o DENV-2 de título viral $3,16 \times 10^5$ TCID₅₀/mL (vírus fresco). O sangue foi mantido aquecido com água circulante vinda do banho-maria a 40°C e oferecido às fêmeas por um período de duas horas. Ao fim do processo de alimentação, as fêmeas não alimentadas foram retiradas das gaiolas por aspiração manual. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas no infectório a 28°C e diariamente alimentadas com solução açucarada a 10% por um período de 14 dias após a infecção (dpi).

As etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas seguindo normas internacionais de segurança e executadas dentro do infectório do LEM.

3.10 DISSECÇÃO DOS MOSQUITOS

Para a realização das análises de competência vetorial, realizou-se a dissecação dos mosquitos infectados em 14dpi. A dissecação das fêmeas foi realizada a partir da separação do corpo e cabeças contendo as glândulas salivares, com auxílio de um microscópio estereoscópio da marca Zeiss (Stemi DV4) e estiletos. Estas amostras foram estocadas individualmente em tubos de 1,5 mL DNase/RNase *free* e macerados em PBS com auxílio de pistilo plástico e macerador *Pellet Pestle*[®] *Motor* (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, Missouri), em 200µL de PBS.

3.11 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL

Os mosquitos previamente infectados, inteiros e/ou corpo e cabeça, foram individualizados em tubos cônicos de 1,5mL DNase/RNase *free* e macerados em PBS, com auxílio de pistilo plástico e macerador *Pellet Pestle*[®] *Motor* (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, Missouri), em 200µL de PBS. Após centrifugação por 15 segundos a 8.000rpm, 140µL do sobrenadante foram processados para extração do RNA viral com a utilização do *QIAamp*[®] *Viral RNA mini Kit* (Qiagen[®], Venlo, Limburgo): em novos tubos, adicionou-se o sobrenadante e 560µL da mistura de tampão *AVL+RNA carreador*; as amostras foram vortexadas por 15seg e incubadas por 10min à temperatura ambiente. Adicionou-se 560µL de etanol (96-100%) e as amostras foram novamente vortexadas. Em um tubo com coluna de *mini spin*, adicionou-se a solução anterior (630µL por vez), centrifugando à 8000rpm por 1min, descartando o líquido filtrado. Após filtragem de todo o conteúdo, as colunas contendo os RNAs foram transferidas para novos tubos coletores, adicionando em seguida, 500µL do tampão *AW1* e centrifugando novamente por 1min à 8000rpm. O líquido filtrado foi novamente descartado e as colunas transferidas à novos tubos coletores. Adicionou-se 500µL de tampão *AW2*, e as colunas foram centrifugadas por 3min à 14000rpm, os tubos coletores foram descartados e as colunas transferidas para tubos do tipo *ependorf* de 1,5mL devidamente identificados. Adicionou-se 60µL de tampão *AVE*, e centrifugou-se por 8000rpm por 1min para eluição do RNA.

Logo após a extração, as amostras com RNA extraído, bem como o macerado restante destes mosquitos, foram acondicionados em freezer a -70°C , para análises moleculares posteriores.

3.12 RT-PCR EM TEMPO REAL

Para a realização da RT-PCR em Tempo Real foi utilizado o *kit Power SYBR[®] Green RNA-to-CTTM 1-Step* (Applied Biosystems[®], Califórnia, Estados Unidos). Os iniciadores usados para todos os DENV são:

- a) *Primer Forward*: 5'-AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA-3';
- b) *Primer Reverse*: 5'-CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT-3'.

Esses iniciadores foram desenhados a partir de sequências completas dos quatro sorotipos de DENV, de sequências parciais do capsídeo e da região 3' não-codificadora de DENV4, isoladas em diferentes áreas geográficas do mundo, de acordo com Leparc-Goffart e colaboradores (2009).

3.13 CRITÉRIO DE POSITIVIDADE E NEGATIVIDADE

As amostras foram consideradas positivas quando: a) apresentaram Ciclo de *threshold* (C_T) ≤ 35 (Chen *et al.*, 2010); b) foram identificadas no intervalo da curva padrão (entre P1 e P6); e c) pela análise da curva de dissociação (curva de *melting*), segundo as orientações do fabricante *Applied Biosystems[®]* (2008) e de acordo com os estudos de Gonçalves e colaboradores (2014).

3.14 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.

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

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 com 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.

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

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE TRANSMISSÃO VERTICAL NATURAL DO DENV NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

Todos os *pools* processados foram negativos para a presença de DENV.

4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS ITS

I. Análise das populações de *Ae. aegypti* das nove regionais administrativas da cidade de Belo Horizonte: A partir do sequenciamento de ITS das nove populações de mosquitos representativas de todas as regionais, foram geradas 76 sequências de nucleotídeos de tamanho médio de 800 pares de bases (bp). Utilizou-se a Análise de Genética Evolutiva Molecular 6 (MEGA6) para examinar as sequências e construir uma matriz de similaridade (Tamura *et al.*, 2013). As distâncias nucleotídicas (p-distance) foram avaliadas pelo método de Neighbor Joining (NJ) com 1000 repetições de bootstrap. A partir disso, foi possível estabelecer um padrão genético populacional através da construção de árvores filogenéticas (Figuras 11 e 12).

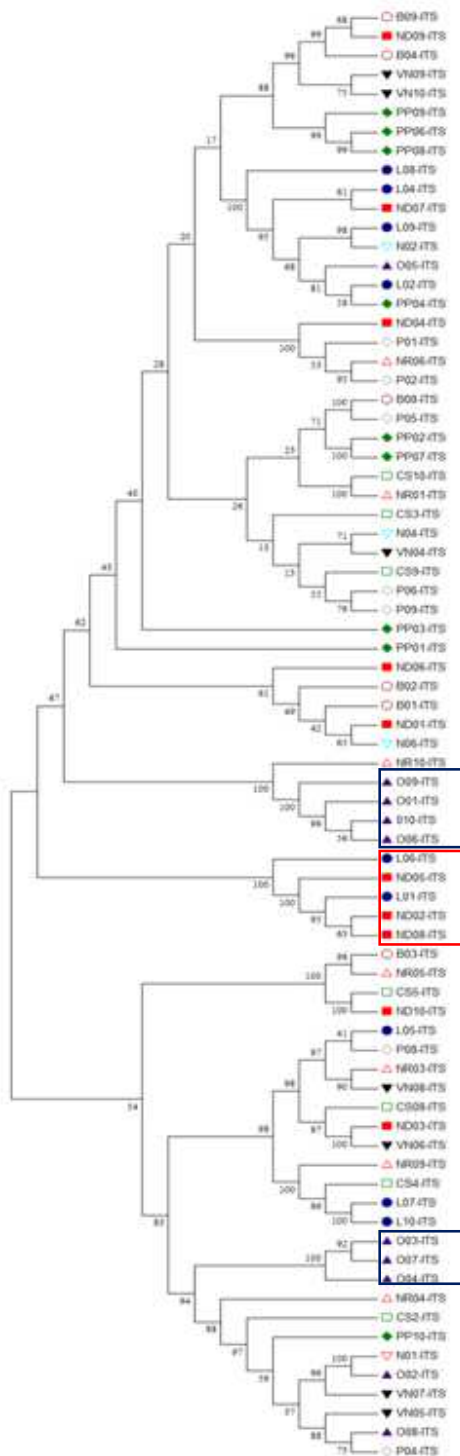


Figura 11: Árvore Filogenética a partir da sequência total de ITS representativa das populações de *Ae. aegypti* oriundas das nove regionais administrativas de BH comparados entre si e com mosquitos colonizados da cepa PP (Grupo controle). O quadrado vermelho evidencia um cluster misto das regionais Leste e Nordeste. Os quadrados azuis evidenciam a separação dos indivíduos da regional Oeste em 2 clusters. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 6.84120845 é mostrada. A análise envolveu 76 sequências de nucleótidos.

Observamos na figura 11, clusters melhor definidos e valores mais altos de bootstrap para três regionais: Oeste (O), Leste (L) e Nordeste (ND), comprovando uma maior confiabilidade dos dados para essas regionais. Observa-se que a maior parte dos indivíduos da regional Oeste apresentam-se agrupados em dois pontos da árvore, mostrando uma homogeneidade dessa população. Observa-se ainda que as regionais Leste e Nordeste apresentaram suas amostras dispersas pela árvore filogenética, e algumas amostras de ambas, apresentam-se juntas em um único cluster indicando uma possível similaridade genética entre elas.

II. Análise dos clusters: A partir das análises filogenéticas, com a visualização de clusters, determinou-se que os grupos de estudo seriam as populações de *Ae. aegypti* das regionais Oeste, Leste e Nordeste.

Para uma análise mais detalhada dos clusters formados pelas amostras selecionadas, construiu-se uma árvore filogenética das populações de *Ae. aegypti* das três regionais, juntamente com as sequências do grupo controle PP (Figura 12).

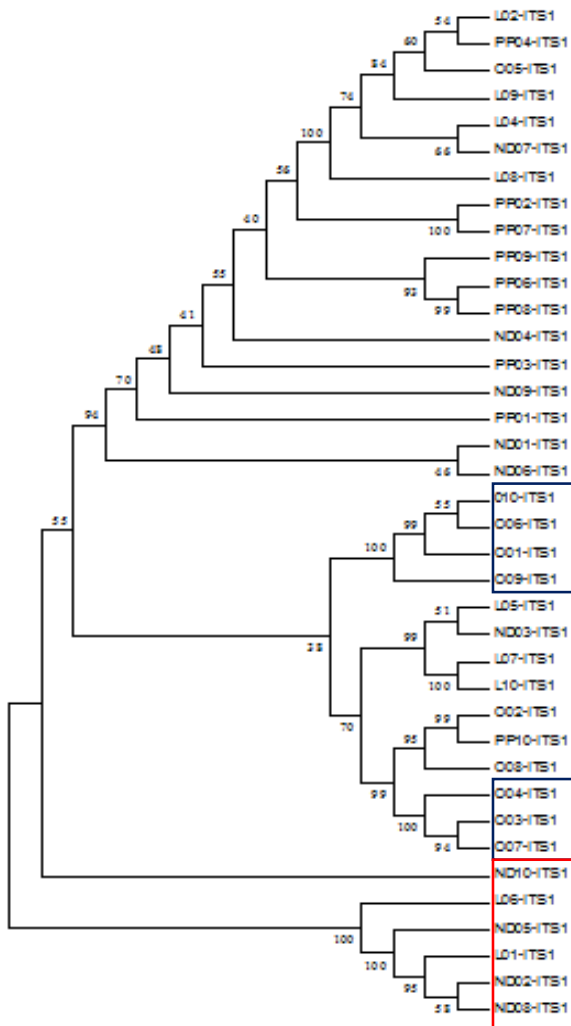


Figura 12: Árvore Filogenética dos 3 grupos de *Ae. aegypti* selecionados e insetos de colônia (PP) a partir da sequência total de ITS. O quadrado vermelho evidencia um cluster misto das regionais Leste e Nordeste. Os quadrados azuis evidenciam a separação dos indivíduos da regional Oeste em 2 clusters. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 3.72460874 é mostrada. A análise envolveu 38 sequências de nucleótidos.

Na figura 12 observa-se claramente o padrão dos clusters: (a) A homogeneidade dos indivíduos da regional Oeste que agrupam-se em 2 grandes clusters no topo da árvore; (b) Indivíduos das regionais Leste e Nordeste (ND) apresentam-se em clusters mistos, embora ND apresente um cluster separado com indivíduos apenas desta regional.

4.3 INFECCÃO EXPERIMENTAL

I. Caracterização das taxas de infecção do intestino (IR), taxa de infecção disseminada (DIR) e competência vetorial (CV)

As análises de IR, DIR e CV foram realizadas a partir das populações de *Ae. aegypti* selecionadas filogeneticamente (Leste, Nordeste e Oeste). Outras duas populações de *Ae. aegypti*: cepa BH (representativa do conjunto de ovos provenientes das 9 regionais) e cepa PP (grupo controle), foram incluídas nesse estudo comparativo. Foram utilizados 200 mosquitos *Ae. aegypti* de cada população alvo por experimento. Uma média de 50% das fêmeas ingurgitavam e foram mantidos durante 14 dias com solução açucarada à 10%. No 14º dia após a infecção, 10 indivíduos foram dissecados e separados de cada um a cabeça e o corpo. A seguir o material obtido foi analisado em PCR em tempo real para a presença do DENV-2.

As análises foram feitas em todas as populações estudadas (Leste, Nordeste, Oeste, BH e PP) provenientes de coletas durante o ano de 2016. Foram reveladas diferenças relacionadas à infecção experimental com DENV-2 dessas populações de *Ae. aegypti*.

De acordo com a tabela 3, as taxas de infecção (IR) infecção do corpo dos mosquitos variaram de 70% a 80%. As taxas de infecção disseminada (DIR), infecção no corpo e cabeça, oscilaram de 50% à 80% Já a competência vetorial (CV), infecção das glândulas salivares, variou de 50% a 80%. (tabela 3).

| | IR | DIR | CV |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Nordeste | 80,00 | 50,00 | 50,00 |
| Leste | 70,00 | 70,00 | 70,00 |
| Oeste | 77,78 | 66,67 | 66,67 |
| PP | 70,00 | 60,00 | 60,00 |
| BH | 80,00 | 80,00 | 80,00 |

Tabela 3: Taxa de infecção (IR), taxa de disseminação (DIR) e competência vetorial (CV) das populações de *Ae. aegypti* estudadas e infectadas com DENV-2. Coleta realizada no ano de 2016.

II. Análise da Positividade/infectabilidade das populações

A positividade das 3 populações de *Ae. aegypti* selecionadas pelo estudo filogenético e o número de cópias virais presentes em cada mosquito foi determinado no 7º e 14º dia após infecção (dpi). O número de cópias virais por mosquitos nas três populações variou de 10^3 a 10^4 no 7º dpi e de 10^4 a 10^5 no 14º dpi. Observamos altas taxas de infecção no 7º e no 14º dpi para todos os grupos de mosquitos estudados variando de 70 à 90%. As regionais Leste (L) e Oeste (O) apresentaram os menores números de cópias virais em 7 dpi, ao compararmos com os dados de 14dpi dessas regionais, observamos diferença estatística com $p=0,0087$ e $p=0,0184$, respectivamente (Gráfico 1).

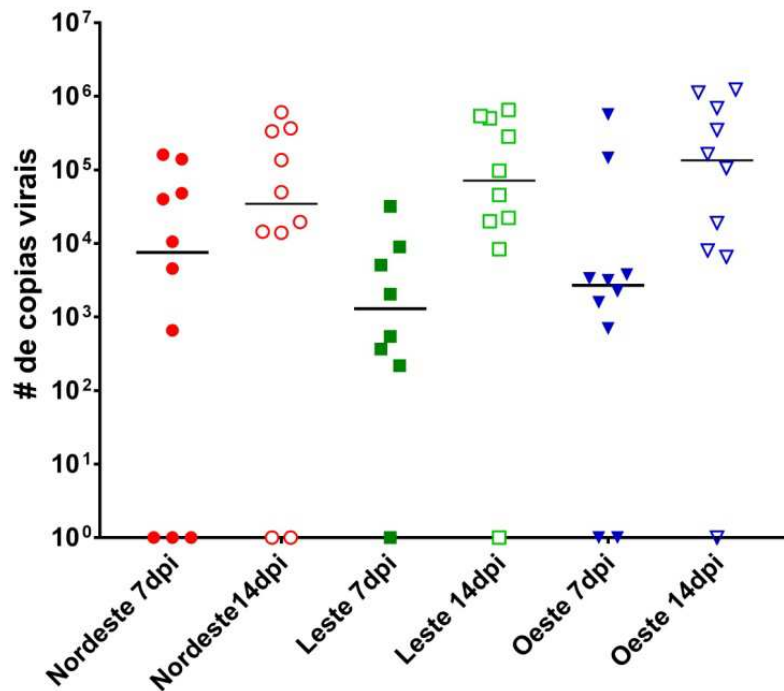


Gráfico 1: Número de cópias virais por indivíduo de cada regional de estudo nos 7 e 14 dias após infecção.

III. Análise das populações controle BH, PP e NDL

Formou-se uma população mista com indivíduos das 9 regionais de Belo Horizonte (BH). Essa população apresentou taxa de infecção, de 90% em 7 dpi, e 80% no 14º dia. (Gráfico 2).

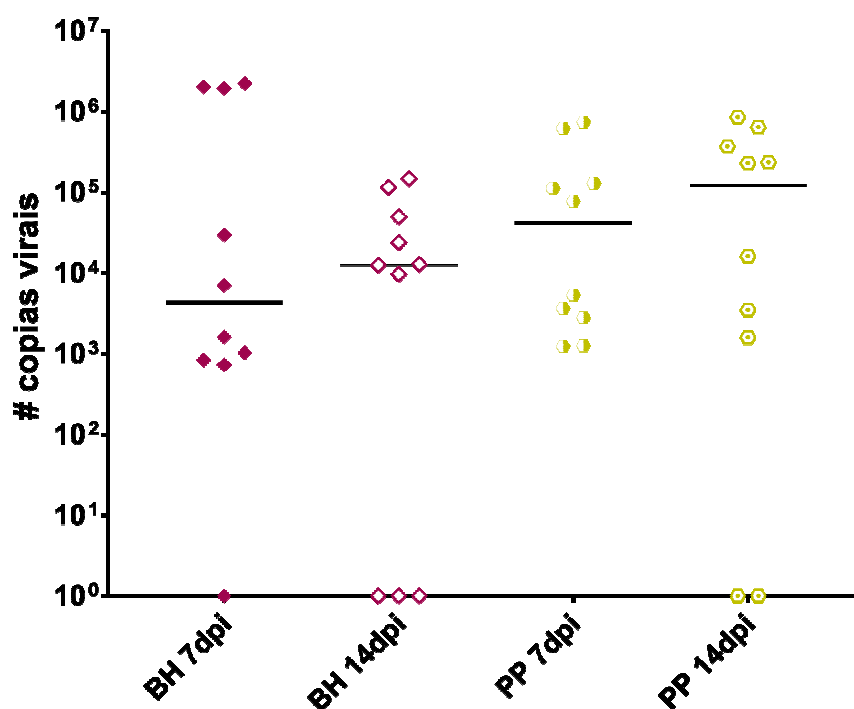


Gráfico 2: Número de cópias virais por indivíduo das populações de *Ae. aegypti* de BH e PP nos 7 e 14 dpi.

Embora o grupo controle PP apresente as médias de número de cópias virais um pouco superiores, as amostras não apresentaram diferenças estatísticas.

A população controle PP apresentou taxa de infecção de 100 e 80% em 7 e 14 dpi, respectivamente. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre essa população e as 3 outras populações estudadas.

Formou-se também, uma população mista entre as regionais Nordeste e Leste (NDL). Além da proximidade geográfica das mesmas, observamos similaridade genética entre elas na construção das árvores filogenéticas. Essa população mostrou queda em sua taxa de infecção, que era de 87,5% no 7º dpi, para 60% no 14º dia. Ainda assim, não houve diferença estatística entre os dados dessa população e as demais do estudo.

4.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS APÓS INFECÇÃO

Para investigar se o ITS poderia ser utilizado como marcador para a competência vetorial, o DNA de mosquitos infectados ou não foi analisado. A árvore filogenética (Figura 13) não

apresentou clusters bem definidos como os observados na figura 11. Apesar do fato de termos 90 sequências, apenas 35 foram analisadas, devido à problemas em sua qualidade. No entanto, foi possível observar dois indivíduos negativos agrupados, ambos provenientes da regional nordeste, o que pode ser um fraco indicativo (devido ao número de amostras) de fenótipo para as amostras negativas (figura 13).

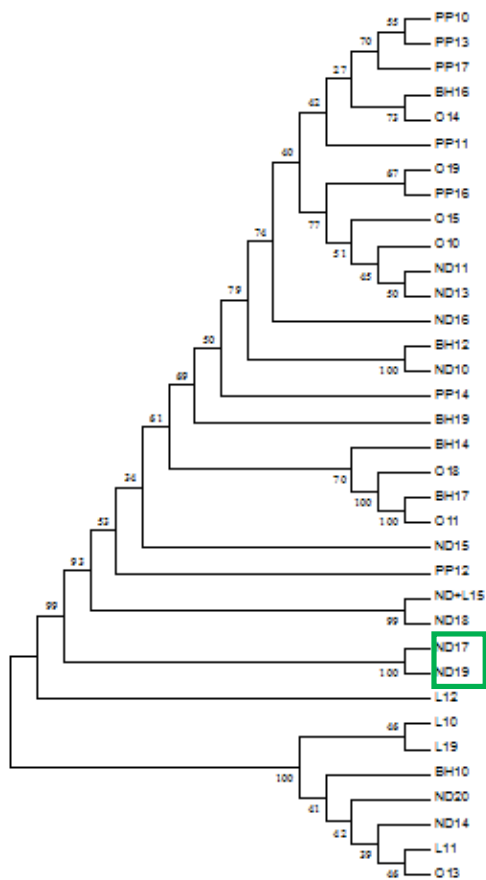


Figura 13: Árvore filogenética dos indivíduos das regionais de estudo, após infecção. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 3.62873443 é mostrada. A análise envolveu 35 sequências de nucleótidos. O quadro verde, indica as duas amostras negativas da regional Nordeste agrupadas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Estudos Filogenéticos

Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* têm grande importância em saúde pública. No Brasil o *Ae. aegypti* é responsável pela transmissão de diversas arboviroses destacando-se a Dengue, e mais recentemente, foi o causador de epidemias de Febre amarela, febre da Zika e febre Chikungunya em vários estados da federação (MS, 2016). Esse culicídeo 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. Na cidade de Belo Horizonte, alvo de nosso estudo, o *Ae. aegypti* foi responsável por 6 epidemias de Dengue nos últimos 20 anos.

A diferenciação genética espacial de populações de *Ae. aegypti* tem sido estudada em todo o mundo com diferentes classes de marcadores moleculares. Estudar e compreender os padrões de estrutura genética de populações locais deste culicídeo pode fornecer informações importantes sobre a dinâmica do *Ae. aegypti* nas cidades, tão importante para compreendermos a evolução desse mosquito e a ocorrência de epidemias.

A busca de novos marcadores moleculares têm se tornado cada vez mais necessária, pois, enquanto a análise de genomas possibilita conhecer novos aspectos da genômica, a variação genética oferece a possibilidade de se estudar a estrutura genética das diversas populações de *Ae. aegypti* em vários níveis de distribuição geográfica. Embora se pense que as múltiplas cópias de DNAr evoluem por evolução concentrada (ZIMMER *et al.*, 1980) e, portanto, apresentam pouca variação intraespecífica ou intragenômica, foram documentadas muitas exceções em vetores de artrópodes. Mecanismos de homogeneização de sequências, tais como *crossing over* desigual, conversão de genes e transposição, são propostos como os mecanismos que mantêm a integridade da sequência entre as matrizes de DNAr. Devido ao fato de não serem codificantes e evoluírem rapidamente, as matrizes de ITS têm sido marcadores de escolha para muitos estudos populacionais. Em mosquitos anofelinos, as matrizes de DNAr têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de ensaios de identificação para distinguir membros de complexos de

espécies (Revisão em FAIRLEY *et al.*, 2005).

Em nosso estudo filogenético com as populações de *Ae. aegypti* de Belo Horizonte, observamos clusters melhores definidos e valores mais altos de *bootstrap* para três regionais: Oeste (O), Leste (L) e Nordeste (ND). Observa-se que a maior parte dos indivíduos da regional Oeste apresenta-se agrupados em dois pontos da árvore, mostrando uma homogeneidade dessa população. Observa-se ainda que as regionais Leste e Nordeste apresentaram suas amostras dispersas, e algumas juntas em um único cluster, indicando uma possível similaridade genética entre elas. A regional Nordeste é caracterizada por situações socioeconômicas e de crescimento urbano bastante diferenciadas. A parte Sul dessa regional, limítrofe à regional Leste, é uma zona de intensa atividade econômica (PBH, 2016). A regional Leste faz divisa com as cidades de Nova Lima e Sabará e as regionais Centro-Sul e Nordeste de BH, possui bairros e aglomerados, com características homogêneas de ocupação de solo (PBH, 2016). Inferimos que a similaridade genética dos indivíduos das regionais Leste e Nordeste ocorram devido à proximidade geográfica de ambas, uma vez que essas regionais são limítrofes.

A regional Oeste se separou em dois *clusters*, devemos por isso ressaltar algumas particularidades da mesma: ela situa-se na bacia do ribeirão Arrudas, sendo a maior parte do seu território cortada por afluentes, 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. Tal fato nos leva a inferir que a possível divisão dessa regional em dois *clusters* ocorra devido à variabilidade de nichos ecológicos nessa regional.

Em relação às demais regionais de Belo Horizonte, não foi possível estabelecer um padrão filogenético nesse estudo. É possível que haja cruzamento entre indivíduos das diversas regionais da cidade, tendo em vista que não existem grandes barreiras geográficas separando as mesmas. Além disso, diversos trabalhos demonstram que as populações *Ae. aegypti* sofrem rápida evolução, e possuem grande polimorfismo, o que pode contribuir para a ausência de um padrão único de cada grupo (LOUISE *et al.* 2015; STEFFLER *et al.* 2016).

Os nossos dados corroboram com estudos utilizando diferentes marcadores moleculares, tais como SNPs e microssatélites, que têm mostrado que *Ae. aegypti* possuem altas taxas de polimorfismo e evoluem rapidamente. Em 2015, Louise e colaboradores, avaliaram a variação genética através de marcadores microssatélites em uma população de *Ae. aegypti* da cidade de São Paulo, durante diferentes estações do ano. Os níveis de polimorfismos encontrados nesse

estudo foram mais altos do que os usualmente expressos por espécies exóticas, e foram observadas variações temporais nos padrões desses. Steffler e colaboradores (2016) utilizaram como marcadores moleculares ISSR e SNPs, na comparação genética de 7 populações de *Ae. aegypti* no Nordeste do país. As análises de *Clustering* em tal estudo apresentaram pequenas variações entre os grupos de estudo. Sendo as amostras agrupadas em apenas 3 grupos para ISSR e apenas 1 grupo quando baseadas nas análises de SNPs. Estes fatos corroboram também com os dados de nosso estudo pois são também heterogêneas.

5.2 Aspectos relacionados à infectividade dos mosquitos das populações de *Ae. aegypti* ao DENV 2

A presença e a alta densidade dos vetores intensifica a necessidade de ações de controle. No entanto, um importante fato precisa ser considerado: as populações de mosquitos variam na sua permissividade para o desenvolvimento do flavivírus (BLACK IV WC *et al.*, 2002; SEVERSON DW *et al.*, 2004 e GORROCHOTEGUI-ESCALANTE N *et al.*, 2005). Este fenômeno é conhecido como competência vetorial, o qual está relacionado à barreiras anatômicas. Estas podem ser determinadas por fatores genotípicos e ou fenotípicos, além de outras particularidades que 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).

A análise das regionais Nordeste, Leste e Oeste revelou, em 7dpi taxas de infecção de 70, 80 e 70%, respectivamente. Em 14 dpi, as taxas foram de 80% para a regional Nordeste e de 90% para as regionais Leste e Oeste. Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram aumento das taxas de infecção para as regionais Nordeste Leste e Oeste nos anos de 2009 e 2011. Em relação aos dados encontrados agora, observamos pequena queda de IR dessas três populações (Tabela 4).

| Regional \ IR/ano (%) | 2009* | 2011* | 2016 |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| NORDESTE | 32,5 | 95 | 80 |
| LESTE | 40 | 70 | 70 |
| OESTE | 77,5 | 95 | 78 |

Tabela 4: Índice de infecção (IR) das populações de *Ae. aegypti* estudadas, infectadas com DENV-2, nos anos de 2009*, 2011* e 2016. *Dados anteriores, publicados por Gonçalves, 2014

Nossos resultados mostraram que a taxa de infecção nos grupos estudados, não apresentaram grandes variações, os valores para esses grupos, mesmo após 5 anos, são praticamente constantes em relação ao estudo de Gonçalves e colaboradores (2014). Mesmo sabendo da teoria de rápida evolução genética desses mosquitos e acreditando que exista uma mudança sazonal do padrão genético, ao levarmos em conta o IR, não observamos grandes variações.

A competência vetorial das três populações em estudo variou de 50 à 70%. Não observamos diferenças estatísticas entre nenhum os grupos. O mesmo estudo publicado em 2014, apresentou diferenças na susceptibilidade do *Ae. aegypti* para transmitir DENV nas nove populações de Belo Horizonte, durante os anos de 2009 e 2011. Nesses anos, houve aumento da CV das regionais Nordeste e Oeste, e queda da regional Leste. Nosso estudo mostra que em 2016, houve aumento da CV na regional Leste. Vale ressaltar que tal regional, apresentou um aumento expressivo do número de casos confirmados da doença nesse ano. Observa-se ainda, pequena queda para as regionais Nordeste e Oeste, indicativa de que o CV dessas regionais tende a ser em torno de 50% para a primeira e 70% para a segunda (Tabela 5). Tais diferenças podem ser associadas à possível dispersão das populações do inseto e/ou um possível acasalamento entre indivíduos das diferentes regiões.

| Regional \ CV/ano(%) | 2009* | 2011* | 2016 |
|------------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| NORDESTE | 32,5 | 57,5 | 50 |
| LESTE | 40 | 27,5 | 70 |
| OESTE | 72,5 | 82,5 | 67 |

Tabela 5: Competência vetorial (CV) das populações de *Ae. aegypti* estudadas, infectadas com DENV-2, nos anos de 2009*, 2011* e 2016. *Dados anteriores, publicados por Gonçalves, 2014.

Vale ressaltar, que a divisão da cidade em regionais administrativas é apenas uma questão política e que praticamente, não existem barreiras geográficas entre elas. Com exceção da regional Barreiro, que é fisicamente delimitada pelo anel rodoviário, nenhuma das demais regionais apresenta um componente geográfico que pudesse limitar a dispersão do *Ae. aegypti* entre elas e, conseqüentemente, resultar num isolamento populacional. Acreditamos que a falta de barreiras geográficas, resulte em cruzamentos entre as populações de todas as regionais, impedindo a determinação de padrões de diferenciação filogenética entre elas. Além de contribuir para a variação das taxas de infecção e competência vetorial ao longo dos anos.

Em 1996 foi registrada a primeira epidemia de Dengue em Belo Horizonte. Desde então, a cidade registra casos anuais da doença, assim como observamos variações nas taxas de CV, observam-se variações na quantidade de pessoas afetadas por ano.

No ano de 2009, 1.547 casos foram confirmados. A Região Noroeste apresentou o maior número de casos (270), seguida pelas Regiões Norte (257) e Nordeste (188). No ano de 2011, foram 12.705 confirmados. Desses, as regionais Norte, Venda Nova e Nordeste, apresentaram os maiores números, com 6055, 1474 e 1370 casos respectivamente. Já em 2016, a cidade teve 157.161 casos de Dengue confirmados. A regional com o maior número de casos confirmados foi Barreiro, com 25.575 ocorrências, seguida pelas regionais Nordeste (21.302) e Leste (21.057) (PBH, 2009; PBH, 2011; PBH, 2016).

Assim como quando analisamos os dados de toda a cidade, dentre as regionais selecionadas em nosso estudo, observamos a variação da quantidade de casos ao longo dos anos analisados por nosso grupo (Tabela 6). Inferimos que as variações nas quantidades de casos

humanos da doença, tenham relação com as variações genéticas e a rápida evolução de *Ae. aegypti*.

| Regional | Casos/ano | | |
|-----------------|------------------|--------------|---------------|
| | 2009* | 2011* | 2016 |
| NORDESTE | 1364 | 188 | 21302 |
| LESTE | 805 | 174 | 21057 |
| OESTE | 881 | 125 | 13990 |
| TOTAL BH | 12589 | 1540 | 157161 |

Tabela 6: Número de casos confirmados de Dengue em Belo Horizonte das populações de *Ae. aegypti* selecionadas nos anos de 2009*, 2011* e 2016. *Anos anteriores, estudados por GONÇALVES, 2014.

É importante ressaltar que em todos os anos analisados, a regional Nordeste esteve entre as 3 regionais com o maior número de casos em Belo Horizonte. No ano de 2016, Nordeste e Leste aparecem como as regionais com maior número de ocorrências, sendo a diferença entre elas de apenas 245 casos. Juntas, essas regionais foram responsáveis por 35% dos casos de Dengue do último ano. Em nossas análises filogenéticas, essas regionais apresentaram grande similaridade genética. Acreditamos que a semelhança no número de casos, esteja também ligada à proximidade genética encontrada nos mosquitos dessas regionais.

Os resultados encontrados nesse estudo e os de Gonçalves e colaboradores (2014) indicaram a importância de um estudo de genética de populações para determinar a relação genética entre estas populações, bem como, uma investigação do polimorfismo genético que poderia estar relacionado com a competência vetorial.

Realizamos a análise do ITS dos indivíduos submetidos à infecção experimental. Não observamos o padrão de clusters encontrado anteriormente. No entanto, foi possível observar dois indivíduos negativos agrupados, ambos provenientes da regional nordeste, o que pode ser um fraco indicativo (devido ao número de amostras) de fenótipo característico para as amostras negativas. Devido ao baixo número de sequências de qualidade para a análise, os resultados ainda são inconclusivos. Tal fato nos traz a oportunidade de novos experimentos com maior número de

amostras, a fim de determinar se a variabilidade da região do ITS pode ser de fato associada às variações na competência vetorial de *Ae. aegypti*.

6 CONCLUSÕES

- A avaliação da taxa de transmissão vertical natural na geração parental das populações de *Ae. aegypti* estudadas não acusou a presença de DENV;
- As análises filogenéticas com base na sequência total de ITS dos *Ae. aegypti*, apresentaram similaridade genética entre as regionais Nordeste e Leste;
- A análise das sequências de ITS não foram suficientes para estabelecer *clusters* entre os mosquitos *Ae. aegypti* de todas as regionais administrativas de BH;
- As taxas de infecção, infecção disseminada e competência vetorial das populações dos *Ae. aegypti* deste estudo, não são estáveis e sofrem alterações ao longo dos anos;
- O número de casos humanos de Dengue nas regionais Nordeste e Leste em 2016 foram semelhantes e corroboram com a similaridade genética dessas populações de *Ae. aegypti*;
- As análises do ITS, após a infecção dos *Ae. aegypti*, apresentaram na regional Nordeste dois indivíduos negativos agrupados, o que pode ser um fraco indicativo de fenótipo para as amostras negativas;
- Estudos complementares devem ser realizados, a fim de comprovar a eficiência do ITS como marcador molecular de amostras negativas.

REFERÊNCIAS

AMARAL, R.J.V., 2008. Expressão do gene Argonata em Populações Naturais de *Aedes aegypti* e sua relação com a resposta à infecção viral mediada por RNA. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, p64.

BEERNTSEN B.T., et al. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev.* Madison. 2000; 64 (1):115–137.

BENNETT, K.E. et al., 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(1), pp.85–92.

BENNETT K.E., et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67 (1): 85-92.

BEZERRA JMT, ARAÚJO RGP, MELO FF, *et al.* *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* dynamics influenced by spatiotemporal characteristics in a Brazilian Dengue-endemic risk city. *Acta Tropica.* 2016;164:431-437. doi:10.1016/j.actatropica.2016.10.010.

BLACK IV, W.C. et al., 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, 33(4), pp.379–388.

BLACK, W.C. 4TH., BENNETT, K.E. et al., 2002. Flavivirus Susceptibility In *Aedes Aegypti*. *Arch. Med. Res.*, 33 (4): 379– 388.

BLACK, W.C. 4TH., SEVERSON, D., 2005. Genetics of Vector Competence. in: Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (Eds.), *The Biology of Disease Vectors*. University Press, Colorado, p 415-448.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, United Kingdom, v. 26, p. 243-262, 1971.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

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.

DHANANJEYAN , K. J., *et al.* Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium. *Trop Biomed.* 2010 Apr; 27(1): 47–53.

FAIRLEY, T.L., KILPATRICK, C.W. & CONN, J.E., 2005. Intragenomic Heterogeneity of Internal Transcribed Spacer rDNA in Neotropical Malaria Vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 42(5), pp.795–800. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/esa/jme/2005/00000042/00000005/art00011>>

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPLAGIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética. Brasília: Embrapa, Cenargem, 1996, 220p.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. Sao Paulo: Atheneu, 2005. p. 345-358.
- FONSECA, D. M. et al. Density-dependent oviposition by female *Aedes albopictus*(Diptera: Culicidae) spreads eggs among containers during the summer but accumulates them in the fall. *Journal of Medical Entomology, USA*, v. 7, 2015.
- FORATTINI, O.P., 2002. *Culicidologia Médica - Identificação, biologia e epidemiologia*.
- GADELHA D. P., TODA AT. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Ver bras malariol D Trop, Brasília*. 1985; (37): p. 29-36, 1985.
- GONÇALVES, C. M., 2010. O Estudo da Competência Vetorial das Populações de *Aedes aegypti* da Cidade de Belo Horizonte , Minas Gerais , ao Dengue vírus 2. , pp.1–84.
- GONÇALVES C. M., *et al.* Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian Dengue-endemic risk city. *Parasit Vectors [Internet]*. 2014;7(1):320. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25015526>
- GUBLER, D. J. et al. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene, USA*, v.27, p. 581-589, 1978.
- GUBLER, D. J. et al. Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. *The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene, USA*, v. 30, p. 1094-1099, 1981.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Journal of Clinical Microbiology, USA*, v. 11, p. 480-196, 1988.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Org.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever* . New York: CAB International, 1997. p. 1-22.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews, Washington*, v. 11, p. 480-496, 1998.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science, Washington*, v. 239, p. 476-481, 1988.
- HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever* . New York: CAB International, 1997. p. 23-44.
- HAMMON, W. M. et al. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. *Science, USA*, v. 131, p. 1102-1103, 1960.

HAWLEY, W. The biology of *Aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association, California, v. 4, p. 1-39, 1988.

HILLIS, D.M., MORITZ, C. & MABLE, B.K., 1996. *Molecular Systematics*, available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/esa/aesa/1997/00000090/00000006/art00019>.

HOWE, G. M. A world geography of human diseases. Academic Press, New York, 1977.

HUGHES, J. H.; PORTER, J. E. Dispersal of mosquitoes through transportation with particular reference to immature stages. Mosquito News, USA, v. 16, p. 106-111, 1956.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). [Online]. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/> [Accessed 26 January 2016].

KNUDSEN, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes aelbopictus*. Parassitologia, Roma, v. 37, p. 91-97, 1995.

LE GOFF G, BRENGUES C, ROBERT V. *Stegomyia* mosquitoes in Mayotte, taxonomic study and description of *Stegomyia pia* n. sp. *Parasite*. 2013;20:31. doi:10.1051/parasite/2013030.

LEPARC-GOFFART I, BARAGATTI M, TEMMAM S, TUISKUNEN A, MOUREAU G, CHARREL R, DE LAMBALLERIE X. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of Dengue viruses. J Clin Virol. 2009 May;45(1):61-6.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Org.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Org.). Fields Virology. Philadelphia: Edition Lippincott-Raven Publishers, 2007.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to Dengue and yellow fever viruses. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.98, n.1, p.43-54, jan. 2002.

LOVIN D.D., *et al.* Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. BMC Genomics. 2009;10:590.

LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. Bull. Entomol. Res., v.88,p.577-600, 1998

LOUISE C., VIDAL P.O. , SUESDEK L. (2015) Microevolution of *Aedes aegypti*. PLoS ONE 10(9): e0137851. doi:10.1371/journal.pone.0137851

MATEUS RP, CERON CR, MACHADO LPB, SENE FM. Caracterização Preliminar Do Espaador Interno Transcrito-1 Its-1 Do Dna Ribossômico Nas Espécies Do Clusterbuzzatii de *Drosophila*(Diptera: Drosophilidae). *Ambiência*, Guarapuava, PR. v.2 n.1 p. 89-96 jan./jun. 2006; ISSN 1808 – 0251.

MARTINEZ, E. Temas de actualidad. Current topics. *Pan American Journal of Public Health*, USA, v. 20, 2006.

MCSHERRY, J. A. Some medical aspects of Darien schema: was it dengue? *Scottish Medical Journal*, Scotland, v. 27, p. 183-184, 1982.

MS – MINISTERIO DA SAUDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Cartilha da Dengue. 2010. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html> Acesso em 05 de ago. 2016.

MS – MINISTERIO DA SAUDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue: diagnostico e manejo clinico – adulto e criança. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

MS – MINISTERIO DA SAUDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue classica 2012 e 2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_classica_2012_at032013.pdf> Acesso em 05 de ago. 2016.

MS – MINISTERIO DA SAUDE. Fundação Oswaldo Cruz. Vacina Fiocruz-GSK devera proteger contra os 4 sorotipos. 2014a. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=219&sid=3>> Acesso em 05 de nov. 2016.

MS – MINISTERIO DA SAUDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. 2015. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/29/2015-035---Dengue-SE-40---29.10.15.pdf>> Acesso em 17 de nov. 2016.

MS – MINISTERIO DA SAUDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico– Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo virus Zika ate a Semana Epidemiológica 16. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/17/2016-016---Dengue-SE16-publica---o.pdf>>. Acesso em 08 jun. 2016.

MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R.J. & ROSSMANN, M.G., 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews. Microbiology*, 3(1), pp.13–22.

NOBUCHI, H. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. *Journal Clinical Microbiology*, Kanpo Rinsho, v. 26, p. 422-425, 1979.

PACE, N.R., OLSEN, G.J. & WOESE, C.R., 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, 45(3), pp.325–326.

PADUAN, K. S. Desenvolvimento de marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) para estudos populacionais do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil/ Karina dos Santos Paduan. – Botucatu : [s.n.], 2008. [Online]. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102714/paduan_ks_dr_botib.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Acesso em 15 Jan 2016]

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. [Online]. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/> [Acesso em 15 Jan 2016].

PESSANHA, J. E. M. et al. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 44, p. 103-105, 2011.

PESSANHA, J. E. M. et al. Diffusion pattern and hotspot detection of dengue in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, USA, p. 1-11, 2012.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. [Online]. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/> [Acesso em 15 Dez 2016].

ROCCO I. M., KAVAKAMA B. B., SANTOS C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2001; 43(1):55-57.

SANGUINETTI CJ, DIAS NE, SIMPSON AJ 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. 1994. *BioTechniques* 17: 914-921. PM:7840973

SINAN – SISTEMA DE INFORMACAO DE AGRAVOS DE NOTIFICACAO – SINAN Dengue online. Nova classificação de casos de dengue OMS. 2014. Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em 15 de dez. 2016.

SCOTT, J. A, BROGDON, W.G. & COLLINS, F.H., 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 49(4), pp.520–529.

TABACHNICK, W.J. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease. The yellow fever mosquito. *Am. Entomologist.*, v.37, n.1, p.14-24, 1991.

TABACHNICK, W.J.; BLACK, W.C. Population genetics in vector biology. In: MARQUARDT, W.C.; BEATY B.J. (Eds). *The Biology of Disease Vectors*. Niwot: University Press of Colorado, 1996. p.417-437.

TABACHNICK, W.J.; POWELL, J.R. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genet. Res.*, v.34, n.3, p.215-229, dec. 1979.

TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(10):4127–38.

TAUTZ D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(16):6463–71.

TARTAROTTI, E. & CERON, C.R., 2005. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochemical Genetics*, 43(7–8), pp.365–373.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue e febre hemorrágica do dengue no Brasil: que tipo de pesquisas a sua tendência, vigilância e experiências de controle indicam ser necessárias? *Cadernos de Saúde Publica*, Rio de Janeiro, v. 21, p. 1307-1315, 2005.

TIAN M. *et al.* (2004) A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* 279: 26370–26377

Vector Base. [Online]. Available from: <https://www.vectorbase.org/organisms/aedes-aegypti> [Accessed 20 January 2016].

WERNER, D. et al. Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Eurosurveillance*, Europe, v. 17, 2012.

WHO. [Online]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/Dengue/> [Acesso em 10 January 2016].