

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Mestrado em Ciências da Saúde

O desenvolvimento de um processo de infecção do *Aedes aegypti* pelo vírus dengue: caracterização da interação do vírus com uma população de mosquitos autóctones.

Eliane Silveira Campanelli

Belo Horizonte
Março de 2007

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

**O DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE INFECÇÃO DO *Aedes aegypti*
PELO VÍRUS DENGUE: CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DO VÍRUS COM
UMA POPULAÇÃO DE MOSQUITOS AUTÓCTONES.**

por

Eliane Silveira Campanelli

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

**Orientação: Dr. Paulo Filemon Paolucci
Pimenta**

Co-orientação: Dra. Alzira Batista Cecílio

**Belo Horizonte
Março, 2007**

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

**O desenvolvimento de um processo de infecção do *Aedes aegypti* pelo vírus dengue:
caracterização da interação do vírus com uma população de mosquitos autóctones.**

por

Eliane Silveira Campanelli

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em: 30 de março de 2007

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação contou com a colaboração de familiares, colegas de trabalho, amigos e instituições, aos quais agradeço sinceramente.

A Deus, pela força em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Paulo, pela oportunidade oferecida, pela confiança em mim depositada, por acreditar no meu trabalho e pelos ensinamentos proporcionados.

A minha também orientadora, Alzira, pela boa convivência durante todos estes anos, pelos ensinamentos, pelos bons momentos e conversas.

A todos do LEM – Alessandra, Ana Cláudia, Bruno, Carina, Carol, Carol Cunha, Cris, Erikinha, Fernanda, Gu, Igor, Junara, Lú Maria, Lú Pinto, Rafa, Rafael Gonçalves, Rodrigo, Tati e Vanessa – por participarem de forma direta ou indireta nesta jornada da minha vida, pelo apoio em vários momentos, pela ajuda com os experimentos, pelo bom convívio no lab. e pelos momentos de descontração.

Aos que já saíram do LEM, mas que participaram dessa jornada: Ana Bahia, Cynthia, Fabíola, Sassá, Márcio, Thiago e em especial a Raquel.

Nágila, pelos ensinamentos proporcionados e por acreditar no meu trabalho.

Kátia, querida amiga, por ajudar demais no desenvolvimento desta dissertação, por me escutar quando eu precisava desabafar, pelos conselhos, pelas chamadas no cantão, pela ajuda sempre.

As meninas do Funedão: Ce, Di, Vi e Tevinha, pelo carinho, pela ajuda sempre, pelos ótimos cafés da manhã, pelas boas conversas, pela saídas!!

Ao Cláudio, que nos ajuda sempre fazendo e corando nossos géis, e também a Márcia, que nos arrumava células nas épocas difíceis.

Leandra, que mesmo sumindo do mapa, grande amiga e que sempre que podia nos ajudava muito arrumando células.

Fábio, Luiz e Sérgio e a Helena, pela amizade, ajuda com os experimentos e pelas fotos.

Aos amigos de pós-graduação, pelos bons momentos vividos nesta etapa de nossas vidas. Especialmente agradeço a Ju e a Nanci pela amizade!!

A Coordenação, aos professores e as secretárias do Programa de Pós-graduação do Centro de Pesquisas René Rachou.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq - que me concedeu uma bolsa durante a realização deste mestrado.

Ao Laboratório de Entomologia Médica e ao Centro de Pesquisas René Rachou.

Ao Laboratório de Virologia Molecular e à Fundação Ezequiel Dias.

Aos membros da banca, Dr. Fábio Brayner, Dr. Flávio Guimarães e Dr. Luciano Moreira por participarem da avaliação deste trabalho.

Aninha, Bui, Flavinha, Genoca, Lá, Ma, Marmota, Miudinha, Nath e Polla, pela amizade já de tantos anos. Obrigada pela torcida, pelos ótimos momentos compartilhados, por ouvirem meus desabafos nos momentos de tensão, pela alegria, pelas brocas e claro, por serem essas GANSAS que eu tanto adoro!!!

Aos amigos de longas datas, Lé, Manu, Alysson e Zanatta!!! Por sempre me apoiarem e torcerem por mim apesar da distância. É muito bom saber que tenho grandes amigos como vocês!!!!

Não posso deixar de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida. À minha família, pais, irmão e cunhadinha pelo apoio incondicional que sempre me deram. Sei que estão orgulhosos de mim por ter concluído mais esta fase da minha vida. Em especial quero agradecer meus pais, Áurea e Reginaldo, pelo amor, paciência, ensinamentos de vida... Amo vocês demais!!!

LISTA DE FIGURAS

Fig.1: Mapas representando a distribuição do <i>Aedes egypti</i> no Continente Americano em diferentes anos: 1930, 1970 e 2001.....	2
Fig. 2: Desenho esquemático mostrando os estágios de desenvolvimento do <i>Aedes egypti</i>	7
Fig. 3: Fotos do mosquito <i>Aedes egypti</i>	9
Fig. 4: Desenho esquemático mostrando a partícula viral e estrutura do genoma dos <i>F vivivírus</i>	12
Fig. 5: Esquema do ciclo replicativo dos <i>F vivivírus</i>	14
Fig. 6: Etapas necessárias para a infecção por <i>F vivivírus</i> e transmissão pelo vetor.....	15
Fig. 7: Formas de transmissão vertical do vírus dengue.....	16
Fig. 8: Barreiras naturais à infecção pelo vírus dengue.....	18
Fig. 9: Cultura de células C6/36 não infectadas com o DENV-2 (controle).....	36
Fig. 10: Cultura de células C6/36 infectadas com o DENV-2.....	36
Fig. 11: RT-PCR para detecção do vírus dengue em adultos e em grupos de larvas de <i>Aedes egypti</i>	37
Fig. 12: Imunomarcção de intestino médio infectado com o DENV-2 utilizando anticorpo anti-dengue.....	38
Fig. 13: Imunomarcção de intestino médio infectado com o DENV-2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle).....	38
Fig. 14: Imunomarcção de ovariolo infectado com o DENV-2 utilizando anticorpo anti-dengue.....	39
Fig. 15: Imunomarcção de ovariolo infectado com o DENV-2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle).....	39
Fig. 16: Imunomarcção de oócito maduro infectado com o DENV-2 utilizando anticorpo anti-dengue.....	40
Fig. 17: Imunomarcção de oócito maduro infectado com o DENV-2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle).....	40
Fig. 18: Imunomarcção de glândula salivar infectada com o DENV-2 utilizando anticorpo anti-dengue.....	41
Fig. 19: Imunomarcção de glândula salivar infectada com o DENV-2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores na região de junção dos genes C/prM.....	28
Tabela 2: Número de fêmeas parentais positivas e negativas para o DENV-2 após alimentação infectante.....	34
Tabela 3: Número de grupos de larvas provenientes do repasto infectante (primeira oviposição) positivas e negativas para o DENV-2 após alimentação infectante.....	34
Tabela 4: Número de grupos de larvas provenientes da segunda oviposição positivas e negativas para o DENV-2 após alimentação não infectante (sem vírus).....	35
Tabela 5: Cálculo do índice mínimo de infecção para a progênie da primeira oviposição.....	35
Tabela 6: Cálculo do índice mínimo de infecção para a progênie da segunda oviposição.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - adenosina trifosfato

BSA - albumina de soro bovino

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

cm² - centrímetros quadrados

DEPC - dietilpirocarbonato

dNTPs - desoxinucleotídeos trifosfatos

DTT - ditioneitol

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

g - gramas

KCl - cloreto de potássio

L1 - 1º estágio larvário

L2 - 2º estágio larvário

L3 - 3º estágio larvário

L4 - 4º estágio larvário

M - molar

MgCl₂ - cloreto de magnésio

μl - microlitros

mL - mililitros

mM - milimolar

mRNA - ácido ribonucléico mensageiro

nm - nanômetros

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

pb - pares de bases

PBS - tampão fosfato salina

PFU - unidades formadoras de placas

pmol - picomol

RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR - transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase

SFB - soro fetal bovino

UI/mL - unidades internacionais por mililitro

U - unidades

RESUMO

A dengue é causada por um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV 1-4), da Família *F. vivirid e*. A doença é encontrada em mais de 100 países e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue. Após a ingestão de um repasto sanguíneo infectante, os vírus infectam e se replicam no intestino do inseto e depois, quando os vírus estão na hemolinfa, outros órgãos também podem ser infectados, como, por exemplo, os ovários. Este estudo analisou a competência vetorial de uma população colonizada de *A. aegypti* ao DENV-2 além da existência da transmissão vertical do vírus por esta população e a capacidade de transmissão vertical destas fêmeas. Fêmeas de *A. aegypti* foram infectadas com o DENV-2 através de alimentação oral. Para analisar se a infecção artificial funcionou insetos foram dissecados e imunomarcados para o vírus dengue e observados ao microscópio laser confocal. Esta análise mostrou que intestinos, ovários e glândulas salivares apresentaram marcação para o vírus. Para confirmação dos dados de microscopia, fêmeas foram analisadas por RT-PCR e também se observou a positividade da infecção em 75% das amostras testadas. A presença do vírus nos ovários nos levou a testar a capacidade das fêmeas em transmitir o vírus para a sua progênie. Para isso, mosquitos infectados puderam ovipor e as larvas do 3º e 4º estádios foram separadas e analisadas por RT-PCR. Verificou-se que após a primeira oviposição 100% das fêmeas transmitiram o vírus verticalmente e após uma segunda oviposição duas fêmeas das 25 positivas, não transmitiram o vírus à sua progênie. Estes resultados mostram que a metodologia utilizada para infecção artificial foi bem sucedida e demonstrou que as fêmeas da colônia são susceptíveis à infecção. Isto prova que, além de se infectarem, as fêmeas são também capazes de transmitir o vírus para a sua progênie. Estudos estão em progresso para que se entenda melhor o processo de invasão do vírus dengue nos mosquitos do gênero *Aedes*.

ABSTRACT

Dengue is a viral disease transmitted by mosquitoes and caused by four viral serotypes (DENV 1-4). The virus belongs to the *Flaviviridae* family. This mosquito-borne disease is a major public health problem and a threat to more than 2.5 billion people, who live in endemic areas. *Aedes aegypti* is the primary vector of dengue in the Americas. After ingesting an infectious blood meal the virus infects and replicates in the insect midgut, and when the virions are in the hemolymph other organs can be infected, such as the ovaries. The present study analyzed the vector competence of a colony strain of *A. aegypti* to the DENV-2 and detected the presence of vertical transmission in mosquitoes artificially infected with this virus. *A. aegypti* females from a laboratory colony were infected with DENV-2 using a membrane feeding device. To analyze whether the infection really worked, insects were dissected and immunolabeled to be analyzed by laser confocal microscopy (LCM), showing that midguts, ovaries and salivary glands were positive for dengue virus. To confirm the LCM data, females were analyzed by RT-PCR and we observed that 75% of the females tested were positive. The presence of the virus in the ovaries lead us to test the capacity of the females to vertically transmit DENV-2. For this, artificially infected females were allowed to lay their eggs and only the larvae were tested by RT-PCR. It was observed that after the first oviposition, 100% of the females were able to vertically transmit the virus and on the second oviposition, 2 of the 25 positives females, weren't able to transmit the virus to its progeny. These results showed that the methodology used for the artificial infection with dengue virus was successful and demonstrated that our colonized *A. aegypti* mosquitoes are susceptible to DENV-2 infection. This proves that, not only the females of the colony tested have become infected, but that they are also able to transmit the virus to its progeny. Studies are in progress to better understand the invasion by dengue virus of *Aedes* mosquito.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico	1
1.2 Relevância do estudo da doença	2
1.3 A Doença	4
1.3.1 Manifestações clínicas	4
1.3.2 Diagnóstico laboratorial	5
1.3.2.3 Diagnóstico molecular	5
1.3.3 Epidemiologia	5
1.3.4 Controle/Prevenção	6
1.4 Biologia do vetor	7
1.4.1 <i>Aedes aegypti</i>	8
1.5 Vírus	10
1.5.1 Características do Gênero <i>Flavivirus</i>	10
1.5.2 Vírus Dengue	10
1.5.3 Ciclo replicativo	12
1.6 Infecção do vírus dengue no mosquito vetor	14
1.6.1 Transmissão vertical	16
1.6.2 Capacidade vetorial	17
1.6.3 Competência vetorial	17
1.7 Justificativa	20
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Manutenção da colônia de mosquitos	22
3.2 Cepa viral	22
3.3 Cultivo de células C6/36 e Multiplicação viral	22

3.4 Titulação viral e Cultivo de células LLCMK₂	23
3.5 Infecção dos mosquitos	23
3.6 Verificação da transmissão vertical	25
3.7 Dissecção dos mosquitos	26
3.8 Microscopia Laser Confocal	26
3.8.1 Imunomarcção para o vírus dengue	26
3.9 Extração do RNA	27
3.10 RT-PCR	27
3.11 Fracionamento do DNA em PAGE	28
3.12 Delineamento experimental	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Padronização dos experimentos de infecção dos mosquitos	30
4.2 Utilização da RT-PCR na detecção do vírus dengue	31
4.3 Utilização da Microscopia Laser Confocal na detecção do vírus dengue	31
4.3.1 Imunomarcção das células C6/36 infectadas pelo DENV-2	31
4.3.2 Imunomarcção dos órgãos do <i>A. egypti</i> infectados com o DENV- 2	32
4.4 Oviposição das fêmeas infectadas com o DENV-2	33
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. APÊNDICE	66
8.1 Artigo <i>in press</i> na revista ‘Virus Reviews and Research’	66

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico

Os primeiros relatos de uma enfermidade semelhante à Dengue Clássica aconteceram em 1779 e 1780, quando casos ocorreram em Batavia (Jacarta), no Cairo e na Filadélfia. Essa ocorrência simultânea de casos em três continentes indica que o vírus dengue, assim como o mosquito vetor, apresentava uma distribuição mundial nos trópicos há mais de 200 anos. Até a II Guerra Mundial, as epidemias de dengue aconteciam em intervalos de 10 a 30 anos. Durante esse período a dengue era considerada uma doença benigna de curso não fatal, proveniente dos visitantes dos trópicos (Henchal & Putnak 1990, Mairuhu et al. 2004).

Após uma epidemia de dengue em Brisbane (Austrália) em 1905, na qual se estimou que um terço da mão-de-obra ficou incapacitada de trabalhar, Bancroft, um médico clínico geral que trabalhava na área rural de Brisbane, demonstrou que os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* que se alimentaram em pacientes com dengue, foram capazes de transmitir o vírus para pessoas saudáveis (Bancroft 1906 apud Aaskov 2003).

Em 1944, Sabin fez o primeiro isolamento do vírus dengue, tendo identificado dois sorotipos conhecidos como vírus dengue tipo 1 e 2 (DENV-1 e DENV-2) (Sabin 1952 apud Rudnik 1967).

Durante a II Guerra Mundial ocorreu a co-circulação de sorotipos do vírus dengue no Sudeste Asiático com um aumento da atividade epidêmica. A primeira descrição de uma epidemia de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) foi em Manila no ano de 1953 (Gubler 1998a). Nesse período, foram isolados, em pacientes com esta nova síndrome, os vírus dengue tipo 3 e 4 (DENV-3 e DENV-4) (Hammon et al. 1960 apud Rudnik 1967). Juntamente com o crescimento descontrolado das cidades, epidemias de FHD tornaram-se grandes problemas de Saúde Pública em vários países desta região (Rigau-Pérez et al. 1998).

No período de 1950 até meados de 1970 era rara a ocorrência de epidemias de dengue no continente Americano, uma vez que o principal vetor da doença, o *A. aegypti* havia sido erradicado na maioria dos países da América Central e do Sul, devido à campanha realizada pela Organização Pan-Americana de Saúde. No final da década de 70, o programa perdeu

forças e o mosquito voltou a ocupar os lugares dos quais havia sido eliminado. Nas últimas três décadas do século XX, devido ao aumento da população de vetores, têm sido observados a co-circulação de sorotipos, a endemicidade da febre hemorrágica em vários países e o aumento na frequência da atividade da dengue. Deste modo, a região Sul Americana evoluiu de uma área não-endêmica ou hipoendêmica para uma região hiperendêmica (Fig. 1) (revisão em Guzmán & Kouri 2002, 2003).

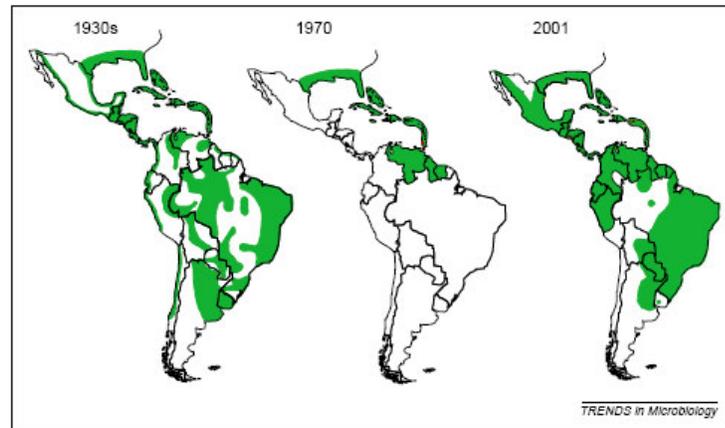


Fig. 1: Mapas representando a distribuição do *Aedes aegypti* no Continente Americano em diferentes anos: 1930, 1970 e 2001 (Gluber 2002).

1.2 - Relevância do estudo da doença

Atualmente, a dengue constitui um sério problema de Saúde Pública nas áreas tropicais e subtropicais de todos os continentes. É uma doença re-emergente encontrada em mais de 100 países onde aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (Guzman & Kouri 2002). Estima-se que ocorram anualmente 50-100 milhões de casos de Dengue Clássica e 500.000 de Dengue Hemorrágica (Monath 1994, Gubler 1998b) sendo considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem. Isto se deve a fatores tais como: a inexistência de um controle adequado do mosquito vetor na maioria dos países endêmicos, o crescimento populacional, a urbanização não planejada e descontrolada gerando mudanças demográficas; o aumento do número de viagens aéreas facilitando o transporte de patógenos como o do vírus dengue entre centros urbanos, as péssimas condições de saneamento básico, e finalmente a escassez de programas de Saúde Pública adequados.

Portanto, nos últimos anos tem se verificado um aumento no número das epidemias, e conseqüentemente da co-circulação dos sorotipos e aparecimento da FHD em novos locais.

No Brasil ocorreu o relato da ocorrência de uma epidemia no Rio de Janeiro em 1846 (Rego 1872 apud Figueiredo 2000). Todavia, no ano de 1958 o país foi considerado livre do mosquito, entretanto, em 1967 foi relatada a sua presença nas cidades de São Luís e Belém, sendo que o inseto foi logo eliminado. A re-infestação do *Aedes aegypti* no país ocorreu no ano de 1976, com um foco do mosquito em Salvador (Franco 1976) e no ano seguinte no Rio de Janeiro (Marques 1985). Em 1981-82 ocorreu uma epidemia de dengue na cidade de Boa Vista (Roraima) causada pelos sorotipos 1 e 4 (Osanai et al. 1983). Todos os sorotipos circulantes atualmente no país foram detectados pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro: DENV-1 em 1986 (Nogueira et al. 1988), DENV-2 em 1990 (Nogueira et al. 1990) e DENV-3 em 2000 (Nogueira et al. 2001). Contudo, é possível que este fato se deva a existência de um sistema de saúde mais vigilante do que em outros estados.

Nos últimos anos, o país vem presenciando a expansão geográfica do vírus dengue e também do vetor, fazendo com que as epidemias ocorram em praticamente todo o território brasileiro. Em Novembro de 2006, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) o Brasil apresentava a seguinte distribuição de sorotipos: 24 estados com co-circulação dos sorotipos 1, 2 e 3; um estado com co-circulação dos sorotipos 1 e 3 e, dois estados (Santa Catarina e Rio Grande do Sul) livres da circulação do vírus (www.Saude.gov.br).

No ano de 2006, o Brasil registrou 345.922 casos de Dengue notificados e 67 mortes (www.Saude.gov.br). Neste mesmo ano, o continente Americano notificou 464.969 casos de Dengue Clássica e de Dengue Hemorrágica além de 180 mortes (<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2006.htm>). As epidemi(0)JTJ 376.86652(s)-5.37099

1.3 - A doença

1.3.1 - Manifestações clínicas

A infecção pelo vírus dengue pode apresentar formas assintomáticas ou dois quadros clínicos diferentes – a Dengue Clássica (DC) e a Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do Choque da Dengue (FHD/SCD) (Guzmán & Kouri 2003).

A Dengue Clássica é caracterizada por sinais e sintomas não específicos, principalmente em áreas endêmicas. Após um período de incubação de 2 a 7 dias, a primeira manifestação da doença se caracteriza por súbita elevação da temperatura (39-40°C), seguida de cefaléia (dor de cabeça), dor retroorbital, mialgia (dor nos músculos) generalizada, prostração, artralgia (dor nas articulações) e eritema facial. O período febril dura de 3 a 7 dias e o paciente pode sentir mal-estar por vários dias. A melhora dos sintomas corresponde com o término do período de viremia (Gubler 1998a, Rigau-Pérez et al. 1998).

A Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do Choque do Dengue (FHD/SCD) é endêmica no Sudeste Asiático acometendo principalmente crianças e nas Américas, todos os grupos etários são afetados, inclusive diferentes classes sociais. A FHD pode ocorrer durante a primeira infecção, porém esta forma está associada, na grande maioria dos casos, a uma re-infecção por sorotipo distinto. A presença de anticorpos circulantes de uma primeira infecção, provenientes ou de uma infecção prévia ou passivamente adquiridos (através da via materna), tem sido descrita como fator de risco para a ocorrência da FHD (Solomon & Mallewa 2001). Os anticorpos preexistentes, obtidos de uma infecção prévia por outro sorotipo viral, não neutralizam o segundo vírus infectante de sorotipo diferente e amplificam a infecção, facilitando a penetração em macrófagos do novo tipo infectante. As partículas virais utilizam a porção Fc dos anticorpos ligados ao envelope viral para a ligação com os receptores de membrana Fcγ, presentes na membrana dos macrófagos. Trata-se da teoria da facilitação de infecção mediada por anticorpos (*antibody-dependent enhancement* – ADE) (Figueiredo 1999).

Sugere-se que o aumento da permeabilidade capilar, uma das manifestações características da FHD, ocorreria devido a fatores imunes do hospedeiro, como liberação de citocinas, interferon e a ativação do sistema complemento (Kurane et al. 1994).

Os sintomas iniciais da FHD são semelhantes aos da doença clássica, porém há um agravamento do caso entre o terceiro e quarto dias de evolução, com o aparecimento de manifestações hemorrágicas. Os sangramentos como petéquias (hemorragias cutâneas semelhantes às picadas de pulga), epistaxe (sangramento nasal) e gengivorragia são frequentes, podendo, em certos casos, assumir maior gravidade na forma de hemorragia digestiva, intracraniana e de outros órgãos nobres. A Febre Hemorrágica da Dengue pode ser identificada pela positividade na prova do laço (Monath & Heinz 1996, Rigau-Pérez et al 1998).

1.3.2 - Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue é necessário: (a) o isolamento viral (método mais específico para determinação do arbovírus responsável pela infecção), (b) a detecção de anticorpos específicos no soro do paciente (o ELISA de captura de IgM - MAC-ELISA - é o teste usado para o diagnóstico no Brasil, sendo um exame útil para vigilância, porque requer somente uma amostra de soro na maioria dos casos, além de ser simples e rápido) e (c) a detecção do RNA no soro ou tecido (Gubler 1998a, Brasil 2005).

1.3.2.3 - Diagnóstico molecular

A transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) pode ser usada para o diagnóstico rápido e sorotipo específico do vírus dengue. É um método rápido que permite a detecção do vírus no soro do paciente durante o período de viremia. São usados oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para os sorotipos do vírus dengue (Lanciotti et al. 1992). Além da utilização do soro de pacientes, a técnica permite a utilização de diferentes tipos de amostras, tais como: tecidos de casos fatais, cultura de células infectadas e grupos de mosquitos ou de larvas. A técnica ainda permite a caracterização genética das linhagens virais (revisão em Guzmán & Kouri 2002).

1.3.3 - Epidemiologia

O vírus dengue é transmitido em um ciclo que envolve humanos e mosquitos, sendo o *A. egypti* o principal vetor. Estes mosquitos têm nos humanos a sua principal fonte

de sangue e nos utensílios (qualquer recipiente capaz de acumular água) usados pelo homem, locais primários para sua oviposição e desenvolvimento larval.

Em algumas partes da Ásia, e potencialmente na América do Sul e no Oeste da África, o mosquito *Aedes albopictus* é considerado um importante vetor porque se utiliza tanto de criadouros naturais quanto de criadouros artificiais. Introduzida há alguns anos nas Américas e em 1986 no Brasil (Forattini 1986), esta espécie apresenta ampla dispersão na Região Sudeste do Brasil, já tendo alcançado 17 estados brasileiros (Fernandez & Forattini 2003), mas até o momento não foi associada à transmissão do vírus dengue nas Américas.

Nas áreas tropicais do Novo Mundo, o *A. aegypti* é ativo durante todo o ano e casos de dengue podem ocorrer ao longo do ano, com aumento bastante significativo no número de notificações durante a estação chuvosa.

A transmissão se faz pela picada de fêmeas infectadas. Após alimentar-se de sangue infectado e se tornar um vetor potencial, a fêmea está apta a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. Nos humanos, a doença clínica começa em 2 a 15 dias após a picada do mosquito infectado (Brasil 2005). Humanos e mosquitos são os principais hospedeiros do vírus dengue, sendo que o vetor permanece infectado por toda a sua vida. Tanto o *A. albopictus* quanto o *A. aegypti* possuem também a capacidade de transmitir verticalmente o vírus dengue à sua progênie (Rosen et al. 1983).

1.3.4 - Controle/Prevenção

Devido à ausência de drogas antivirais efetivas e de vacinas, os esforços no controle e prevenção da dengue baseiam-se exclusivamente na redução e/ou eliminação do mosquito vetor. O controle químico, utilizando inseticidas da família dos organofosforados, é o mais empregado hoje em dia e pode ser feito focando-se na eliminação das larvas, uma vez que se sabe da ocorrência da transmissão vertical do vírus dengue. No caso de ocorrências de surtos ou epidemias, deve-se utilizar atividades de emergência como a aplicação de inseticida a ultra baixo volume (UBV), usada para interromper a transmissão através da eliminação de fêmeas adultas (Rigau-Pérez et al. 1998, Solomon & Mallewa 2001, Brasil 2005).

A participação da comunidade é de extrema importância para que o controle vetorial alcance sucesso, evitando o acúmulo de materiais que possam vir a ser utilizados como

criadouros artificiais. Assim como a melhoria do saneamento básico e um manejo ambiental que impeça ou minimize a propagação do vetor (Gubler 1998b, Brasil 2005).

É importante ressaltar que se deve saber e estudar mais o mosquito *Aedes albopictus*, uma vez que é conhecido como transmissor da dengue na Ásia e apresenta hábitos diferentes do *Aedes aegypti* (Neto et al. 2002).

1.4 - Biologia do vetor

Como dito anteriormente, no Brasil, o vírus dengue é transmitido pela picada da fêmea infectada do mosquito *A. aegypti*, que também é vetor da febre amarela urbana (Monath & Heinz 1996). O *A. aegypti* pertence à Ordem Diptera, Família Culicidae. Os Dípteros se desenvolvem através de metamorfose completa (holometabolia), e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (4 estádios larvários), pupa e adulto (Fig. 2) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

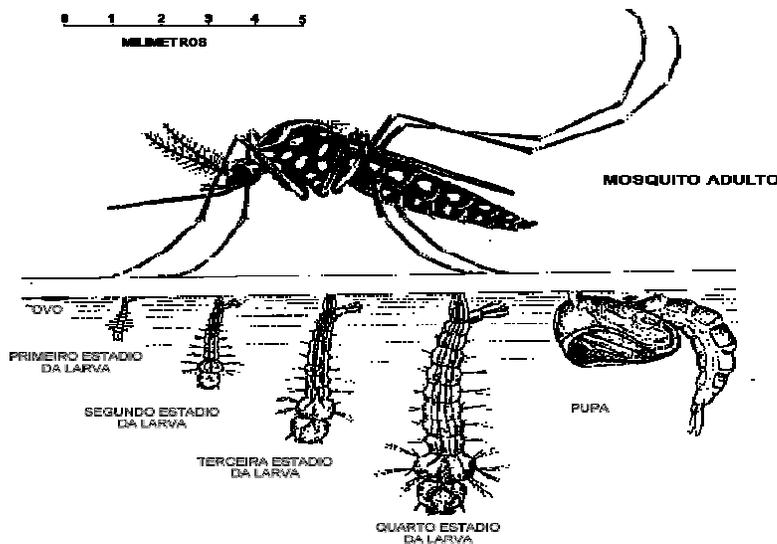


Fig. 2: Desenho esquemático mostrando os estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*. (www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/CA/DENGUE/AEDES2.gif).

Os ovos dos *Aedes aegypti* podem resistir a longos períodos de dessecação. Assim que os ovos entram em contato com a água, ocorre a eclosão das larvas. Após um período que varia de cinco a sete dias, a larva passa por quatro estádios (L1, L2, L3 e L4) e sua duração

depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade larvária no criadouro. A fase larvária é o período de alimentação e crescimento. Após o quarto estágio a larva passa à fase pupal, durante a qual não se alimenta e sofre a metamorfose para a fase adulta (Neves & Silva 1989, Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

O tempo médio de vida do mosquito adulto é de 30 dias e a cada oviposição, a fêmea coloca de 50 a 200 ovos (Gadelha & Toda 1985). Ela é capaz de realizar inúmeras posturas no decorrer de sua vida, já que copula apenas uma vez com o macho, armazenando os espermatozoides em sua espermateca. Este órgão é utilizado para o armazenamento de esperma a partir da inseminação até antes que os ovos estejam fertilizados (Chapman 1998). Assim que o ciclo gonodotrófico (amadurecimento dos ovos) é completo, a fêmea está apta para a postura. Os ovos são geralmente depositados em paredes internas e úmidas dos locais onde, após um rápido desenvolvimento embrionário, são capazes de se manter viáveis por longos períodos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

No caso do mosquito infectado, o vírus dengue pode ser transmitido pela fêmea infectada à sua progênie através dos ovos, caracterizando a transmissão vertical (transovariana), onde um percentual variável de seus descendentes já nasce infectado (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

1.4.1 - *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

O *A. aegypti* é originário do continente Africano, e de lá se espalhou para a Ásia e Américas, principalmente pela existência do comércio marítimo (Rêbello et al. 1999). Foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Atualmente, o *A. aegypti* apresenta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais e se caracteriza por ser um mosquito de comportamento estritamente urbano. É um mosquito escuro com faixas brancas na base dos segmentos tarsais e um desenho de lira no tórax (Fig. 3A) (Neves & Silva 1989).

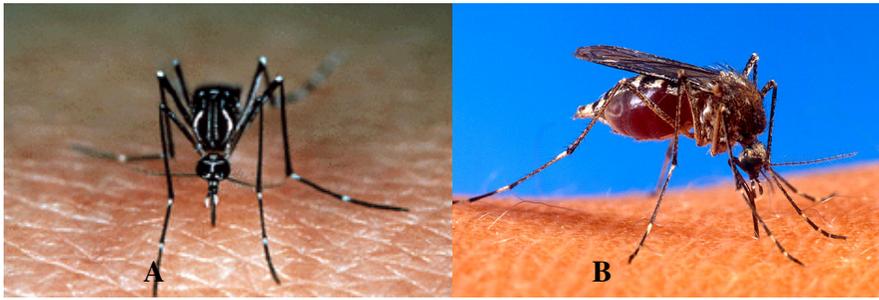


Fig. 3: Fotos do mosquito *Aedes aegypti*. A) visão frontal (www.cnes.fr), B) visão lateral de uma fêmea se alimentando (http://pt.wikipedia.org/wiki/Aedes_aegypti).

Os mosquitos adultos não apresentam grande capacidade de dispersão, sendo que os machos tendem a permanecer próximos aos criadouros, onde ocorre o acasalamento. Macho e fêmea alimentam-se da seiva das plantas, presentes, sobretudo, no interior das casas (Brasil 2001). A fêmea pratica a hematofagia (Fig. 3B), pois os nutrientes presentes no sangue são necessários para o desenvolvimento dos oócitos (Marzochi 1994). Esse repasto sanguíneo ocorre quase sempre durante o dia, principalmente nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer (Neves & Silva 1989).

O *A. aegypti*, encontrou condições favoráveis para uma rápida expansão, principalmente pelos hábitos da civilização moderna como uma urbanização acelerada que gera cidades com abastecimento de água e limpeza urbana deficientes; há utilização indiscriminada de recipientes descartáveis de plástico e de vidro, somados a atividade humana, alguns fatores extrínsecos como chuva, temperatura, altitude, topografia e umidade condicionam a sobrevivência desses vetores (Gadelha & Toda 1985, Brasil 2001). Assim, o *A. aegypti* se espalhou por vários locais do mundo sendo que nas Américas está ausente somente no Canadá e Chile, por razões climáticas e de altitude (Gubler & Clark 1996, Rêbelo et al. 1999).

É considerado um vetor eficiente por diferentes razões: é altamente susceptível ao vírus dengue; se alimenta preferencialmente em humanos; procria próximo a habitações humanas; tem hábitos diurnos; é um mosquito muito bem adaptado ao convívio com os humanos, uma vez que um pequeno movimento do hospedeiro faz com que ele interrompa sua alimentação, além de ser capaz de se alimentar por curtos períodos em diferentes hospedeiros (Gibbons & Vaughn 2002).

1.5 - Vírus

1.5.1 - Características do Gênero *Flavivirus*

Os vírus do gênero *Flavivirus* apresentam mosquitos ou carrapatos como vetores, sendo classificados ecologicamente como arboviroses - agentes virais que se replicam e são transmitidos por membros do Filo Arthropoda (Monath 1988 apud Nasci & Miller 1996). Além da classificação de acordo com o vetor, podem ser divididos por área geográfica ou manifestações clínicas (Simpson 1996).

São conhecidos mais de setenta membros deste gênero e aproximadamente metade deles pode afetar o homem, sendo que destes, alguns possuem grande importância médica, como os vírus da Dengue e da Febre Amarela (Solomon & Mallewa 2001).

Os *Flavivirus* compartilham características como: morfologia, estrutura genômica e determinantes antigênicos. Outra característica comum do gênero é a presença de envelope lipídico, muito explorado em testes sorológicos rápidos, porém podem existir reações cruzadas que dificulta o diagnóstico de algumas flaviviroses. As reações cruzadas podem ocorrer entre os vírus dengue e da febre amarela, da encefalite japonesa e do Oeste do Nilo (Henchal & Putnak 1990). Um outro exemplo típico é o diagnóstico dos quatro sorotipos do vírus dengue (Monath 1997).

1.5.2 - Vírus dengue

O vírus dengue é classificado em quatro sorotipos antigenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, estando classificados como um complexo dentro da Família *Flaviviridae*. Os sorotipos do vírus dengue podem ainda apresentar variações genotípicas. O DENV-2, por exemplo, é filogeneticamente agrupado em 4 genótipos, sendo que dois são os mais usuais: o genótipo Americano, endêmico no Hemisfério Ocidental e também em ilhas do Pacífico Sul por cerca de cinco décadas (Rico-Hesse 1990), entretanto, atualmente esse genótipo só é encontrado no Norte do México e Peru. Em contraste, o genótipo Sudeste Asiático foi detectado a princípio nas Américas, durante uma epidemia de FHD em Cuba e vem substituindo o genótipo Americano (Rico-Hesse et al. 1997).

A partícula viral madura é esférica com um diâmetro de 50 nm e contém uma única fita RNA, com polaridade positiva (mRNA) contendo aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Jones et al. 2003).

O genoma apresenta uma pequena região 5' capeada e não codificadora, uma região aberta de leitura contendo mais de 10.000 nucleotídeos, e a região não codificadora terminal 3', que é desprovida de cadeia poli-A. A janela aberta de leitura codifica três proteínas estruturais na terminação 5', que são as proteínas C (do capsídeo), M (de membrana) e E (do envelope) respectivamente (Fig. 4). A forma imatura do vírus contém a proteína "prM", uma precursora da proteína M (Henchal & Putnak 1990, Monath & Heinz 1996).

A proteína C é a primeira a ser traduzida e se associa com o RNA para formar o nucleocapsídeo. A proteína "prM" é clivada após a saída do vírus da célula, deixando uma pequena proteína estrutural M ancorada no envelope do vírus e abandonando a maior parte, o segmento ("pr") no meio extracelular (Monath & Heinz 1996). A formação da proteína M parece ser crucial, finalizando o evento da morfogênese do vírion (Henchal & Putnak 1990).

A glicoproteína do envelope é responsável por um grande espectro de atividades biológicas incluindo: ligação aos receptores celulares do hospedeiro, fusão à membrana e entrada nestas células, além do mais, ela estimula o sistema imune do hospedeiro através da indução de proteção (Saejung et al. 2006).

O genoma do vírus dengue apresenta ainda sete proteínas não estruturais (NS). Essas proteínas estão codificadas após a proteína E no genoma viral na seguinte ordem: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Henchal & Putnak 1990).

A glicoproteína NS1 é essencial para a viabilidade do vírus, apresentando papel precoce na replicação do RNA podendo ser encontrada intracelularmente ou extracelularmente (Rice 1996, Alcon-LePoder et al. 2005). A região de NS2 codifica para duas proteínas: NS2a uma proteína hidrofóbica necessária para o processamento proteolítico apropriado da região C-terminal da NS1 e, NS2b também uma proteína hidrofóbica atuando como cofator essencial para a atividade de protease viral da proteína NS3 (Bera et al. 2007). A proteína não estrutural 3 é altamente conservada entre os *F. viviparus* (Monath & Tsai 1997) sendo dotada com funções de: protease, helicase, nucleosídeo 5'-trifosfato (NTPase) assim

como atividade de RNA trifosfatase, exercendo importante papel no processamento da poliproteína e na replicação do genoma viral (Xu et al. 2005). As proteínas NS4a e NS4b apresentam perfis hidrofóbicos muito conservados entre os diversos vírus dengue e os *F. viviparus* de modo geral. Em relação à função, ambas as NS4 podem ser envolvidas na localização de membrana dos complexos de replicação NS3 e NS5 através da interação da proteína-proteína (Leitmeyer et al. 1999). Por fim, a proteína não estrutural 5 é a maior e também a mais conservada das proteínas do gênero *F. viviparus*. Proteína básica e supõe-se ser polimerase RNA-dependente do RNA (RdRp) dos *F. viviparus* e tem função também de metiltransferase. É uma enzima chave para o processo de replicação viral (Baleotti et al. 2003).

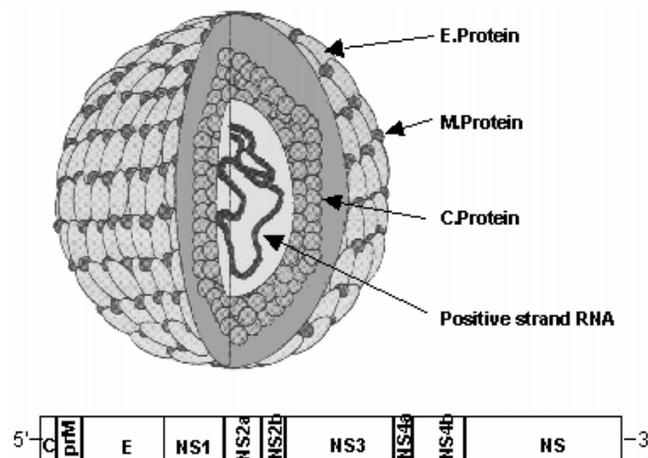


Fig. 4: Desenho esquemático mostrando a partícula viral e estrutura do genoma dos *F. viviparus*. Diagrama mostrando regiões do genoma dos *F. viviparus* codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais. O polipeptídeo é processado em três proteínas estruturais (C, proteína do nucleocapsídeo; M, proteína associada à membrana; e E a proteína do envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (www.dailycal.org/printable.php?id=7167).

1.5.3 - Ciclo replicativo

Os *F. viviparus* podem se replicar em cultivos celulares de mamíferos e artrópodes (Henchal & Putnak 1990). Os eventos iniciais não estão completamente caracterizados.

A primeira etapa da infecção viral é a fixação ou interação da partícula viral com um sítio do receptor específico sobre a superfície celular (Chambers et al. 1990). Qualquer constituinte de membrana celular, incluindo carboidratos, lipídios e proteínas podem ser

receptores virais, dependendo do vírus. Esses componentes celulares atuam em funções celulares normais e são usados, pelos vírus, para adesão e entrada na célula (Muñoz et al. 1998).

Vários prováveis receptores para o vírus dengue sorotipo 2 em diversas linhagens celulares já foram descritos. O DENV-2 parece se ligar a uma proteína de 100-kD na superfície de células K-562 (Rothwell et al. 1996), a uma proteína de 65-kD na superfície das linhagens celulares N1E-115 e SK-N-SH (Ramos-Castaneda et al. 1997) e a duas proteínas de 67 e 80-kD na superfície de células C6/36 (Muñoz et al. 1998), além de mais quatro proteínas de 27, 45, 67, e 87-kD presentes na superfície de macrófagos humanos (Moreno-Altamirano et al. 2002). A proteína do envelope viral recombinante é também relatada por se ligar especificamente ao sulfato de heparan nas superfícies das linhagens celulares Vero, CHO e BHK (Chen et al. 1997, Hung et al. 1999).

Acredita-se que após a adsorção, os vírus penetram nas células por endocitose mediada por receptor. Mudanças no pH do endossoma provocam fusão entre a membrana endossomal e o envelope viral, expelindo o nucleocapsídeo no citosol, como consequência, o RNA genômico viral é liberado. Em seguida, inicia-se a tradução da poliproteína precursora (Leysen et al. 2000).

Assim que o mRNA genômico é traduzido, o processo de replicação se inicia com a síntese de fitas complementares negativas. Estas fitas complementares funcionam como molde para a produção de mais fitas positivas. A síntese de fitas positivas a partir de moldes de fitas negativas acontece através de um processo semiconservativo (Rice, 1996). As fitas positivas e negativas devem ser produzidas aproximadamente em taxas iguais para permitirem que a amplificação do RNA seja exponencial (Henchal & Putnak 1990).

A tradução normalmente tem início no primeiro AUG (metionina) da região aberta de leitura. As proteínas estruturais são codificadas a partir da região próxima da extremidade 5' do genoma, e as proteínas não estruturais são codificadas pelo restante do genoma (Rice 1996).

Análises ultra-estruturais de células infectadas indicam que a replicação viral está intimamente relacionada com membranas intracelulares. Após a replicação, o genoma viral é

encapsulado pelas proteínas do nucleocapsídeo e dirigi-se ao retículo endoplasmático ou para outras estruturas membranosas induzidas pela infecção viral, onde a partícula viral imatura é cercada por um envelope lipídico contendo proteínas virais, inserido no lúmen. Após a passagem pela via secretória, as proteínas do envelope viral tornam-se glicosiladas. Finalmente, os vírus maduros são liberados no espaço extracelular por exocitose (Leyssen et al. 2000).

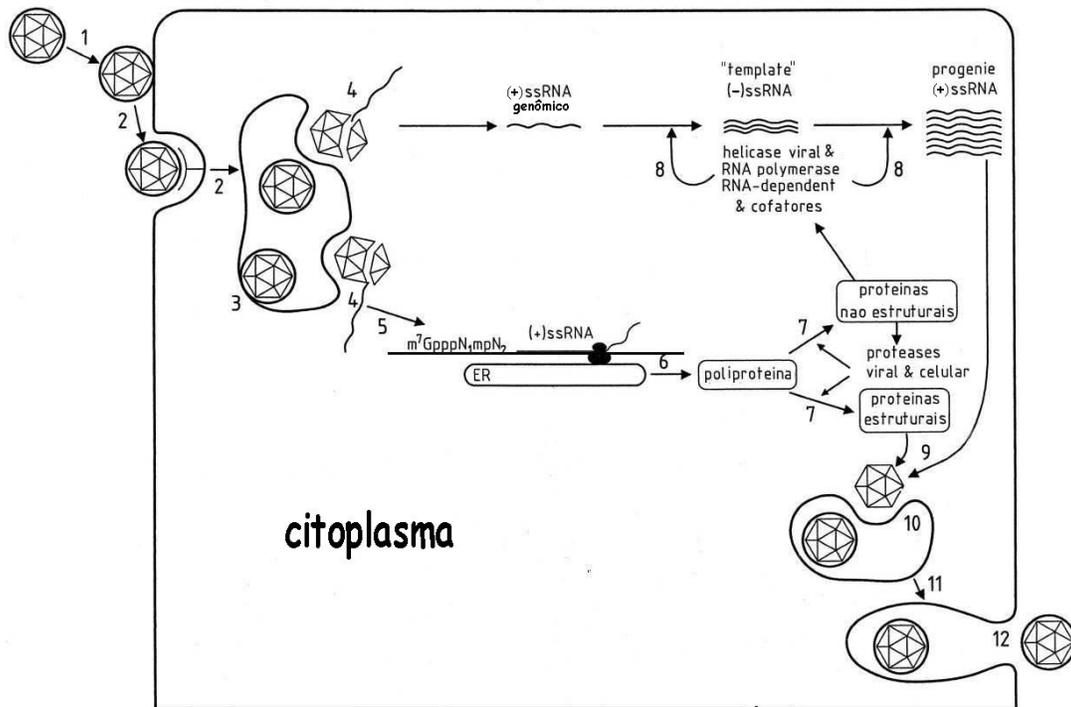


Fig. 5: Esquema do ciclo replicativo dos *F. viviparus*. Etapas do ciclo replicativo: (1) e (2) adsorção da partícula viral à célula hospedeira; (3) e (4) endocitose mediada por receptor, fusão do envelope viral com a membrana do endossoma e liberação do nucleocapsídeo viral; (5) , (6) e (7) tradução e processamento da poliproteína; (8) replicação do RNA associado a membrana; (9) e (10) morfogênese do vírion em vesículas intracelulares; (11) transporte do vírion e fusão da vesícula na membrana plasmática; (12) liberação do vírion no meio extracelular (adaptado de Leyssen et al. 2000).

1.6 - Infecção do vírus dengue no mosquito vetor

O período que vai desde o repasto infectante até a capacidade de transmissão do vírus pelo mosquito é designado como período de incubação extrínseco (PIE). Após ingestão de sangue contaminado com o vírus dengue, as partículas virais precisam se ligar a receptores

específicos do intestino médio do mosquito para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, se replicar nas células epiteliais intestinais para poderem então, deixar o intestino. Uma vez que o vírus consegue deixar o intestino, ele passa para a hemocele podendo infectar órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso. Por fim, é necessário estabelecer a infecção na glândula salivar. Para que este mosquito seja considerado apto a transmitir o vírus, partículas virais precisam ser eliminadas juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (Hardy et al. 1980, Woodring et al. 1996, Black IV et al. 2002).

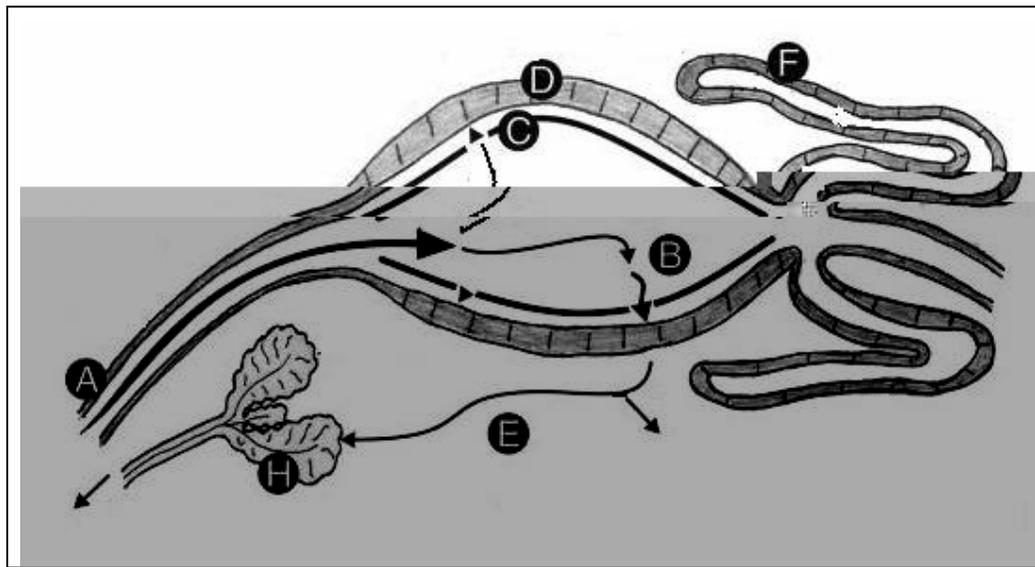


Fig. 6: Etapas necessárias para a infecção por *F. viviparus* e transmissão pelo vetor. As letras indicam os locais de desenvolvimento viral e as setas indicam o caminho percorrido pelo patógeno dentro do inseto. Após a ingestão de sangue infectado (A) os vírus entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se replicam e deixam estas células alcançando a hemolinfa (E) e posteriormente, podem infectar e se replicar em outros órgãos do inseto como, por exemplo, as glândulas salivares (H), onde, durante um novo repasto sanguíneo, podem infectar um hospedeiro susceptível. Neste desenho as letras (C) indicam a matriz peritrófica e (F) os túbulos de Malpighi (modificado de Beerntsen et al. 2000).

As fêmeas de *Aedes aegypti* permanecem infectadas por toda sua vida. Vários artigos demonstraram que patógenos, incluindo pelo menos cinco vírus (Grimstad et al. 1980, Tesh 1980, Turell et al. 1985, Faran et al. 1987, Weaver et al. 1988, 1992), podem afetar vários aspectos da biologia do vetor incluindo a taxa de desenvolvimento (Tesh 1980), a produção de ovos (Turell et al. 1985), a alimentação (Grimstad et al. 1980, Turell et al. 1985), a

morfologia do intestino médio (Weaver et al. 1988, 1992), a atividade das proteinases no intestino médio e a taxa de mortalidade (Faran et al. 1987).

A duração do período de incubação extrínseco (PIE) depende do vetor e do vírus envolvido e em geral, varia de 10 a 14 dias para *F. viviparus* (Woodring et al. 1996). O PIE é influenciado por fatores ambientais como a temperatura e a umidade além de sofrer influência de fatores intrínsecos do vetor com a competência vetorial e o genótipo viral envolvido (Black IV et al. 2002). Após o PIE, o vetor infectado pode transmitir o vírus para novos hospedeiros vertebrados durante tentativas de alimentação ou para sua progênie durante a oviposição (Woodring et al. 1996).

1.6.1 - Transmissão vertical

A transmissão vertical, na qual a fêmea transmite o patógeno à sua progênie, ocorre com alguns arbovírus. Em geral, duas rotas: a transovariana (no momento da oviposição o vírus já se encontra dentro do ovo) ou 'transovum' (quando o vírus está na superfície do ovo) (Woodring et al. 1996).

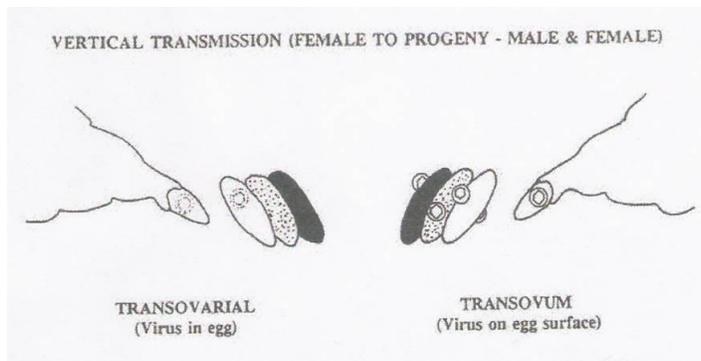


Fig. 7: Formas de transmissão vertical do vírus dengue (Woodring et al. 1996).

Existem evidências da transmissão vertical na natureza e também em laboratório, e que estas exibem diferentes níveis em algumas espécies de *Aedes* (Rosen et al. 1978, Khin & Than 1983, Rosen et al. 1983, Hull et al. 1984, Barreau et al. 1997, Joshi et al. 1996, Thenmozhi et al. 2000, Cecílio 2002, Joshi et al. 2002).

Os vírus podem infectar vários órgãos do mosquito vetor. O tropismo tissular de uma cepa viral parece ser um fator importante na sobrevivência do vírus. Durante a transmissão vertical particularmente, quando as partículas virais se multiplicam em embriões latentes, o órgão envolvido na multiplicação viral pode ser considerado um importante fator na longevidade e sobrevivência daquele hospedeiro (Joshi et al. 2002). Quando os folículos ovarianos em desenvolvimento se tornam infectados, o vírus se replica e persiste no inseto durante a embriogênese, desenvolvimento larval e na metamorfose para o estágio adulto desta geração (Woodring et al. 1996).

A transmissão vertical apresenta importante papel na sobrevivência do vírus. Acredita-se que esteja relacionada com sua manutenção durante o período onde há uma diminuição na população de adultos, ou quando há decréscimo ou ausência de casos de infecção viral em humanos (Rosen et al. 1983). Sabe-se que os ovos do *A. egypti* permanecem viáveis por vários meses fora da água (Horsfall 1972 apud Forattini 2002), embora nem todas as espécies do mesmo gênero apresentem tal característica.

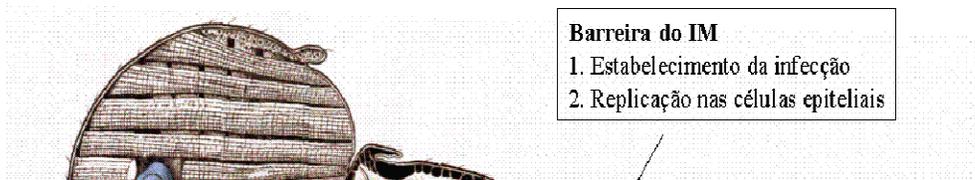
1.6.2 - Capacidade vetorial

A capacidade vetorial é definida quantitativamente e é relacionada por variáveis como a densidade vetorial e a longevidade bem como a competência vetorial. Estimar a capacidade vetorial leva em conta fatores ambientais, comportamentais, celulares e bioquímicos que influenciam a associação entre vetores, os patógenos transmitidos pelos vetores e do hospedeiro vertebrado no qual o patógeno é transmitido (Beerntsen et al. 2000).

1.6.3 - Competência vetorial

Em contraste com a capacidade vetorial, a competência vetorial é a habilidade intrínseca do vetor (espécie, população e indivíduo) de transmitir o agente biológico da doença. A competência vetorial inclui a susceptibilidade à infecção, a “aceitação”, isto é, a reprodução do patógeno ou desenvolvimento, duração do período de incubação extrínseco e eficiência da transmissão do patógeno. Deste modo, a competência vetorial é restrita ao processo de interação vetor-patógeno (Beerntsen et al. 2000).

A competência vetorial para os arbovírus está associada com várias barreiras anatômicas que existem no inseto, as quais devem ser ultrapassadas pelos vírus para se estabelecer a infecção. Essas barreiras podem ser classificadas como: a barreira de infecção do intestino médio, a barreira de escape do intestino médio e a barreira da glândula salivar (Black IV et al. 2002).



presença da “barreira da glândula salivar” torna o mosquito incapaz de transmitir o vírus a um hospedeiro vertebrado (Black IV et al. 2002).

Estudos têm mostrado que o *A. aegypti* exibe uma variação contínua na sua competência para transmitir *F. vivax* (Gubler et al. 1979, Black IV et al. 2002, Severson et al. 2004, Gorrochotegui-Escalante et al. 2005) e esta variação parece ser controlada por, pelo menos, dois genes ou grupos de genes, um controlando a “barreira de infecção do intestino médio” e outro controlando a “barreira de escape do intestino médio” (Bennett et al. 2002).

1.7 - Justificativa

Ultimamente, vários grupos de pesquisa vêm focalizando o estudo dos insetos vetores em todo o mundo, inclusive no Brasil. Esse interesse vem da necessidade de se aprofundar nos conhecimentos da biologia de interação dos patógenos com seus respectivos vetores. Ao compararmos dados da literatura sobre a interação patógeno-hospedeiro vertebrado, vemos que existe uma enorme quantidade de trabalhos que mostram como os patógenos afetam células e órgãos destes hospedeiros, enquanto que os processos de invasão do vetor pelo patógeno são muito pouco estudados, o que gera uma defasagem na literatura sobre este assunto.

Desta forma, existe a necessidade de avanços significativos no conhecimento básico do processo da interação patógeno-vetor. O conhecimento dos mecanismos de invasão e o desenvolvimento da infecção, certamente contribuirão para estudos futuros que visam bloquear as transmissões de diversas doenças ou mesmo para o desenvolvimento de insetos transgênicos.

Em especial, é importante que se estude a competência vetorial de populações de *Aedes aegypti* presentes em nosso país, uma vez que o vetor está muito bem adaptado à convivência com os humanos e está espalhado por todo o território brasileiro, além da presença de três dos quatro sorotipos do vírus dengue no Brasil.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral:

Estudar a competência vetorial da população de *Aedes aegypti* estabelecida na colônia do Laboratório de Entomologia Médica (CPqRR/FIOCRUZ/MG) em relação ao vírus dengue.

2.2 - Objetivos específicos:

- 1) Desenvolver um modelo experimental de infecção artificial do *A. aegypti* com o vírus dengue sendo tanto o vetor quanto o patógeno originários do país.
- 2) Determinar a taxa de infecção pelo vírus dengue na população de *A. aegypti* estudada.
- 3) Determinar a porcentagem de *A. aegypti* que completam o ciclo de vida do vírus sendo potenciais vetores.
- 4) Verificar a ocorrência da transmissão vertical em fêmeas infectadas com o vírus dengue.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Manutenção da colônia de mosquitos

Os mosquitos *A. egypti* (cepa Goytacazes – originalmente coletados na cidade de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro) foram obtidos da colônia estabelecida e mantida no Laboratório de Entomologia Médica (LEM/CPqRR) desde 1999. Esses mosquitos são mantidos em insetário climatizado com uma variação média de temperatura de 26-28°C e umidade relativa do ar em torno de 70-80% em ciclos de 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão. A alimentação destes insetos é feita através de solução de glicose a 10% até o momento dos experimentos.

3.2 - Cepa viral

A cepa utilizada para os experimentos de infecção dos mosquitos foi a DENV-2/SPH. Esta foi isolada do soro de um paciente diagnosticado com Febre Hemorrágica do Dengue na cidade de Ribeirão Preto no ano de 1991. Esta cepa foi obtida do banco de cepas de vírus congelados do laboratório do Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo do Laboratório de Virologia do HCFMRP-USP no ano de 1998 e vem sendo mantida no Laboratório de Virologia e Microbiologia Molecular, na Fundação Ezequiel Dias, em células C6/36 originárias de larvas de mosquito *A. aegypti*.

3.3 - Cultivo de células C6/36 e Multiplicação viral

As células C6/36 foram cultivadas em meio de cultura Leibowitz L-15, contendo 20 µg/mL de gentamicina, 100 UI/mL de penicilina, 5 µg/mL de fungizona, 25 µg/mL de ciprofloxacina e 10% de soro fetal bovino (SFB) em B.O.D. à 28°C. Para os repiques de monocamadas contínuas de células, o meio de cultivo foi desprezado e as células lavadas com PBS (tampão fosfato salina). Assim que as células foram desprendidas da monocamada, elas foram homogeneizadas em meio de cultivo celular e cerca de três milhões de células foram distribuídas em garrafas de 25cm². Quando a monocamada destas garrafas apresentou 80 a 90% de confluência, o vírus dengue sorotipo 2 era inoculado. A infecção foi observada

através da formação de sincícios e do efeito citopático característicos da presença da infecção viral na cultura de células.

Após a verificação da presença do efeito citopático e positividade da multiplicação viral, as células que ainda estavam aderidas na monocamada eram raspadas. Uma alíquota desta mistura de sobrenadante com células era utilizada para a infecção oral dos mosquitos. Outra alíquota da cultura infectada foi separada e utilizada como controle positivo das reações de PCR.

3.4 - Titulação viral e Cultivo de células LLCMK₂

A titulação viral foi feita em células LLCMK₂, derivadas de rim do macaco *Rhesus*, cultivadas em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco – marca Gibco®) contendo 50 µg/mL de gentamicina, 100 UI/mL de penicilina, 5 µg/mL de fungizona e 5% de SFB, mantidas em estufa de CO₂ à 37°C. Para a quantificação das unidades formadoras de placas (PFU), as células LLCMK₂ foram cultivadas em placas de 12 câmaras com meio DMEM e 5% de SFB, sendo implantadas 1,5x10⁶ células/câmara. 450µL de uma série de diluições seriadas contendo o vírus a ser titulado foram inoculadas em células com monocamada recém-fechadas. Como controle foi utilizada uma câmara com células não infectadas. Após incubação, o meio foi desprezado e as células lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado o meio DMEM contendo 1,5% de carboximetilcelulose e as placas foram incubadas a 37°C por sete dias. Observações foram realizadas após coloração com solução de 1% de cristal violeta em PBS 1x para a determinação do título das amostras. O título do DENV-2 utilizado para os nossos experimentos de desenvolvimento e padronização da infecção oral foi de 4 x 10⁴ PFU/mL. Já para os experimentos de transmissão vertical, o título do vírus utilizado foi de 1 x 10⁷ PFU/mL.

3.5 - Infecção dos mosquitos

Grupos de 200 fêmeas de *A. aegypti* com idade de 3 a 5 dias foram colocadas em pequenas gaiolas. A solução de glicose 10% foi retirada 24 horas antes dos experimentos de alimentação oral. As fêmeas se alimentaram através de um aparato consistindo de alimentador de vidro revestido com uma pele de codorna, o qual permanecia aquecido com água circulante

a 37°C durante o período de uma hora (Rutledge et al. 1964, Billingsley & Rudin 1992). O alimento infectante era composto de uma mistura de 2/3 de sangue de camundongo inativado e 1/3 de células C6/36 infectadas com o vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2). A este alimento foi adicionada ATP (adenosina trifosfato – marca Sigma®) para atuar nos mosquitos como fagoestimulante. Ao término do processo de alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram mantidas no infectório em temperatura de 28°C e alimentadas com solução de glicose a 10% até o momento da dissecação ou sacrifício, correspondendo até o final do período de incubação extrínseco do vírus.

Foram testados alguns parâmetros que poderiam influenciar na resposta dos insetos ao processo de alimentação e conseqüente infecção dos mosquitos. Os parâmetros testados foram:

1) Horário da Alimentação: A alimentação foi feita em diferentes horas do dia (às 10hs, às 12hs e às 14hs), pois o *A. egypti* mosquito tem hábito hematófago diurno.

2) Influência da Membrana: Foi testada também a influência de membranas que cobriam os alimentadores no comportamento alimentar dos *A. egypti*. Para isso, testamos peles da região peitoral de animais – galinhas jovens (*Gallus gallus*) ou de codorna (*Numenius*) com idade variando de 3 a 5 dias, além disso, utilizamos “tripa” de porco (*Sus scrofa*) comercial utilizada para a confecção de embutidos, as quais foram exaustivamente lavadas para retirada de detritos e sais.

3) Fagoestimulante: O ATP é um conhecido fagoestimulante e largamente utilizado em alimentações artificiais para mosquitos (Rutledge et al. 1964, Galun et al. 1984, Molina-Cruz et al. 2005, Richardson et al. 2006). A sua utilização foi testada em concentrações que variavam de 1 a 5 mM.

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

Mosquitos inteiros ou dissecados foram analisados para a positividade da infecção pela técnica da RT-PCR (transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase) utilizando-se iniciadores específicos ou pela localização do vírus nos órgãos do mosquito através da Microscopia Laser Confocal.

3.6 - Verificação da transmissão vertical

Para a verificação da transmissão vertical foi realizada a oviposição individual das fêmeas submetidas à alimentação infectante. Um dia após a infecção oral, 30 fêmeas foram separadas aleatoriamente e colocadas em tubos tipo Falcon de 50 mL contendo água deionizada e papel de filtro para que estas pudessem fazer a postura dos ovos. Após a oviposição, as fêmeas foram retiradas assim como o papel filtro contendo os ovos. Para ser conhecido o índice de postura, foi procedida a contagem dos ovos provenientes desta postura. Logo após a contagem, os ovos foram colocados em potes plásticos com a numeração da respectiva fêmea ‘mãe’ contendo água deionizada, para que ocorresse a eclosão das larvas. As fêmeas foram reconduzidas aos seus respectivos tubos e foi oferecida uma nova alimentação sanguínea, desta vez, não infectante (camundongo anestesiado) repetindo-se o procedimento de obtenção e eclosão dos ovos. Todo este processo – alimentação, postura dos ovos e eclosão das larvas – foi realizado por duas vezes, sendo que na primeira oviposição (Oviposição 1), os ovos foram provenientes da alimentação infectante, que correspondeu ao primeiro ciclo gonodotrófico e, na segunda (Oviposição 2), foram provenientes de alimentação de sangue não infectado, correspondente ao segundo ciclo gonodotrófico.

Assim que as larvas originadas de cada uma das oviposições atingiam o terceiro ou quarto estágio larvário, estas eram recolhidas, separadas em grupos de até 50 larvas por cada microtubo do tipo Eppendorf, identificadas e armazenadas em freezer -70°C para posterior detecção do vírus dengue através da RT-PCR.

Após a análise dos grupos de larvas através da RT-PCR, calculou-se o Índice Mínimo de Infecção (Reeves & Hammon 1962 apud Walter et al. 1980).

$$\text{Índice Mínimo de Infecção} = \frac{\text{Total de larvas analisadas}}{\text{Total de grupos positivos analisados}}$$

3.7 - Dissecção dos mosquitos

Nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 após a alimentação infectante, as fêmeas foram dissecadas sob estereomicroscópio Stemi DV4 da marca Zeiss. Para tal, elas foram primeiramente anestesiadas no gelo por 3 minutos, posteriormente procedeu-se a dissecção de intestino, ovário, carcaça e cabeça (incluindo a glândula salivar), em tampão fosfato salina. A seguir este material foi separado e fixado para a observação no Microscópio Laser Confocal.

3.8 - Microscopia Laser Confocal

3.8.1 - Imunomarcação para o vírus dengue

Os insetos dissecados nos tempos estabelecidos acima (3, 6, 9, 12, 15 dias após alimentação infectante) foram fixados em paraformaldeído 4% (Electron microscopy sciences®) por duas horas a 4°C. Após a fixação, foi feita a lavagem do material em PBS filtrado (pH 7.2-7.4) por três vezes de 5 minutos cada.

A seguir, o material foi incubado por duas horas em meio RPMI filtrado (Gibco®), em temperatura ambiente. Logo após, incubou-se as amostras em PBS/BSA (albumina de soro bovino)/Triton 0,2% por 30 minutos (PBS/BSA 1:100). Posteriormente foi feita incubação 'overnight' com o anticorpo primário anti-DENV-2 (mouse policlonal) 1:125 (preparado com diluidor de anticorpos DAKO). Este anticorpo foi gentilmente cedido pelo Dr. William C. Black IV do Laboratório de Arboviroses e de Doenças infecciosas da Universidade Estadual do Colorado de Fort Collins no Estados Unidos.

Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram lavadas em PBS/BSA/Triton 0,2% por três vezes de 5 minutos cada. Posteriormente foi feita a incubação do material com o anticorpo secundário FITC (Sigma®) 1:100 (preparado com diluidor de anticorpos DAKO) durante duas horas.

Em seguida, as amostras foram lavadas novamente em PBS/BSA/Triton 0,2% por três vezes de 5 minutos cada e depois em PBS filtrado (pH 7.2-7.4) por três vezes de 5 minutos

cada. Finalmente as amostras foram montadas em meio 'anti-fading' (Mowiol – Aldrich®) e observadas sob o Microscópio Laser Confocal LSM-510 da marca Zeiss.

3.9 - Extração do RNA

Utilizou-se o método da sílica segundo Boom e colaboradores (1990). Após maceração das amostras (mosquitos individuais ou grupos de larvas) em meio Leibowitz L-15, transferiu-se 60 µl deste sobrenadante para um microtubo do tipo Eppendorf contendo 50 µl de sílica e 200 µl de tampão de lise (contendo isotiocianato de guanidina, TRIS, EDTA e Triton X-100). Após homogeneização e centrifugação, o sedimento foi lavado duas vezes com tampão de lavagem (contendo isotiocianato de guanidina e TRIS), seguido por duas lavagens em solução de etanol 70% e uma lavagem com acetona. Após centrifugação o sedimento foi ressuspensão em 50 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato).

3.10 - RT-PCR

Uma alíquota de 7 µl do RNA extraído foi adicionada a 50 pmol do oligonucleotídeo iniciador anti-senso (D2) e aquecido à 70°C por 10 minutos. Após incubação no gelo, foi adicionado: Tampão 5x (Tris-HCl a 250 mM pH 8,3; KCl a 375 mM e MgCl₂ a 15 mM), mistura de dNTPs a 10 mM e DTT (ditiotreitól) a 0,1 M, seguido por pré-incubação a 42°C por 5 minutos e adição de 200 U da enzima transcriptase reversa (SuperScript II RT-Invitrogen®). A reação foi então incubada por 50 minutos à 42°C, seguida por incubação à 70°C por 15 minutos e resfriada no gelo.

Os oligonucleotídeos iniciadores usados para o vírus dengue foram descritos no trabalho de Lanciotti e colaboradores (1992) e estão descritos na Tabela 1. As reações "PCR Supermix" (Invitrogen®) foram utilizadas para as reações de PCR contendo Tris-HCl a 22 mM (pH 8,4); KCl a 55 mM; MgCl₂ a 1,65 mM; 220 µM de cada dNTPs e 22 U de *Taq* DNA polimerase resultando em um volume final de 22,5 µl.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores na região de junção dos genes C/prM

Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Posição no genoma	Fragmento
D1*	TCAATAGCTGAAACGCGCGAGAACCG	134 – 161	511 pb
D2**	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616 – 644	511 pb
D4**	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232 – 252	119 pb

* Iniciador senso; ** Iniciador anti-senso

Na PCR, são utilizados os iniciadores D1 e D4 para amplificação do fragmento específico para o sorotipo 2 do vírus dengue.

As reações para detecção do vírus dengue foram processadas no termociclador MJ Research PTC 100. Os ciclos de PCR foram modificados em relação aos ciclos originais citados em Lanciotti e colaboradores (1992). As condições foram:

“PCR semi-nested”:

3 minutos à 95°C – 1 ciclo;

1 minuto à 94°C, 1 minuto à 55°C, 1 minuto à 72°C – 5 ciclos;

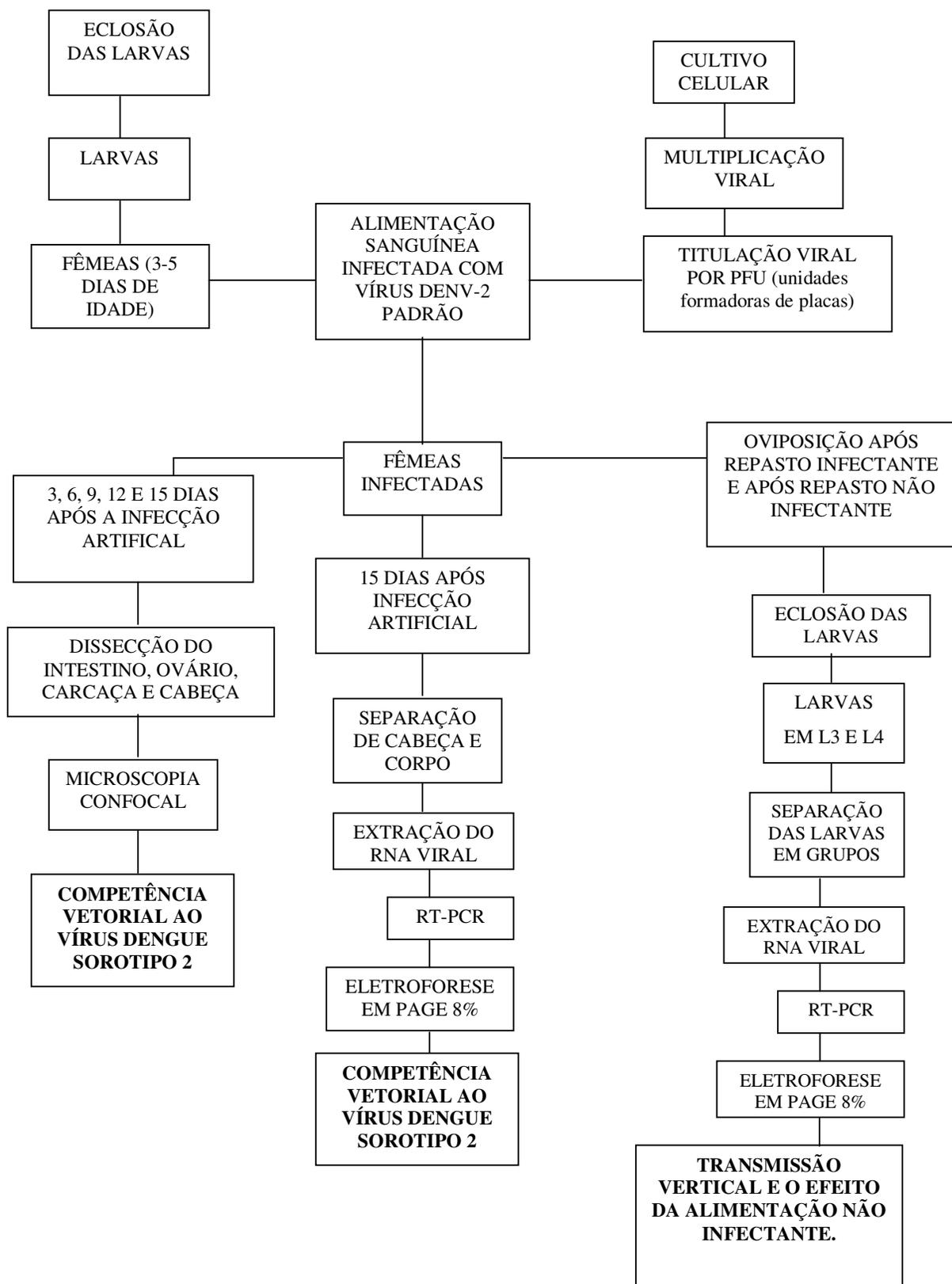
1 minuto à 94°C, 1 minuto à 60°C, 1 minuto à 72°C – 30 ciclos;

10 minutos à 72°C – 1 ciclo.

3.11 - Fracionamento do DNA em PAGE

Para visualização dos resultados obtidos pela PCR, 10 µl do produto da PCR foram aplicados em géis de poliacrilamida 8%. Os géis foram submetidos à eletroforese utilizando-se tampão TBE (contendo Tris-borato, ácido bórico e EDTA) para a corrida. Os géis foram fixados em solução 1 (40% metanol, 10% ácido acético v/v) e solução 2 (10% etanol, 5% ácido acético v/v). Após a incubação com solução oxidante (contendo dicromato de potássio e ácido nítrico) por 5 minutos, os géis foram corados com nitrato de prata (0,1g/50mL de água) por 20 minutos. Em seguida os géis foram lavados com água deionizada por 5 minutos, acrescentando-se a solução reveladora (contendo carbonato de sódio e paraformaldeído) por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução fixadora 1.

3.12 - Delianejamento experimental



4 - RESULTADOS

4.1 - Padronização dos experimentos de infecção dos mosquitos

Para a multiplicação viral e posterior infecção dos *Aedes aegypti* com o vírus dengue foram utilizadas células C6/36 de *Aedes albopictus*.

As figuras 9 e 10 mostram respectivamente, cultura de células C6/36 não infectada (controle) e cultura infectada com o DENV-2. A figura 9 mostra uma cultura de células não infectadas, pode-se observar que as células possuem aspecto normal e estão bem aderidas à monocamada. Na figura 10 podemos verificar os efeitos da infecção viral nas células como, por exemplo, a presença da formação de sincícios e do efeito citopático, uma característica da infecção pelo vírus dengue nestas células.

Após a multiplicação do DENV-2 nas células C6/36, foram realizados experimentos que visavam à padronização da infecção dos *A. aegypti* com o vírus dengue em nosso laboratório. Para isso, foram realizadas alimentações infectantes, testando alguns parâmetros que poderiam influenciar na resposta dos insetos ao processo de alimentação e consequente infecção dos mosquitos. Os parâmetros testados foram: horário da alimentação, tipo de membrana e uso do fagoestimulante.

Horário da Alimentação: Observamos que em qualquer um dos horários testados, as fêmeas se alimentaram plenamente do alimento sanguíneo infectante.

Influência da Membrana: O que se percebeu foi que a membrana de tripa se resseca rapidamente, sendo necessário sempre hidratá-la para não atrapalhar na alimentação dos mosquitos. O processo foi otimizado quando a tripa ficava embebida em PBS 1X por um dia antes da realização dos experimentos. Apesar de não termos quantificados os nossos resultados, não houve influência significativa do tipo de membrana na alimentação das fêmeas.

Fagoestimulante: Percebeu-se que a presença do ATP aumentou a eficácia da alimentação. Entretanto, quando ocorria um excesso na quantidade de ATP adicionada ao alimento infectante, algumas fêmeas ficaram imobilizadas e caíram no fundo da gaiola sem

conseguirem se levantar, a não ser que fossem feitos movimentos nas gaiolas que as ajudassem a se levantar. Concluímos que a quantidade ideal de ATP para este fim é de 1mM.

4.2 - Utilização da RT-PCR na detecção do vírus dengue

Através da RT-PCR foi possível a detecção do RNA viral nas fêmeas analisadas. A presença do vírus dengue sorotipo 2 foi caracterizada por uma banda em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata apresentando peso molecular de 119 pares de base.

O índice de infecção da população de *A. egypti* estudada foi considerado como a porcentagem de fêmeas que tiveram seus corpos e cabeças infectados após o 15º dia da infecção oral. Foi constatado que das 60 fêmeas alimentadas, 45 foram positivas para o vírus dengue sorotipo 2 (Fig. 11A), gerando um índice de infecção igual a 75% mostrando que as fêmeas da colônia utilizadas, são susceptíveis ao vírus.

Devemos ressaltar que das 15 fêmeas consideradas negativas para o vírus dengue encontramos 5 fêmeas que tiveram apenas o corpo positivo e não a cabeça (Fig. 11B).

4.3 - Utilização da Microscopia Laser Confocal na detecção do vírus dengue

4.3.1 - Imunomarcção das células C6/36 infectadas pelo DENV-2: Através da análise pelo microscópio laser confocal foi possível analisar a positividade da infecção através da imunomarcção com anticorpo anti-dengue 2 (mouse policlonal). Esta análise também serviu para a padronização da técnica de imunomarcção com o anticorpo anti-dengue por nós utilizado em outros experimentos, como por exemplo, de tecidos de mosquitos.

O “inset” da figura 10 mostra a imunomarcção específica com o anticorpo anti-dengue 2. A marcação fluorescente se concentra mais nas bordas das células. Este fato foi previamente descrito e acontece porque o vírus dengue realiza todo o seu processo replicativo somente no citoplasma celular, não penetrando no núcleo da célula.

4.3.2- Imunomarcção dos órgãos do *A. aegypti* infectados com o DENV- 2:

Foram observados os seguintes órgãos: intestino, ovários e glândula salivar.

Intestino - Este órgão foi escolhido devido à sua importância durante o processo de estabelecimento da infecção do vírus dengue nas fêmeas uma vez que, neste no intestino, podem ocorrer duas barreiras – a de infecção e a de escape do intestino médio – contra a infecção.

A figura 12 mostra um intestino médio infectado após 3 dias da alimentação infectante. Foi possível observar grupos de células vizinhas localizadas no epitélio intestinal contendo marcação fluorescente mais intensa característica da presença do DENV-2.

A figura 13 mostra um intestino médio dissecado de uma fêmea infectada (controle). Para a confecção deste controle foi realizado o protocolo de imunomarcção, entretanto utilizou-se somente o anticorpo secundário (anti-mouse conjugado com FITC). Nota-se uma autofluorescência não intensa e difusa característica dos tecidos dos mosquitos.

Ovariolo e Oócito maduro - O ovário foi analisado, pois se sabe da capacidade que as fêmeas de *A. egypti* têm de transmitir verticalmente o vírus dengue para sua progênie. A figura 14 mostra um ovariolo dissecado no terceiro dia após alimentação infectante e processado para imunomarcção com o anticorpo anti-dengue 2. O ovariolo pode ser considerado como sendo um tubo alongado no qual os vários estádios do ciclo ovular estão dispostos, sendo que quanto maior o grau de desenvolvimento do oócito, mais próximo este se localiza do oviduto. A análise de várias imagens também demonstrou a presença do vírus neste órgão (dados não mostrados).

Ainda nesta imagem pode-se verificar que a marcação para o vírus dengue é predominante no vitelário, que corresponde a maior parte do ovariolo e onde estão localizadas as células em desenvolvimento (os oócitos) e também os trofócitos. Observa-se, também, que a parte apical do ovariolo praticamente não apresenta imunomarcção para o vírus dengue, esta parte equivale ao germário, que contém células ainda pouco diferenciadas.

Já na figura 16, o que se pode observar é um detalhe de um oócito maduro. O oócito maduro e os ovos são revestidos pelo cório, que é de natureza protéica e secretado pelas células foliculares que circundam o oócito. Nos Culicídeos é normalmente formado por duas

camadas, o exocórion e o endocórion. O endocórion é a camada mais espessa e tem como função principal a proteção mecânica. O exocório é sempre fino e responsável pelo padrão escultural do ovo. Nele se verifica a existência de saliências, em geral, essas projeções são designadas tubérculos do exocório. As projeções se dispõem de forma a constituir uma trama,

Tabela 2 – Número de fêmeas parentais positivas e negativas para o DENV-2 após alimentação infectante.

	Número de fêmeas adultas (geração parental)
Positivos para o DENV-2	25
Negativos para o DENV-2	5

Para a análise das progênes, as larvas foram coletadas e separadas em grupos que continham até 50 larvas, de acordo com a sua geração parental. Estes grupos foram analisados por RT-PCR para a presença do vírus dengue.

Como resultado da análise dos grupos de larvas da primeira oviposição (progênie proveniente do repasto infectante) verificou-se que todas as fêmeas parentais que se encontravam positivas foram capazes de transmitir o vírus para a sua progênie, mostrando que 100% das fêmeas positivas foram capazes de transmitir verticalmente o vírus dengue.

Tabela 3 – Número de grupos de larvas provenientes do repasto infectante (primeira oviposição) positivas e negativas para o DENV-2 após alimentação infectante.

	Grupos de larvas da Primeira Oviposição (progênie proveniente do repasto infectante)
Positivos para o DENV-2	25
Negativos para o DENV-2	5

Após a oviposição proveniente de uma alimentação com sangue infectante foi oferecido a estas mesmas fêmeas uma alimentação não infectante (sangue sem vírus) para testar a capacidade destas fêmeas em continuar transmitindo o vírus dengue para a sua progênie mesmo após repasto não infectante. O processo de coleta dos ovos e de eclosão e recolhimento das larvas para análise por biologia molecular foi o mesmo realizado para a primeira oviposição.

Tabela 4 – Número de grupos de larvas provenientes da segunda oviposição positivas e negativas para o DENV-2 após alimentação não infectante (sem vírus).

	Grupos de larvas da Segunda Oviposição (progênie proveniente do repasto não infectante)
Positivos para o DENV-2	23
Negativos para o DENV-2	7

A análise da tabela 4 mostra que após a segunda alimentação (sem vírus) apenas duas das 25 fêmeas positivas para o vírus dengue não foram capazes de transmitir o vírus à sua progênie.

Tabela 5 - Cálculo do índice mínimo de infecção para a progênie da primeira oviposição.

Fase examinada	Número de grupos positivos / Número de grupos testados	Total de larvas analisadas	Índice mínimo de infecção de <i>Aedes aegypti</i>
Larval	25/30	430	1 : 17,2

Tabela 6 - Cálculo do índice mínimo de infecção para a progênie da segunda oviposição.

Fase examinada	Número de grupos positivos / Número de grupos testados	Total de larvas analisadas	Índice mínimo de infecção de <i>Aedes aegypti</i>
Larval	23/30	900	1 : 39,1

A análise do índice mínimo de infecção mostra que após a alimentação infectante, o índice foi de 1: 17,2 (Tabela 5) e para a segunda alimentação foi de 1: 39,1 (Tabela 6).

Os resultados acima indicam que a população de fêmeas de *A. egypti* utilizada em nosso estudo possui a capacidade de transmitir o vírus dengue verticalmente a sua progênie.

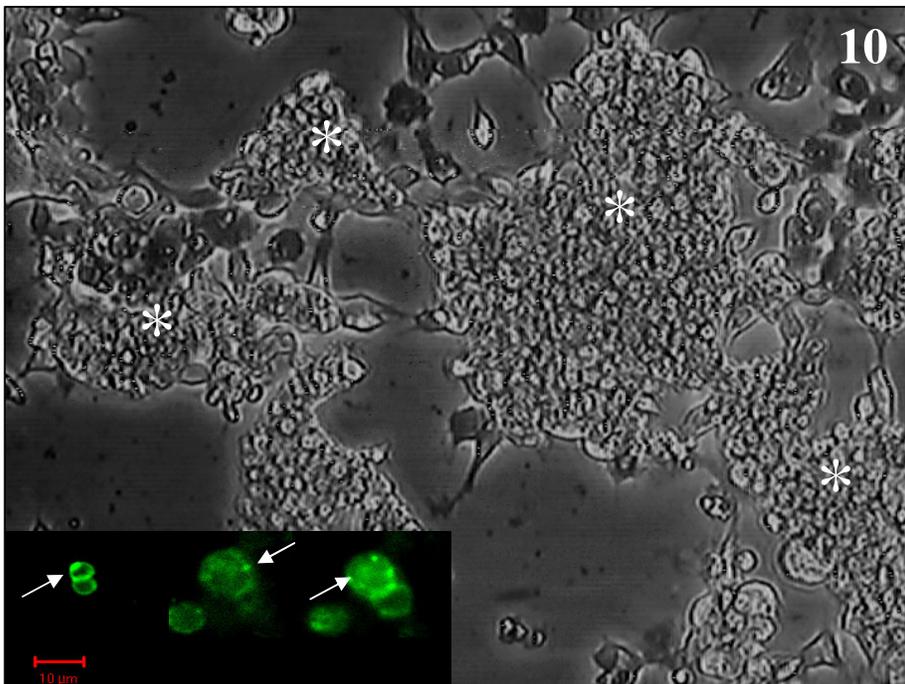
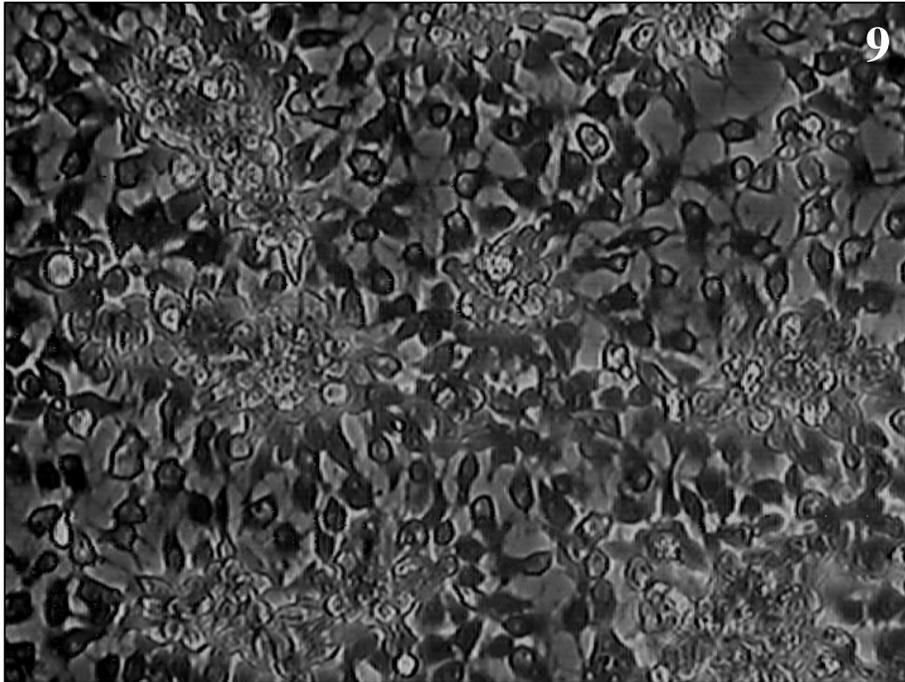


Fig. 9 – Cultura de células C6/36 não infectadas com o DENV-2 (controle).

Fig. 10 – Cultura de células C6/36 infectadas com o DENV-2. Nota-se a formação de sincícios (asteriscos). **Inset** - Imunomarcção de células C6/36 infectadas com o DENV-2 utilizando anticorpo anti-dengue. As setas indicam a marcação da presença do vírus. (Barra: 10μm; objetiva de 40x; Filtro BP 505-550; Laser 488nm).

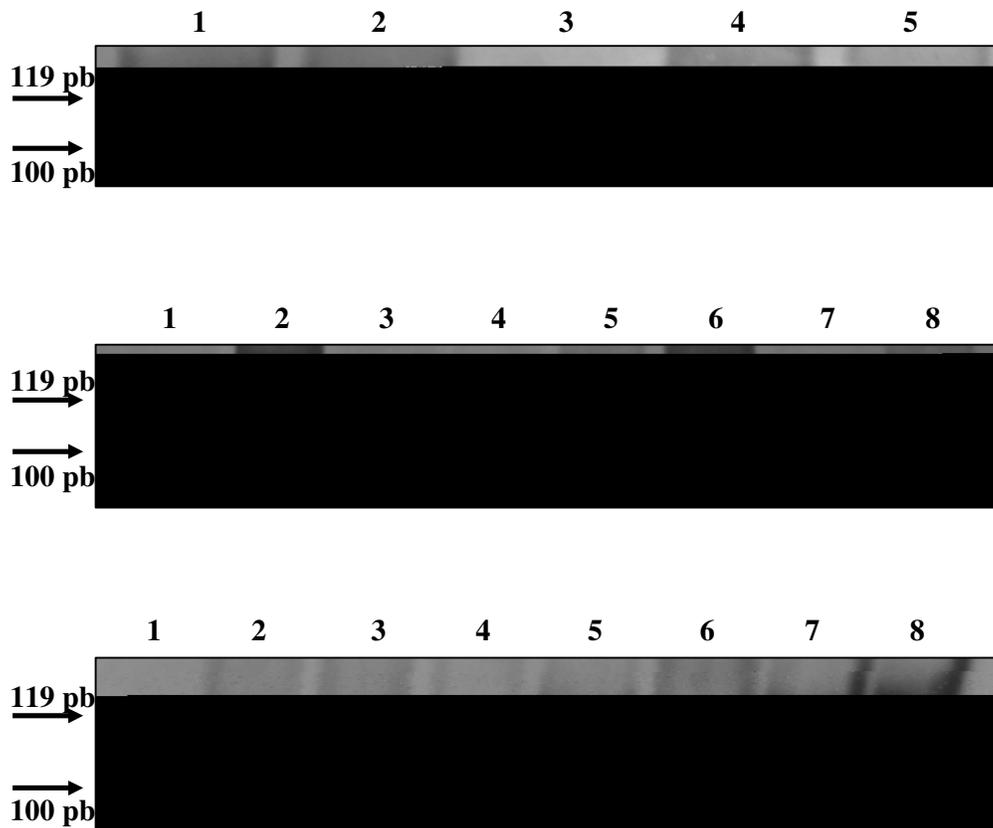


Fig. 11 – RT-PCR para detecção do DENV-2 em adultos e em grupos de larvas de *Aedes aegypti*.

A = Adulto - cabeça e corpo. 1- cabeça positiva. 2- corpo positivo. 3- marcador de peso molecular (100pb). 4- controle positivo para o DENV-2. 5- controle negativo.

B = Adultos - cabeças e corpos. 1- marcador de peso molecular (100pb). 2- controle positivo para o DENV-2. 3- corpo positivo. 4- cabeça negativa. 5- corpo positivo. 6- controle positivo para o DENV-2. 7- cabeça negativa. 8- corpo positivo.

C= Grupos de larvas. 1- controle negativo. 2- grupo de larvas da primeira oviposição negativo. 3- grupo de larvas da segunda oviposição negativo. 4- marcador de peso molecular (100pb). 5- grupo de larvas da primeira oviposição positivo. 6- controle positivo para o DENV-2. 7- fêmea parental positiva. 8- grupo de larvas da segunda oviposição positivo.

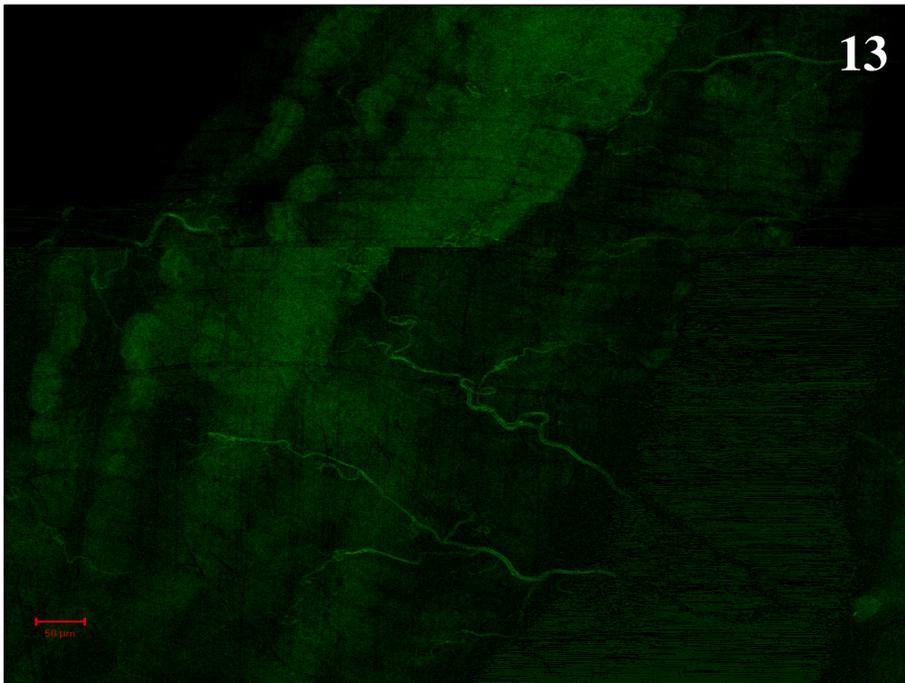
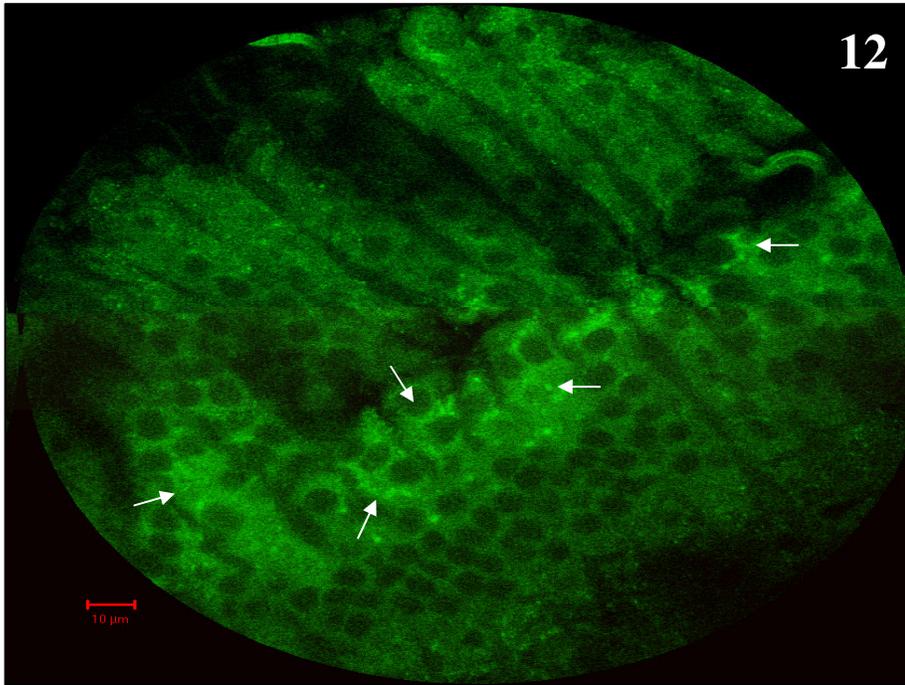


Fig. 12 – Imunomarcção de intestino médio infectado com o DENV-2 utilizando anticorpo anti-dengue. As setas indicam a marcação do vírus. (Barra: 10µm; crop; objetiva de 40x; Filtro LP 505; Laser 488nm).
Fig. 13 – Imunomarcção de intestino médio infectado com o DENV-2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle). Nota-se autofluorescência não intensa característica do tecido. (Barra: 50µ; objetiva de 10x; Filtro LP 505; Laser 488nm).

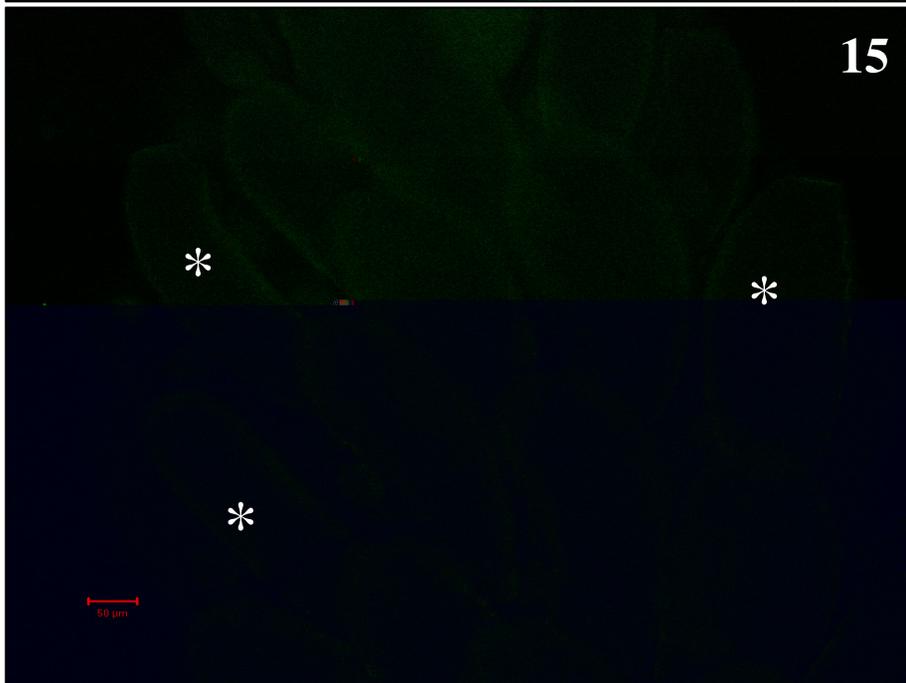
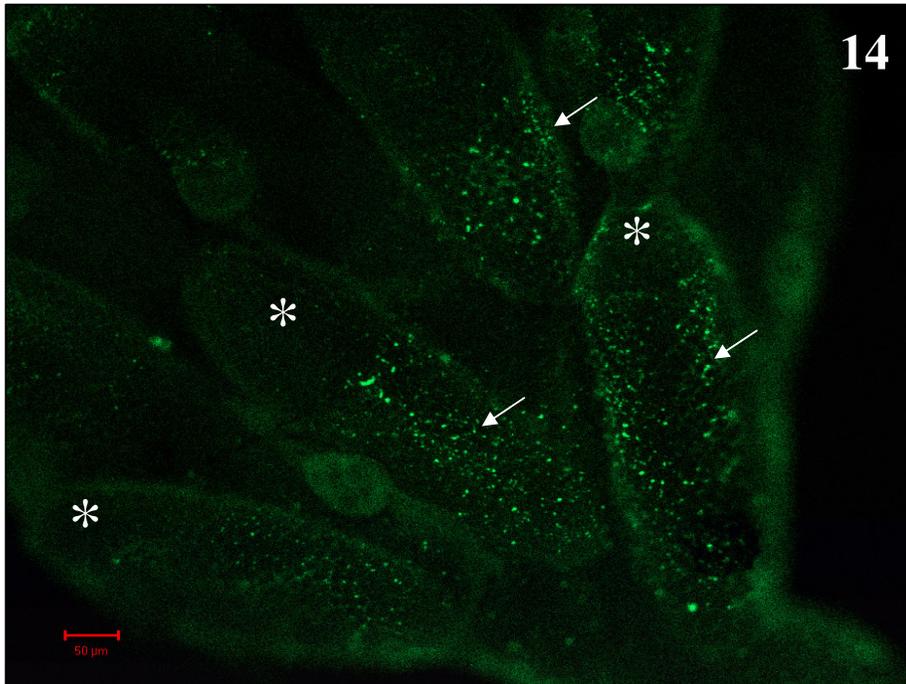


Fig. 14 – Imunomarcção de ovariolo infectado com o DENV- 2 utilizando anticorpo anti-dengue. As setas mostram a marcação do vírus no vitelário. Os asteriscos mostram os germários negativos. (Barra: 50µm; Objetiva 40x; Filtro LP 505; Laser 488nm).

Fig. 15 – Imunomarcção de ovariolo infectado com o DENV- 2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle). Nota-se autofluorescência não intensa característica do tecido. Os asteriscos mostram o perfil dos oócitos nos ovariolos. (Barra: 50µm; objetiva de 20x; Filtro LP 505; Laser 488nm).

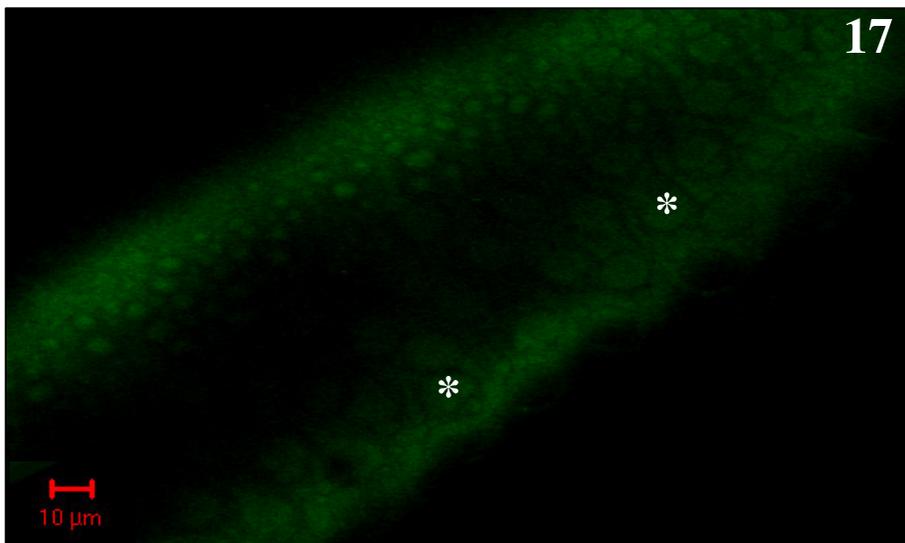
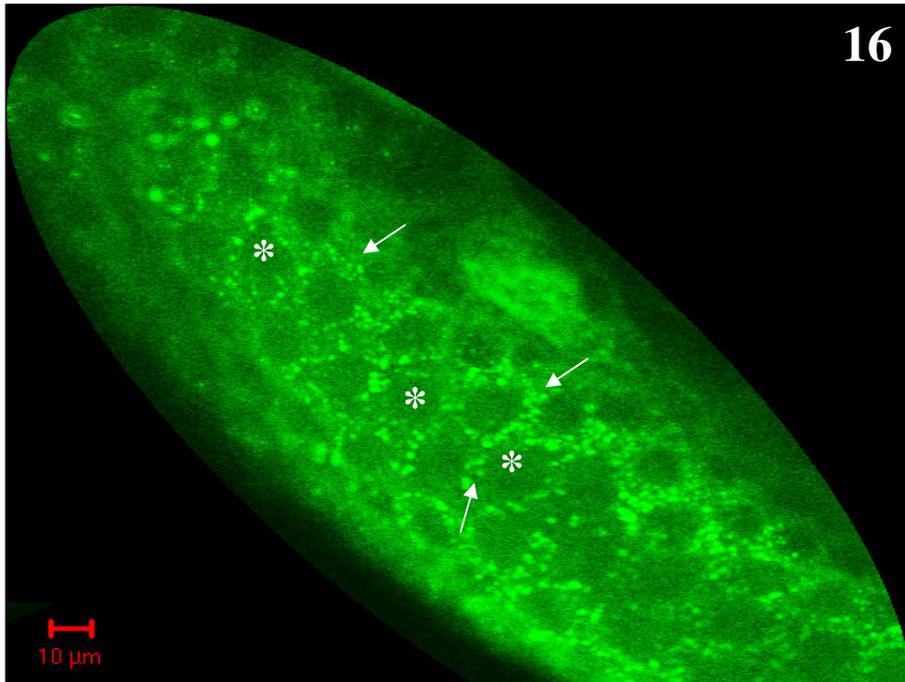


Fig. 16 – Imunomarcacão de um oócito maduro infectado com o DENV- 2 utilizando anticorpo anti-dengue. As setas mostram a marcação para o vírus ao redor dos tubérculos (asteriscos) do oócito. (Barra: 10 μ m; Overlay; Objetiva 20x; Filtro LP 505; Laser 488nm)

Fig. 17 – Imunomarcacão de um oócito maduro infectado com o DENV-2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle). Nota-se autofluorescência não intensa característica do tecido. Os asteriscos indicam os tubérculos do oócito (Barra: 10 μ m; objetiva de 40x; Filtro LP 505; Laser 488nm).

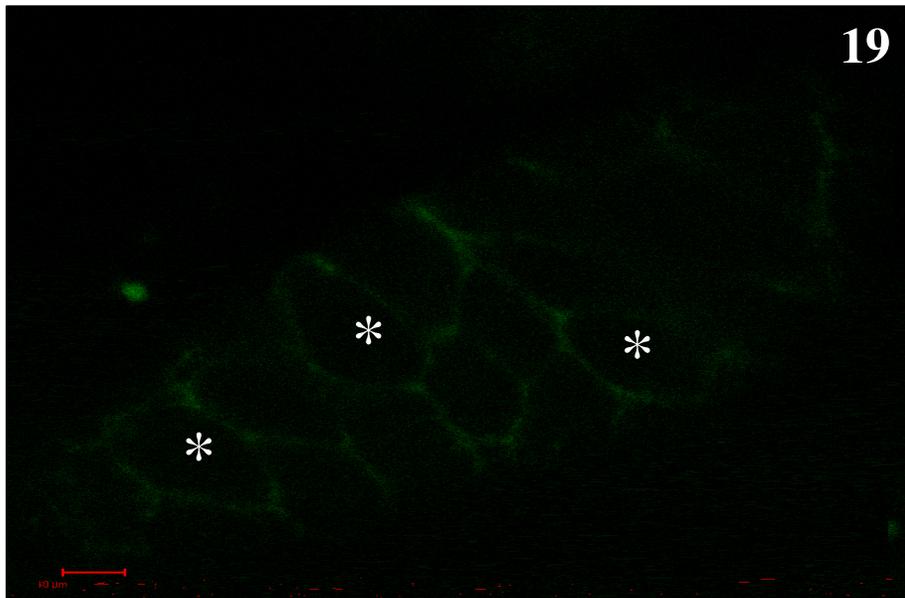
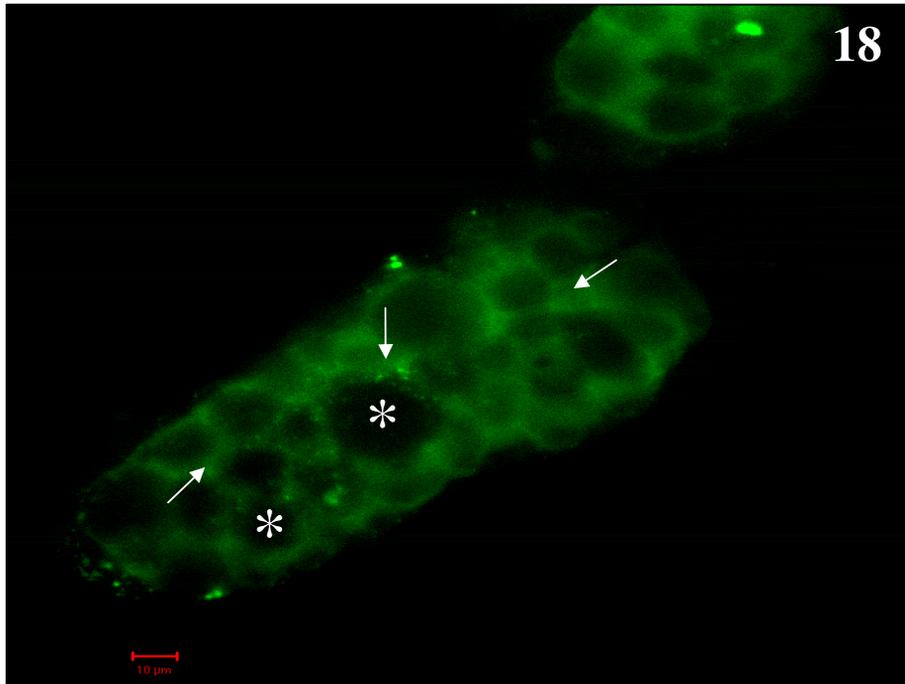


Fig. 18 – Imunomarcção de glândula salivar infectada com o DENV- 2 utilizando anticorpo anti-dengue. As setas mostram a marcação para o vírus no citoplasma das células secretoras. Os asteriscos indicam as vesículas secretoras. (Barra: 10 μ m; Objetiva 40x; Filtro LP 505; Laser 488nm).

Fig. 19 – Imunomarcção de glândula salivar infectada com o DENV-2 utilizando somente o anticorpo secundário (controle). Nota-se autofluorescência não intensa característica do tecido. Os asteriscos indicam as vesículas secretoras. (Barra: 10 μ m; objetiva de 63x; Filtro BP 505-550; Laser 488nm).

5- DISCUSSÃO

Os mecanismos que governam a infecção, disseminação e a transmissão dos arbovírus nos insetos vetores não são bem entendidos, entretanto, sabendo-se que as características genéticas, tanto da cepa do vírus quanto da população de mosquitos, influenciam no processo de infecção (Black IV et al. 2002), o primeiro passo necessário para o nosso estudo, foi a padronização da infecção de *Aedes aegypti* com o vírus dengue.

O estabelecimento e a padronização da infecção do *A. aegypti* com vírus dengue foi extremamente importante para futuros projetos e também pelo fato de ter sido realizado pela primeira vez em território nacional. Até o momento, de acordo com o nosso conhecimento, não existe na literatura informação de um laboratório nacional que tenha estabelecido esta técnica. Os estudos de interação nesta área têm sido restritos a laboratórios estrangeiros, apesar da importância da dengue no nosso país. A concretização do estabelecimento da infecção laboratorial do *A. aegypti* com o vírus dengue criou um fato novo, abrindo a perspectiva de vários projetos relacionados com a interação mosquito vetor/vírus dengue - inclusive com a colaboração de outros laboratórios nacionais - poderem ser aprofundados e estudados a contento.

A população de *A. aegypti* colonizada no nosso laboratório mostrou-se composta de indivíduos susceptíveis à infecção pelo vírus dengue sorotipo 2. Este fato é importante, pois agora temos no Brasil, um modelo de infecção constituído de mosquitos vetores e de amostra viral provenientes do nosso país. Tal modelo é melhor representativo da realidade nacional do que os modelos implantados em laboratórios estrangeiros, os quais geralmente utilizam mosquitos de colônias estabelecidas há longo tempo e amostras virais isoladas em regiões distantes.

Muitos dos experimentos de interação mosquito vetor/vírus dengue utilizam insetos derivados de cepas mantidas a longo tempo em laboratório. A elucidação do tropismo viral em *A. aegypti* recentemente colonizados pode prover melhor conhecimento sobre o potencial de transmissão e sobre as interações vírus-vetor que condicionam a epidemiologia da dengue e o seu potencial epidêmico (Salazar et al. 2007). Contudo, conforme exposto acima, nós decidimos coletar mosquitos *A. aegypti* em Campos dos Goytacazes no Estado do Rio de Janeiro em 1999 quando estava ocorrendo um surto de dengue. Estudos têm demonstrado uma grande variabilidade na competência vetorial de mosquitos *A. aegypti* coletados em distintas

regiões geográficas em outros países, como por exemplo, no México, nos Estados Unidos (Bennett et al. 2002) e na Tailândia (Mousson et al. 2002). A coleta na região onde casos de dengue estavam ocorrendo, aumentou a nossa possibilidade de trabalhar com *A. egypti* que apresentavam maior competência vetorial permitindo uma maior facilitação do nosso processo de padronização da técnica de infecção laboratorial. Desta forma, acreditamos que podemos realizar com sucesso estudos comparativos de infecção de outras populações de *A. egypti* de distintas regiões do Brasil, utilizando o protocolo desenvolvido com o modelo já estabelecido.

A maioria dos experimentos para avaliar os índices de infecção de vetores da dengue, tanto o *A. egypti* quanto o *A. albopictus* frente ao vírus dengue prioriza a utilização do sorotipo 2 (DENV-2), provavelmente porque este sorotipo parece ser mais adaptado aos mosquitos vetores (Joshi et al. 2002), e porque dispúnhamos de um anticorpo primário anti-dengue 2 para podermos realizar a imunomarcagem dos tecidos dos *A. egypti* infectados. Além disso, Anderson e Rico-Hesse (2006) mostraram que o genótipo viral envolvido na infecção do *A. egypti* com o DENV-2 influi tanto nos índices de disseminação do vírus no inseto, quanto na capacidade vetorial do mosquito infectado. Eles demonstraram que o

oligonucleotídeos específicos para a amplificação do sorotipo 2, seguindo metodologia estabelecida anteriormente (Lanciotti et al. 1992). Desta forma, foi possível conhecer o índice de infecção da população de *A. egypti* estudada, assim como desenvolver os experimentos de transmissão vertical, como veremos a seguir.

O índice de infecção das fêmeas de *A. egypti* encontrado por nós foi de 75%. Estudos de infecção de populações de *A. egypti* no México mostraram uma variação de 24% a 83% (Bennett et al. 2002). Lourenço-de-Oliveira e colaboradores (2004) mostraram que populações brasileiras de campo de *A. egypti* tiveram um índice de infecção para o vírus dengue 2 que variou de 21,6% a 99%. Comparativamente, podemos deduzir que a população colonizada por nós e utilizada nestes experimentos apresenta um alto índice de infecção pelo DENV-2.

Ainda, ao observarmos os dados obtidos por Lourenço-de-Oliveira e colaboradores (2004), podemos estabelecer uma comparação entre as populações provenientes do Estado do Rio de Janeiro estudadas por este autor e a população colonizada em nosso laboratório, originalmente coletada naquele estado: o índice de infecção apresentado pelo autor acima variou de 67,26% a 98,24%, enquanto que a nossa população teve um índice de 75%, provando novamente que, apesar de já estar colonizada há 7 anos, as fêmeas da nossa colônia apresentam um perfil similar ao do percentual médio encontrado em populações de campo.

Como já mencionado na metodologia, o índice de infecção foi obtido através da porcentagem de fêmeas infectadas que tiveram corpo e cabeça infectados. Entretanto, foram encontradas cinco fêmeas, dentro das consideradas negativas, que apresentaram positividade para o vírus dengue somente no corpo. Esses dados sugerem que algumas fêmeas dentro da população em estudo, não foram capazes de estabelecer a infecção nas glândulas salivares, o que é um fato importante, uma vez que a ausência de infecção neste órgão pode significar que estas fêmeas são incapazes de infectar hospedeiros vertebrados durante um repasto sanguíneo. Por outro lado, podemos inferir que a presença do vírus no corpo pode indicar positividade nos ovários, o que poderia fazer com que estas fêmeas sejam capazes de transmitir o vírus para a sua progênie. Desta forma, este fato sugere que a transmissão vertical (via progênie) do vírus é independente da capacidade do vetor transmitir a infecção horizontalmente (via picada).

A transmissão vertical é definida como a passagem do vírus a partir de uma fêmea infectada para a sua progênie (F1). Esse tipo de transmissão já foi demonstrado para outros *F. viviparus* como o vírus da Encefalite Japonesa (Rosen et al. 1978, 1989), Febre Amarela (Aitken et al. 1979), Dengue (Rosen et al. 1983) e vírus Kunjin (Tesh 1980). Também foi demonstrado, na América do Norte, para o vírus da encefalite de Saint Louis (Francy et al. 1981, Hardy et al. 1984, Nayar et al. 1986). Esse tipo de transmissão apresenta grande importância epidemiológica já que, este é, provavelmente, um mecanismo de manutenção do vírus dengue na natureza, principalmente no período onde não há muita chuva e ocorre redução da população de vetores.

Deve-se enfatizar que a presença do vírus ou do antígeno viral no ovário das fêmeas não permite afirmar que o vírus irá entrar nos oócitos e infectar a progênie. Por isso, foram realizados experimentos de oviposição para a confirmação da existência da transmissão vertical nas fêmeas em estudo. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as fêmeas infectadas pela via oral (através de alimentação infectante) foram capazes de transmitir o vírus verticalmente à sua progênie. Estes dados provam que as fêmeas da colônia, além de se tornarem infectadas, são capazes de transmitir os vírus à sua progênie.

O índice de infecção encontrado no experimento de transmissão vertical foi de 83,33%, enquanto o índice de infecção encontrado no experimento de padronização da infecção foi de 75%. Talvez tenha ocorrido esta pequena diferença por não ter sido utilizado o mesmo título do vírus dengue em ambos os experimentos (primeiro experimento: 4×10^4 pfu/mL e segundo experimento: 1×10^7 pfu/mL).

Em relação ao índice mínimo de infecção, pode-se observar que para a Oviposição 1 (proveniente da alimentação infectante), o índice foi de 1: 17,2 e para a Oviposição 2 (alimentação não infectante) foi de 1: 39,1. Geralmente, o índice de infecção encontrado na natureza é muito menor do que o encontrado aqui, isso pode ser devido ao fato de que em estudos realizados em laboratório, praticamente todas as fêmeas estão infectadas, visto que, na natureza o índice de infecção materna é muito menor. Por exemplo, Khin e Than (1983) obtiveram um índice mínimo de infecção de 1: 2.067 ao analisarem larvas de *A. egypti*, coletadas em Rangoon (Sudeste Asiático). Entretanto, quando a coleta dos insetos é feita em época de intensa transmissão, a chance de se obterem elevados índices é maior.

Índices de infecção de fêmeas obtidos em laboratório, após a exposição oral ou por inoculação intratorácica, podem superestimar os índices de transmissão que ocorrem na natureza devido à necessidade de sobrevivência dos mosquitos para que se produza um segundo ciclo de oviposição (Dhom et al. 2002).

A identificação da transmissão vertical nesta população de *A. egypti* mostra que estas fêmeas foram capazes de passar o vírus para a sua progênie, porém não nos permite dizer com certeza a quantidade de larvas infectadas em cada progênie, uma vez que foram analisados grupos e não larvas individuais e que o índice mínimo de infecção sugere que apenas um indivíduo está infectado dentro de cada grupo. Joshi e colaboradores (2002) mostrou que a susceptibilidade de *A. egypti* para o vírus dengue está associada com os índices de transmissão vertical, uma vez que altos índices deste tipo de transmissão em uma população podem estar relacionados com a presença de um grande número de fêmeas susceptíveis à infecção.

Um grande número de respostas do sistema imune inato de *Aedes egypti* é conhecido para diferentes patógenos. Parece que poucas respostas de defesas são feitas contra os vírus no ovário, e que a transmissão vertical seria um mecanismo aceitável para sua manutenção na natureza. Os vírus que passam pela via transovariana ganham a oportunidade de se multiplicarem no embrião latente. É possível que a multiplicação em diferentes órgãos durante a embriogênese ou em estádios mais tardios de vida varie entre mosquitos devido ao tropismo tissular, cepa viral e carga genética do hospedeiro. Estes fatores individualmente ou cumulativamente podem contribuir para a diferença na duração da fase larval, na fecundidade e na fertilidade em mosquitos infectados verticalmente (Joshi et al. 2002).

Os mecanismos que determinam se um arbovírus irá ser transmitido verticalmente ou não pelas fêmeas ainda permanecem desconhecidos. Deve haver um controle por mecanismos genéticos, mas é difícil explicar porque alguns folículos são infectados e outros não, no mesmo inseto, uma vez que todos os folículos ovarianos em uma fêmea são geneticamente idênticos (Tesh & Cornet 1981).

Rosen (1987) ao estudar a via venérea (machos infectados transmitindo o vírus para fêmeas não infectadas) de transmissão do vírus dengue, confirmou que fêmeas, ao ingerirem alimentação sanguínea alguns dias antes da cópula, estavam mais aptas a se infectarem pelo

vírus do que as que não se alimentaram de sangue antes da cópula. Entretanto eles se surpreenderam em visualizar que alguns descendentes das fêmeas que se alimentaram antes da cópula haviam se infectado com o vírus dengue. Os ovários das fêmeas começam a se desenvolver assim que estas se alimentam de sangue e, uma vez que os ovos maduros estão recobertos por um fino cório após 2 ou 3 dias, parece que o único modo pelo qual o vírus conseguiu ter acesso aos ovos teria sido através do micrópila (aparato especializado que se localiza na porção anterior do ovo e que permite que o espermatozóide alcance o ovo durante a fertilização). Desta forma, este poderia ser um dos caminhos pelo qual o vírus entra nos ovos e pode ser transmitido verticalmente. Todavia, os nossos resultados de imunomarcção através da microscopia laser confocal e de RT-PCR (dados não mostrados) sugerem que a infecção pelo DENV-2 já existe nos oócitos, mesmo antes da maturação e da postura dos ovos.

Apesar de ter sido demonstrada tanto em laboratório quanto na natureza a importância epidemiológica da transmissão vertical do vírus dengue ainda não é muito bem compreendida. Os dados apresentados no trabalho de Joshi e colaboradores (2002) sugerem que a persistência da transmissão vertical em sucessivas gerações de mosquitos é um importante mecanismo de manutenção do vírus durante situações em que haja uma diminuição das populações de mosquitos. Além disso, também já foi demonstrado que mosquitos que se tornaram infectados pela via vertical são capazes de transmitir o vírus por via horizontal (do mosquito para o hospedeiro vertebrado), sugerindo também que os mosquitos atuam como reservatórios deste vírus.

A transmissão vertical tem grande importância epidemiológica no ciclo da dengue por várias razões: (1) os mosquitos que já nascem contaminados pelo vírus podendo transmiti-lo mais cedo do que aqueles que necessitam se infectar através de repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado (Diallo et al. 2000); (2) sabe-se que os machos além de poderem nascer infectados pela transmissão vertical, também são capazes de transmitir o vírus dengue venereamente às fêmeas (Rosen 1987), desta forma, a transmissão venérea poderia aumentar a eficiência da transmissão vertical na natureza (Dhom et al. 2002); e (3) a mais divulgada das relevâncias epidemiológicas da transmissão vertical é que em condições climáticas adversas – no caso da dengue, prolongados períodos secos – ou na ausência de hospedeiros vertebrados susceptíveis, teoricamente, esses vírus poderiam ser mantidos unicamente através da transmissão vertical em populações de mosquitos por apenas uma ou

duas gerações, até que as condições ambientais sejam favoráveis para o restabelecimento do ciclo primário mosquito-homem (Tesh et al. 1977).

Assim, é importante que a prevenção à dengue se focalize também nos ovos do *A. egypti*, uma vez que estes podem apresentar diapausa e sobreviver por períodos variáveis. Além disso, o principal estímulo para que a diapausa seja interrompida, parece ser o contato com a água e, após eclosão das larvas, pode surgir uma nova geração de insetos, já infectados pelo vírus dengue.

A microscopia laser confocal foi uma ferramenta que se mostrou bastante eficiente para a observação da distribuição do vírus dengue pelos tecidos dos mosquitos além de verificar se a infecção nestes é localizada ou geral, se estendendo por todo o tecido.

A análise do material pela microscopia confocal mostrou que a infecção do vírus dengue no intestino médio das fêmeas não foi homogênea. Observa-se que a presença da fluorescência característica da infecção viral está localizada em algumas células epiteliais vizinhas. Segundo Hardy e colaboradores (1983), a distribuição das células infectadas dentro do intestino médio assim como o número de células infectadas pode variar após a alimentação infectante. Resultados similares foram obtidos em outros testes de interação inseto-patógenos: *A. egypti* infectado com o DENV-1 (Chen et al. 1993), *C. tritaeniorhynchus* infectado com o vírus da língua azul (Sieburth et al. 1991), *A. tritaeniorhynchus* infectado com DENV-2 (Kuberski 1979), *C. tritaeniorhynchus* (Doi et al. 1967) e *C. tritaeniorhynchus* (Doi 1970) infectados com vírus da encefalite japonesa. Os antígenos virais para o DENV-2 não foram encontrados na porção anterior do intestino (Kuberski 1979), enquanto que os antígenos para o vírus da encefalite japonesa foram detectados por todo o intestino (Doi et al. 1967, Doi 1970).

Outra hipótese é a de que as células infectadas possam ser subpopulações celulares atuando como receptores para a disseminação viral do intestino médio para a hemocele do mosquito. Também, a quantidade de células infectadas pode estar relacionada com a competência vetorial dos mosquitos.

Ensaio de infectividade feitos em intestinos dissecados de mosquitos que se alimentaram de vários arbovírus indicam que o título viral diminui após a ingestão inicial dos

vírus e em seguida, aumenta rapidamente dentro de poucos dias (Hardy et al. 1983). Salazar e colaboradores (2007) mostraram que a partir do segundo dia após a infecção dos *A. aegypti* com o DENV-2, alguns insetos já apresentaram positividade da infecção no intestino médio. No dia seguinte, o foco da infecção já envolvia múltiplas células. Percebeu-se que a infecção se espalhou lateralmente a partir do ponto inicial para as células vizinhas envolvendo todo o órgão entre os dias 7 e 10 após a infecção oral. A partir do décimo dia foi observada uma diminuição na quantidade de antígenos virais neste órgão, sendo que no 14º dia, esta queda foi mais expressiva. A análise do intestino médio no 21º dia após a infecção mostrou que praticamente não se observava mais a presença do antígeno viral. Em contraste, em outros órgãos e tecidos, como o corpo gorduroso, as glândulas salivares e o sistema nervoso, pode-se observar que a quantidade de antígeno viral aumentou com o passar dos dias.

O canal alimentar é frequentemente o único ambiente interno dos artrópodes no qual os patógenos são expostos. Além do mais, um número significativo de fatores intrínsecos da competência vetorial, sem dúvida, atua dentro deste canal. O ambiente do canal alimentar pode falhar em prover algumas necessidades particulares para determinado patógeno. Por exemplo, uma molécula receptora específica de superfície pode ser necessária para a adesão ideal de um arbovírus. Havendo a falta deste receptor, ou uma densidade muito pequena deste, ou ainda, sua oclusão de algum modo, a entrada do vírus na célula e sua subsequente replicação podem não ocorrer. Outra forma na qual o canal alimentar pode atrapalhar o patógeno é através da ausência de sinais químicos específicos que são necessários para estimular a replicação ou mudanças cíclicas no patógeno, fazendo, deste modo, com que esta etapa do processo não ocorra (Romoser 1996).

Sabe-se que os vírus podem se replicar dentro da hemocele apenas após atravessarem a barreira do intestino médio (Kuberski 1979, Hardy et al. 1983, Schoepp et al. 1991, Chen et al. 1993) e, quando isso acontece, as partículas virais se dispersam pela hemolinfa circulante e se replicam em vários tecidos e órgãos, de maneira similar ao que ocorre com o vírus da febre do Rift Valley em *G. e pipiens* (L.) (Faran et al. 1988).

Ao analisarmos os resultados obtidos por Salazar e colaboradores (2007), observamos um achado novo e com uma possível relevância na disseminação do vírus dengue a partir do intestino médio do inseto. Foram encontrados antígenos virais no sistema traqueal dos *A. aegypti* infectados pelo DENV-2 e segundo Engelhard e colaboradores (1994) e, Bowers e

colaboradores (1995) este sistema poderia atuar como um “canal” para a disseminação de diferentes vírus em insetos. O sistema traqueal é ainda suspeito de ser o canal de escape do intestino médio para o vírus da encefalite equina Venezuela em *Ochlerotatus eniorhynchus* (Romoser et al. 2004).

A análise dos órgãos reprodutivos do *A. aegypti* mostrou o mesmo padrão de infecção visualizado no intestino médio. Os vírus foram detectados mais especificamente em uma parte dos ovaríolos (vitelário), sugerindo que a infecção se localiza no epitélio folicular. A presença de infecção viral no folículo epitelial, nas células nutritivas (trofócitos) e em oócitos também foi observada por Chandler e colaboradores (1998) ao estudar a infecção dos ovários de *Aedes triseriatus* com o vírus La Crosse e também por Tesh e Cornet (1981) estudando *A. albopictus* infectado com o vírus San Angelo.

Os vírus também foram detectados em outros órgãos como o corpo gorduroso (dados não mostrados) e nas glândulas salivares, demonstrando que essa população de mosquitos é susceptível à cepa de vírus dengue utilizada. Após a infecção da glândula salivar, o vírus deve escapar para o lúmen da glândula onde ele pode ser transmitido a hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo (Woodring et al. 1996). A presença do vírus dengue na glândula salivar indica que o vírus é capaz de se multiplicar neste órgão. Entretanto, este fato não permite que se afirme que esta população é capaz de transmitir o vírus, uma vez que não foram feitos testes de transmissão oral dos vírus pelas fêmeas.

A maioria das evidências indica que a infecção da glândula salivar acontece via hemolinfa. Postula-se que exista um valor mínimo de partículas virais para que se estabeleça a infecção neste órgão. Os vírus passam pela membrana basal que circunda a glândula salivar para ter acesso à membrana celular das células secretoras. Em geral, apenas os lóbulos laterais das glândulas se tornam infectados e, da mesma forma que ocorre com o intestino, apenas algumas células de cada lóbulo se tornam infectadas. Os antígenos virais são vistos a princípio na porção distal destas células e posteriormente na porção apical, onde a imunofluorescência se torna extremamente brilhante (Chamberlian & Sudia 1961 apud Hardy et al. 1983). Contudo, os nossos estudos não foram direcionados no sentido de estabelecer a cinética de invasão da glândula salivar.

6 - CONCLUSÃO

O estudo em questão é a parte inicial, porém muito importante de um projeto maior que visa estudar a competência vetorial das populações brasileiras de *Aedes aegypti* e se faz relevante porque, para analisar estas populações é necessária uma metodologia eficiente de infecção das fêmeas de *A. aegypti* com o vírus dengue. As fêmeas utilizadas nos experimentos mostrados nesta dissertação, servirão como controle positivo das infecções com as populações que serão coletadas em campo, uma vez que a população colonizada se mostrou susceptível à infecção pelo DENV-2. Além disso, este estudo também gerou um conhecimento mais detalhado sobre a interação *A. aegypti*/vírus dengue, mostrando a infecção do vírus em diferentes órgãos e focalizando na transmissão vertical, que apresenta uma importância epidemiológica muito grande no controle da doença.

Além disso, concluímos que em relação aos objetivos deste projeto, foi possível:

- 1) Desenvolver uma metodologia de infecção com o vírus dengue eficiente e que faz uso de mosquitos vetores e também de cepa viral originários do Brasil, o que facilita posteriores estudos de interação patógeno-vetor nacionais.
- 2) Utilizar a técnica de RT-PCR para estimar os índices de infecção com o vírus dengue da população em estudo.
- 3) Determinar a porcentagem de fêmeas de *A. aegypti* que foram capazes de completar o período de incubação extrínseco do vírus, sendo potenciais vetores.
- 4) Determinar que as fêmeas infectadas em laboratório se mostraram capazes de transmitir o vírus dengue através de duas posturas, sendo que o segundo repasto consistiu de sangue não infectado. Além disso, observou-se que a RT-PCR é sensível para detectar o RNA viral em grupos de larvas.

5) Verificar que as fêmeas de *A. egypti* em estudo, apesar de serem provenientes de uma colônia, apresentam índices de infecção próximos aos de fêmeas de populações brasileiras coletadas em campo e infectadas em laboratório com o vírus dengue.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaskov JG 2003. Dengue. ADF Health. 4: 66-71.

Aitken THG, Tesh RB, Beaty BJ, Rosen L 1979. Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*) 28: 119-12.

Alcon-LePoder S, Drouet MT, Roux P, Frenkiel MP, Arborio M, Durand-Schneider AM, Maurice M, LeBlanc I, Gruenberg J, Flamand M 2005. The secreted form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. J Virol. 79: 11403-11.

Anderson JR, Rico-Hesse R 2006. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. Am J Trop Med Hyg. 75:886-92.

Baleotti FG, Moreli ML, Figueiredo LTM 2003. Brazilian *Aedes aegypti* phylogeny based on NS5. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98: 379-82.

Bangs MJ, Tan R, Listianingshi E, Kay BH, Porter KR 2001. Detection of dengue viral RNA in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) exposed to sticky lures using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Med Entomol. 38: 720-4.

Barreau C, Jousset FX, Bergoin M 1997. Venereal and vertical transmission of the *Aedes aegypti* parvovirus in *Aedes aegypti* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 57: 126.

Beerntsen BT, James AA, Christensen BM 2000. Genetics of mosquito vector competence. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 115-37.

Bennett KE, Olson KE, Munoz MDL, Fernandez-Salas I, Farfán-Ale JA, Higgs S, Black IV WC, Beaty BJ 2002. 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 67: 85-92.

Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL 2007. Functional characterization of cis and trans protease activity of the flavivirus NS2B-NS3 protease. J Biol Chem. Papers in press, published online ahead of print March 2.

Billingsley PF, Rudin W 1992. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. J Parasitol. 78: 430-40.

Black IV WC, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernandez-Salas I, Munoz MDL, Farfán-Ale JA, Olson KE, Beaty BJ 2002. *Plasmodium vivax* susceptibility in *Aedes aegypti*. Archives of Medical Research. 33: 379-388.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Werthein-van-Dillen PME, Van der Noordaa J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 28: 495-503.

Bowers DF, Abell AA, Brown DT 1995. Replication and tissue tropism of the alphavirus sindbis in the mosquito *Aedes albopictus*. Virology 212: 1-12.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor normas técnicas. Brasília: FUNASA; 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Campanelli ES, Cecílio AB 2004. Detecção molecular do vírus dengue em larvas de *Aedes* spp. Iniciação científica – destaques 2003. 1: 89-96.

Castro MG, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenço-de-Oliveira R 2004. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99: 809-14.

Cecílio AB. Identificação e caracterização molecular do vírus dengue e febre amarela. Belo Horizonte; 2002. Doutorado [Tese em Microbiologia] – Universidade Federal de Minas Gerais.

Centre National D'Études Spatiales. Disponível em: www.cnes.fr> Acesso em 01 de março de 2007.

Chambers TJ, Weir RC, Grakoul A 1990. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 8898-02.

Chandler U, Blair CD, Beaty BJ, 1998. La Crosse virus infection of *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) ovaries before dissemination of virus from the midgut. *J Med Entomol*. 35: 567-72.

Chapman RF 1998. *The insects: Structure and function*. 4th ed. Cambridge University, United Kingdom. 770pp.

Chen WJ, Wei HL, Hsu EL, Chen ER 1993. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to Dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. *J Med Entomol*. 30: 524-30.

Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Med*. 3: 866-71.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira RL 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 228pp.

Diallo M; Thonnon J; Fontenille D. Vertical transmission of the yellow fever virus by *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae): dynamics of infection in F1 adult progeny of orally infected females. *Am J Trop Med Hyg*. 62: 151-6.

Dohm DJ, Sardelis MR, Turell MJ 2002. Experimental vertical transmission of west nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 39: 640-4.

Doi R, Shirasaka H, Sasa M 1967. The mode of development of Japanese encephalitis virus in the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex oryzae* as observed by the fluorescent antibody technique. *Jpn J Exp Med*. 37:227-38.

Doi R 1970. Studies on the mode of development of Japanese encephalitis virus in some groups of mosquitoes by the fluorescent antibody technique. *Jpn J Exp Med*. 40: 101-15.

Engelhard EK, Kam-Morgan LNK, Washburn JO, Volkman LE 1994. The insect tracheal system: A conduit for systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 3221-37.

Faran ME, Turell MJ, Romoser WS, Routier RG, Gibbs PH, Cannon TL, Routier RG 1987. Reduced survival of adult *C. e pipiens* infected with Rift Valley fever virus. *Am J Trop Med Hyg*. 37: 403-09.

Faran ME, Romoser WS, Routier RG, Bailey CL 1988. The distribution of Rift Valley virus in the mosquito *C. e pipiens* as revealed by viral titration of dissected organs and tissues. *Am J Trop Med Hyg*. 39:206-213.

Fernández Z, Forattini OP 2003. Sobrevivência de populações de *Aedes hropicif s*: idade fisiológica e história reprodutiva. *Rev Saúde Pública*. 37: 285-91.

Figueiredo LTM 1999. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Medicina, Ribeirão Preto*, 32: 15-20.

Figueiredo LTM 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*. 2: 1643–49.

Forattini OP 1986. Identificação de *Aedes (tego yi) hropicif s* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 20: 244-5.

Forattini OP 2002. *Culicidologia médica*, vol 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 864pp.

Franco O. *Historia da Febre Amarela no Brasil*, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1976.

Francy DB, Rush WA, Montoya M, English DS, Bolin RA 1981. Transovarial transmission of St. Louis encephalitis virus by *C. e pipiens* complex mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 30: 699-705.

Gadelha DP, Toda AT 1985. Biology and behavior of *Aedes egypti*. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 37: 29-36.

Galun R, Oren N, Zecharia M 1984. Effect of plasma components on the feeding response of the mosquito *Aedes aegypti* L. to adenine nucleotides. *Physiol. Entomol.* 9: 403-8.

Gibbons RV, Vaughn DW 2002. Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal.* 324: 1563-66.

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

Grimstad PR, Ross QE, Craig Junior GB 1980. *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. II. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection. *J Med Entomol.* 17: 1-7.

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

Gubler DJ, Clark GG 1996. Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. *Acta Trop.* 61: 169-79.

Gubler DJ 1998a. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 11: 480-96.

Gubler DJ 1998b. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis.* 4: 442-450.

Gubler DJ 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2: 100-3.

Guzmán MG, Kouri G 2002. Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases.* 2: 33-42.

Guzmán MG, Kouri G 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 27: 1-13.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Meyer RP 1980. Mosquitoes as carriers of viral diseases. *California Agriculture* 34: 8.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviroses. *Annu Rev Entomol.* 28: 229-62.

Hardy JL, Rosen L, Reeves WC, Scrivani RP, Presser SB 1984. Experimental transovarial transmission of St. Louis encephalitis virus by *Culex* and *Aedes* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 33: 166-75.

Henchal EA, Putnak JR 1990. The dengue viruses. *Clin Microbiol.* 3: 376-96.

Hull B, Tikasingh E, de Souza M, Martínez R 1984. Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg* 33: 1248.

Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC 1999. Analysis of the steps involved in Dengue Virus entry into host cells. *Virology* 257: 156-67.

Jobling B, Lewis DJ 1987. Anatomical drawings of biting flies. *British Museum (Natural History)*, p. 49-68.

Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ 2003. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol.* 77: 7143-9.

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

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

Khin MM, Than KA 1983. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg.* 32: 5904.

Kuberski TT 1979. Fluorescent antibody studies on the development of dengue-2 virus in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 16: 343-49.

Kurane I, Rothman A, Livingston P, Green S, Gagnon S, Janus J, Innis B, Nimmannitya S, Nisalak A, Ennis F 1994. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. Arch Virol Suppl. 9: 59-64.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 30: 545-51.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol. 73: 4738-47.

Leysen P, Clercq E, Neyts J 2000. Perspectives for the treatment of infections with *F. viverrina*. Clinical Microbiology Reviews. 13: 67-82.

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

Mairuhu ATA, Wagenaar J, Brandjes DPM, van Gorp ECM 2004. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23: 425-33.

Marques AC 1985. Sobre a viabilidade atual de erradicação do *Aedes aegypti* no controle da febre amarela no Brasil. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 37: 37-6.

Marzochi KBF 1994. Dengue in Brazil – situation, transmission and control – a proposal for ecological control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 89: 235-45.

Ministério da Saúde. Disponível em: www.Saude.gov.br> Acesso em 01 de março de 2007.

Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennett K, Black IV W, Barillas-Mury C 2005. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 72: 631-7.

Monath TP 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 2395-00.

Monath TP, Heinz FX 1996. Flaviviruses. In *Fields Virology*, 3rd ed. (Fields BN, Knipe BM, Howley PM, eds), Lippincott-Raven, Philadelphia. p. 961-1034.

Monath TP 1997. Epidemiology of Yellow Fever: current status and speculations on future trends. In Salluzo JF, Dodet B. *Factors in the emergence of arbovirus diseases*. Elsevier, Paris, France, p. 143-1566.

Monath TP, Tsai TF 1997. Flaviviruses. In Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. *Clin Virol* Churchill Livingstone Inc. p.1183-85.

Moreno-Altamirano MMB, Sanchez-Garcia FJ, Munoz ML 2002. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol.* 183: 1123-30.

Mousson L, Vazeille M, Chawprom S, Prajakwong S, Rodhain F, Failloux AB 2002. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Chinag Mai (Thailand) and relation with dengue transmission. *Trop Med Int Health.* 7: 865-72.

Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A 1998. Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett.* 168: 251-58.

Nasci RS, Miller BR 1996. Culicine mosquitoes and the agents they transmit. In *Biology of Disease Vectors*. (Marquardt WC, Beaty BJ eds.) University Press of Colorado, p. 85-97.

Nayar JK, Rosen L, Knight JW 1986. Experimental vertical transmission of Saint Louis encephalitis virus by Florida mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 35: 1296-301.

Neto FC, Dibo MR, Anália A, Barbosa C, Battigaglia M 2002. *Aedes albopictus* (S) na região de São José do Rio Preto, SP: estudo da sua infestação em área já ocupada pelo *Aedes aegypti*

e discussão de seu papel como possível vetor de dengue e febre amarela. Rev Soc Brasileira de Med Trop. 35: 351-57.

Neves DP, Silva JE 1989. Entomologia médica: comportamento, captura e montagem. Coopmed Editora, Belo Horizonte, 112 pp.

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MF, Farias Filho JD 1988. Virological study of dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 83: 219-25.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe EI, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 85: 253.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96: 925-26.

Osanaí CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos AC, Tauil PL 1983. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Rev Inst Med Trop S. Paulo. 25: 53-4.

PanAmerican Health Organization. Disponível em: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2006.htm>> Acesso em 01 de março de 2007.

Pinheiro VC, Tadei WP, Barros PM, Vasconcelos PF, Cruz AC 2005. Detection of dengue vírus serotype 3 by reverse-transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. Mem Inst Oswaldo Cruz 100: 833-9.

Prefeitura da Cidade Universitária Zeferino Vaz. Disponível em: www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/CA/DENGUE/AEDES2.gif> Acesso em 01 de março de 2007.

Ramos-Castaneda J, Imbert JL, Barron BL, Ramos C 1997. A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. J Neurovirol. 3: 435-40.

- Rêbello JMM, Costa JML, Silva FS, Pereira YNO, Silva JM 1999. Distribuição de *Aedes egypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 15: 477-86.
- Rice CM 1996. Flaviviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 3rd ed. (Fields NB, Knipe DM, Howley PM eds), Lippincott-Raven, Philadelphia. p.931-59.
- Richardson J, Molina-Cruz A, Salazar MI, Black IV W 2006. Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes egypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 74: 132-141.
- Rico-Hesse R 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174: 479-93.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244–251.
- Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter R, Sanders EJ, Vorndam AV 1998. Dengue and Dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*. 352: 971-77.
- Romoser WS 1996. The vector alimentary system. In *Biology of Disease Vectors*. (Marquardt WC, Beaty BJ eds.) University Press of Colorado, p. 298–317.
- Romoser WS, Wasieloski LP Jr., Pushko P, Kondig JP, Lerdthusnee K, Neira M, Ludwig GV 2004. Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. *J Med Entomol*. 41: 467-75.
- Rosen L, Tesh RB, Lien JC, Cross JH 1978. Transovarial transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes. *Science* 199: 909.
- Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC 1983. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes egypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 32: 1108-19.

Rosen L 1987. Mechanism of vertical transmission of dengue virus in mosquitoes. C R Acad Sc III. 304: 347-0.

Rosen L, Lien JC, Shroyer DA, Baker RH, Lu LC 1989. Experimental vertical transmission of Japanese encephalitis virus by *Culex tritaeniorhynchus* and other mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 40: 548-56.

Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF 1996. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen positive stromal cells. Am J Trop Med Hyg. 54: 503-10.

Rudnik A 1967. *Aedes aegypti* and Haemorrhagic Fever. Bull Wld Hlth Org. 36: 528-32.

Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ 1964. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. Mosquito News. 24: 407-19.

Saejung W, Puttikhunt C, Prommool T, Sojikul P, Tanaka R, Fujiyama K, Malasit P, Seki T 2006. Enhancement of recombinant soluble dengue virus 2 envelope domain III protein production in *Escherichia coli* trxB and gor double mutant. J Biosci Bioeng. 102: 333-9.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiology 7:9.

Schoepp RJ, Beaty BJ, Eckels KH 1991. Infection of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue parent and progeny candidate vaccine viruses: a possible marker of human attenuation. Am J Trop Med Hyg. 45: 202-10.

Severson DW, Knudson DL, Soares MB, Loftus BJ 2004. *Aedes aegypti* genomics. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 34: 715-21.

Sieburth PJ, Nunamaker CE, Ellis J, Nunamaker RA 1991. Infection of the midgut of *Cricotus v. rippennis* (Diptera: Ceratoponidae) with bluetongue virus. J Med Entomol. 28: 74-85.

Simpson DH. Arboviruses. In: Cook G, ed. Manson's Tropical Diseases. London: Saunders, 1996.

Solomon T, Mallewa M 2001. Dengue and other emerging Flaviviruses. Journal of Infection. 42: 104-15.

Tesh RB, Rosen L, Beaty BJ, Aitken THG 1977. Studies of transovarial transmission of yellow fever and Japanese encephalitis viruses in *Aedes* mosquitoes and their implications for the epidemiology of dengue. Dengue in the Caribbean. 179-2.

Tesh RB 1980. Experimental studies on the transovarial transmission of Kunjin and San Angelo viruses in mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 29: 657-66.

Tesh RB, Cornet M 1981. The location of San Angelo virus in developing ovaries of transovarially infected *Aedes triseriatus* mosquitoes as revealed by fluorescent antibody technique. Am J Trop Med Hyg. 30: 212-8.

The Daily Californian. Disponível em: www.dailycal.org/printable.php?id=7167> Acesso em 01 de março de 2007.

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

Turell MJ, Gargan II TP, Bailey CL 1985. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) morbidity and mortality associated with Rift Valley fever virus infection. J Med Entomol. 22: 332-37.

Urdaneta L, Herrera F, Pernalet M, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Barrios R, Rivero J, Comach G, Jiménez M, Salcedo M 2005. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. Infection, Genetics and Evolution 5: 177-4.

Weaver SC, Scott TW, Lorenz LH, Lerdthusnee K, Romoser WS 1988. Togavirus-associated pathologic changes in the midgut of a natural mosquito vector. J Virol 62: 2083-90.

Weaver SC, Lorenz LH, Scott TW 1992. Pathologic changes in the midgut of *Culex tarsalis* following infection with western equine encephalomyelitis virus. Am J Trop Med Hyg. 47: 691-01.

Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Chene P, Vasudevan SG, Lescar J 2005. Structure of the dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. J Virol. 79: 10278-88.

Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ 1980. Estimation of infection rates in population of organisms using pools of variable size. A, J Epidemiol. 112: 124-8.

Wikipédia. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Aedes_aegypti> Acesso em 01 de março de 2007.

Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ 1996. Natural cycles of vector-borne pathogens. In Biology of Disease Vectors. (Marquardt WC, Beaty BJ eds.) University Press of Colorado, p. 51–72.

8 - APÊNDICE

8.1 - Artigo *in press* na revista 'Virus Reviews and Research'

Campanelli ES, Botelho ACC, Souza KPR, Secundino NFC, Cecílio AB, Pimenta PFP 2006.
Dengue-2 virus artificial infection of a Brazilian colonized *Aedes aegypti*.

**DENGUE-2 VIRUS ARTIFICIAL INFECTION OF A BRAZILIAN COLONIZED
*Aedes Aegypti***

Eliane S. Campanelli¹;

Ana Cristina C. Botelho¹;

Kátia P. R. Souza²;

Nágila F. C. Secundino¹;

Alzira B. Cecílio²;

Paulo F. P. Pimenta¹

¹Laboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais

²Laboratory of Molecular Virology, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Paulo Filemon Paolucci Pimenta. Laboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Avenida Augusto de Lima, 1715, 30190-002 – Belo Horizonte, MG, Brazil.

Tel: +5531 3349 7735

Fax: +5531 3295 3115

E-mail: pimenta@cpqrr.fiocruz.br

KEY WORDS: *Aedes aegypti*, dengue virus 2, artificial dengue infection, vector competence

ABSTRACT

Dengue is a viral disease transmitted by mosquitoes and caused by four viral serotypes (DENV 1-4). This mosquito-borne disease is a major public health problem and a threat to more than 2.5 billion people, who live in endemic areas. *Aedes aegypti* is the primary vector of dengue in the Americas. The present study shows the susceptibility of a colony strain of *A. aegypti* to Dengue 2 virus (DENV-2). *A. aegypti* females from a laboratory colony were infected with DENV-2 using a membrane feeding technique. The engorged females were dissected in different days (3, 6, 9, 12 and 15). The midguts, ovaries, carcasses and heads were separated. The samples were fixed and immunolabeled with anti-DENV-2 antibody to be analyzed by laser confocal microscopy (LCM). Infected mosquitoes from the 15th day had their heads and bodies dissected, separated and analyzed by RT-PCR with specific primers. Immunolabeling of the midguts and ovaries showed the presence of DENV-2 in the mosquitoes dissected from the third day until the last day of the experiment. The RT-PCR reactions of the heads and the bodies confirmed the mosquito infection with DENV-2. These results showed that the methodology used for the artificial infection with dengue virus was successful and demonstrated that our colonized *A. aegypti* mosquitoes were susceptible to artificial dengue infection. Future studies are in progress to better understand the process of invasion by dengue virus in *Aedes* mosquito.

INTRODUCTION

Dengue viruses (genus *Flavivirus*, family Flaviviridae) are the most important arboviruses affecting humans. There are four distinct serotypes of dengue viruses (DENV 1-4) that co-circulate in many tropical regions of the world (Rigau-Perez et al. 1998). Dengue viruses are a threat to more than 2.5 billion people (WHO 2002). Recently, in Brazil, three of the four serotypes are present in the majority of the country and the vector, *Aedes (triseriatus) aegypti* (Linnaeus, 1762), is spread throughout the country (SVS 2005, Schatzmayr 2000).

Arboviruses are naturally maintained in cycles by hematophagous arthropods that biologically transmit the virus between vertebrate hosts (Woodring et al. 1996). The most common vector of dengue fever is *A. aegypti* (Gubler 2002), a container-breeding mosquito that has adapted to cohabitation with humans and has a cosmopolitan distribution in tropical and subtropical areas (Bennett et al. 2002).

Vector competence is defined as the intrinsic permissiveness of a vector to infection, replication and transmission of a virus (Hardy 1988, Woodring et al. 1996). Studies have shown that *A. aegypti* exhibits continuous variation in its competence to transmit flaviviruses (Black IV et al. 2002, Severson et al. 2004, Gorrochotegui-Escalante et al. 2005). As the susceptibility varies among mosquito strains, it is important to evaluate the competence of these vectors in each epidemic and endemic area (Chen et al. 1993).

In this work the oral susceptibility of a colony strain of *A. aegypti* to infection with DENV-2 were experimentally tested. This study is the first step, in our laboratory, for establishing

artificial infection of the mosquitoes with the dengue virus. This strain of *A. egypti*, is going to act as a positive control when testing mosquitoes collected in the field.

MATERIAL AND METHODS

Mosquitoes – *A. egypti* mosquitoes (Campos dos Goytacases – Rio de Janeiro State strain) were obtained from a colony established and kept in the Laboratory of Medical Entomology, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz in the state of Minas Gerais. The mosquitoes were kept in an acclimated insectary with an average temperature of 26-28°C and relative air humidity around 70-80%, in a cycle of 12 hours in the dark and 12 hours in the light. The mosquitoes were provided with 10% glucose solution and water *ad libitum* until the time of experiments.

Virus strain – The virus strain used in the mosquito infection was DENV-2/SPH. This strain was isolated from a serum sample of a dengue hemorrhagic fever case in the city of Ribeirão Preto (São Paulo State) during 1991. To prepare stock viruses, frozen DENV-2 samples was amplified in C6/36 cells. The titer was determined by plaque-forming units on LLC-MK₂ cells and the titer was 4×10^4 .

Oral infection of mosquitoes - Two hundred five-day-old *A. egypti* females were deprived of sucrose solution 24 hours before the experiments. Then, they were allowed to feed through a chick-skin membrane in a glass feeder apparatus heated by circulating water at 37°C during 1 hour (Rutledge et al. 1964, Billingsley & Rudin 1992). The infected blood meal was constituted of two-thirds of heat-inactivated heparinized mouse blood mixed with one-third of virus-infected C6/36 cells and adenosine triphosphate as a phagostimulant. The engorged

females were preserved in cages at 28°C and provided with 10% glucose solution, for extrinsic incubation of the virus.

Mosquito dissection - At days 3, 6, 9, 12 and 15 after the artificial feeding, females were: 1) anesthetized on ice for 3 minutes; 2) dissected in phosphate buffer solution (PBS, pH 7,2); 3) midguts, ovaries, carcasses and heads were separated and stored until use.

Immunolabeling for Dengue Virus - The samples dissected were fixed in 4% formaldehyde for 2 hours at 4°C. The fixed-samples were washed three times with PBS, incubated in RPMI medium for 2 hours, then with PBS/bovine serum albumin (BSA)/Triton and finally with anti-DENV-2 antibody overnight. Afterwards, the samples were washed three times with PBS/BSA/Triton. Subsequently the samples were incubated with a FITC secondary antibody for 2 hours. After this procedure, samples were washed three times in PBS/BSA/Triton and then three times with PBS. The samples were mounted with anti-fading medium (Mowiol) and observed under Laser Confocal Microscopy (LCM).

Detection of the viral RNA using RT-PCR - On the 15th day post infection, females had their bodies and heads separated and the viral RNA was extracted using a silica methodology (Boom et al. 1990). RT-PCR for detection of dengue virus was performed according to Lanciotti et al. (1992). Briefly, after reverse transcription, the cDNA was used in a first PCR and a subsequent semi-nested PCR reaction was completed in order to confirm the dengue virus serotype. PCR products were visualized on 8% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with a positive control of DENV-2 and stained with silver nitrate.

RESULTS

The *A. egypti* females fed successfully on a blood meal containing the virus and infected C6/36 cells (Figures 1 and 2). The presence of the virus in the samples was observed using RT-PCR and Laser Confocal Microscopy.

The samples analyzed under the Laser Confocal Microscopy showed infection after the contagious blood meal. On the 3rd day post infection, midgut (Figures 3 and 4) and ovary (Figures 5 and 6) were positive for dengue virus and this observation was confirmed until the last day of the experiment. The infection of the salivary glands (Figures 7 and 8) was observed only in the samples collected on the 15th day post infection.

The infection rate was defined as the percentage of mosquitoes that had both heads and bodies infected among all surviving engorged females. This rate was achieved by the analysis of mosquitoes through RT-PCR on the 15th day post infection. Sixty orally infected mosquitoes were tested for the presence of dengue viruses. From these mosquitoes, forty-five were positive for the dengue virus, with an infection rate of 75%.

DISCUSSION

The analysis of the material by LCM showed that the infection of the dengue virus in the midgut was not homogeneous. It was observed that only certain epithelial cells showed specific fluorescence characteristic of viral infection. Similar results were reported with *A. egypti* infected with DENV-1 (Chen et al. 1993), *Aedes albopictus* infected with DENV-2, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex pipiens* infected with Japanese encephalitis virus (Hardy et al. 1983) and *Culex icoides* or *riipennis* infected with blue tongue virus (Sieburth et al. 1991). Therefore, these infected cells may be subpopulations of cells acting as receptors for virus

dissemination from the midgut to the hemocoel . In addition, the amount of infected cells in the midgut could be related to mosquito competence.

It is known that the virus can replicate in tissues within the hemocoel only after passing the midgut barrier (Kuberski 1979, Hardy et al. 1983, Schoepp et al. 1991, Chen et al. 1993) and when this happens, virions disperse in circulating hemolymph and replicate in many tissues and organs, similar to the Rift Valley fever virus in *Culex pipiens* (Faran et al. 1988). The analysis of the *A. aegypti* reproductive organs showed the same pattern of infection visualized in the midgut. Viruses were detected in only one part of the ovaries (oocytes), suggesting that the infection is located in the follicular epithelium. Although verification of vertical transmission did not occur in this study, the detection of the virus in the ovaries suggests that these mosquitoes are capable of transmitting the virus to its progeny (Cecílio et al. 2004).

In addition, dengue virus infection was detected in the fat body (not shown) and in the salivary glands, demonstrating that this mosquito strain was susceptible to this virus strain. After the infection of the salivary glands, the virus must escape into the lumen of the gland, where it can be transmitted to vertebrates during a blood meal (Woodring et al. 1996). The presence of the virus in the salivary glands indicates that the virus is able to replicate within this organ. Even so, this fact does not allow us to affirm that the mosquitoes are capable to transmit the virus, because the saliva of these samples were not tested.

In order to confirm the infection and estimate the infection rate, the methodology chosen was RT-PCR for its high sensitivity and specificity. The infection rate obtained in our experiment was 75%. Lourenço-de-Oliveira et al. (2004) showed a variation on the infection rates towards DENV-2 of mosquitoes collected in different parts of Brazil (21,6% to 99,0%). When we compare these results to ours (75%) is it possible to say that our colony has a similar

behavior to other Brazilian mosquitoes towards DENV-2 infection. Although many authors suggest that the colonization process could affect the susceptibility of the mosquitoes to DENV infection (Leake 1984, Vazeille et al. 2003, Moncayo et al. 2004), this data is not yet confirmed.

According to our results, the methodology used for the artificial infection with dengue virus was successful. Moreover, the laser confocal microscopy presented itself as a great tool for visualization of the presence of DENV in different organs of *A. egypti*. Future studies are in process to better understand the invasion of the *Aedes* mosquito by dengue viruses.

ACKNOWLEDGMENTS

To CNPq, Capes, FIOCRUZ and FUNED for financial supports. To Juliana Martins, Sabrina Campolina and Tatiana Aguiar for technical assistance and to Denise Nacif Pimenta for the critical reviewing of the manuscript.

REFERENCES

1. Bennett KE; Olson KE; Munoz ML; Fernandez-Salas I; Farfan-Ale JA; Higgs S; Black IV WC; Beaty BJ 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes egypti* from Mexico and The United States. *A J rop Med yg* 67:85-92.
2. Billingsley PF; Rudin W 1992. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *P s odii* species. *J P r sito* 78:430-40.
3. Black IV WC; Bennett KE; Gorrochótegui-Escalante N; Barrilas-Mury CV; Fernandez-Salas I; Munoz ML; Farfan-Ale JA; Olson KE; Beaty BJ 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes egypti*. *Archives of Medic Rese rch* 33:379-388.

4. Boom R; Sol CJA; Salimans MMM; Jansen CL; Wertheim-Van PME; Van der Noordaa J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503.
5. Cecílio AB; Resende MC; Jorge FCM; Resende SM; Brito MG; Kroon EG 2004. Transovarial transmission of dengue virus 1 and 2 as showed by detection in *Aedes aegypti* larvae. *Insect Review & Research* 9:57-60.
6. Chen WJ; Wei HL; Hsu EL; Chen ER 1993. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to Dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. *J Med Entomol* 30:524-530.
7. Faran ME; Romoser WS; Routier RG; Bailey CL 1988. The distribution of Rift Valley virus in the mosquito *Culex pipiens* as revealed by viral titration of dissected organs and tissues. *Am J Trop Med Hyg* 39:206-213.
8. Gorrochotegui-Escalante N; Lozano-Fuentes S; Bennett KE; Molina-Cruz A; Beaty BJ; Black IV WC 2005. Association mapping of segregating sites in the early trypsin gene and susceptibility to dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35:771-788.
9. Gubler DJ 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2:100-103.
10. Hardy JL; Houk EJ; Kramer LD; Reeves WC 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviroses. *Annu Rev Entomol* 28:229-262.
11. Hardy JL 1988. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In: T.P. Monath (ed.) *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* CRC Press, pages. 87-126.
12. Kuberski TT 1979. Fluorescent antibody studies on the development of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 16:343-349.

13. Lanciotti RS; Calisher CH; Gubler DJ; Chang GJ; Vorndam AV 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:545-551.
14. Leake CJ 1984. The vector competence of colonized *Aedes (tegoyi) theinensis* for dengue-2 virus. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 78:829-832.
15. Lourenço-de-Oliveira R; Vazeille M; Filippis AMB; Failloux AB 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 98:43-54.
16. Moncayo AC; Fernandez Z; Ortiz D; Diallo M; Sall A; Hartman S; Davis CT; Coffey L; Mathiot CC; Tesh RB; Weaver SC 2004. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. *Emerging Infectious Diseases* 10:1790-1796.
17. Rigau-Perez JG; Clark GG; Gubler DJ; Reiter P; Sanders EJ; Vorndam AV 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 353:971-977.
18. Rutledge LC; Ward RA; Gould DJ 1964. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News* 24:407-419.
19. Schatzmayr HG 2000. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Medical and Veterinary Entomology* 95:179-181.
20. Schoepp RJ; Beaty BJ; Eckels KH 1991. Infection of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue parent and progeny candidate vaccine viruses: a possible marker of human attenuation. *Am J Trop Med Hyg* 45:202-210.
21. Severson DW; Knudson DL, Soares MB; Loftus BJ 2004. *Aedes aegypti* genomics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:715-721.
22. Sieburth PJ; Nunamaker CE; Ellis J; Nunamaker RA 1991. Infection of the midgut of *Glycicoides v. riipennis* (Diptera: Ceratoponidae) with bluetongue virus. *J Med Entomol* 28:74-85.

23. SVS 2005. Dengue - Boletim da semana 49 / 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil.
24. WHO 2002. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fat sheet No. 117. World Health Organization, Geneva.
25. Woodring JL; Higgs S; Beaty BJ 1996. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: W.C. Marquardt; B.J. Beaty (eds.) *Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, pages. 51-72.
26. Vazeille M; Rosen L; Mousson L; Failloux AB 2003. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68:203-208.

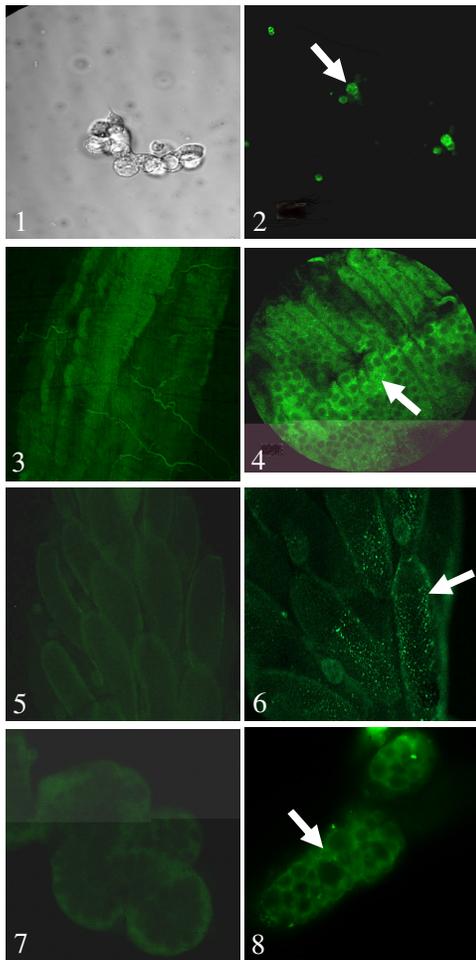


PLATE 1.

Fig. 1 - Infected C6/36 cells. Vision of the sincicium, a characteristic of cells infected with dengue virus by interferential contrast. **Fig. 2** - Cells infected with dengue virus. The viral particles (arrows) are surrounding the nucleus of the cells. **Fig. 3** - Midgut negative control - Midgut without dengue infection. The mosquito midgut presents self-fluorescence. **Fig. 4** - Positive Midgut on the third day post infection. The bright points (arrow) are the fluorescence characteristic of viral infection. **Fig. 5** - Ovary negative control - Ovary without dengue infection. The mosquito ovary presents self-fluorescence. **Fig. 6** - Positive Ovary on the sixth day post infection. The bright points (arrow) are the viral particles. **Fig. 7** - Salivary gland negative control – Salivary gland without dengue infection. **Fig. 8** - Positive Salivary gland. The bright points (arrow) are the fluorescence characteristic of viral infection.

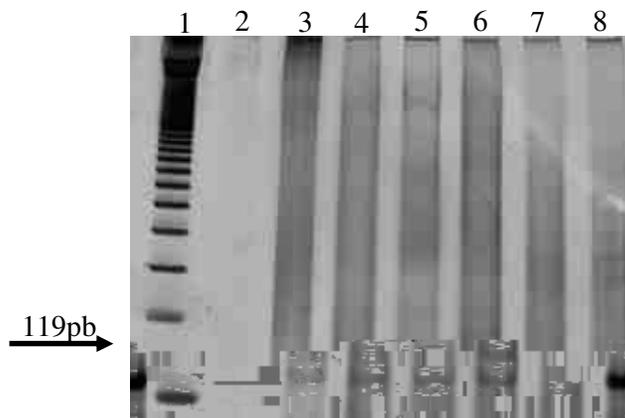


Plate 2.

Fig. 9 - Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE 8%) of PCR products of C/PrM junction. Lanes: 1- ladder (100bp); 2- negative control; 3- positive head sample; 4- positive head sample; 5- positive body sample; 6- positive body sample; 7- negative body sample; 8- positive DENV-2 control (119bp).