

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

Diferenças na variação da competência vetorial entre nove populações de *Aedes aegypti* do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue virus 2*.

por

Caroline Macedo Gonçalves

**Belo Horizonte
Julho/2014**

TESE DBCM-CPqRR

C.M. GONÇALVES

2014

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

Diferenças na variação da competência vetorial entre nove populações de *Aedes aegypti* do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue virus 2*.

por

Caroline Macedo Gonçalves

**Tese apresentada com vistas à obtenção
do título de Doutor em Ciências na área
de concentração Biologia Celular e
Molecular.**

Orientação: Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Belo Horizonte
Julho/2014

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

G635d
2014

Gonçalves, Caroline Macedo.

Diferenças na variação da competência vetorial entre nove populações de *Aedes aegypti* do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue virus 2* / Caroline Macedo Gonçalves. – Belo Horizonte, 2014.

XIX, 64 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 74 - 83

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

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

CDD – 22. ed. – 616.918 52

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

Diferenças na variação da competência vetorial entre nove populações de *Aedes aegypti* do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue virus 2*.

por

Caroline Macedo Gonçalves

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Presidente)

Dr. Edelberto Santos Dias

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Dr. Wuelton Monteiro Marcelo

Dra. Betânia Paiva Drumond

Tese defendida e aprovada em 18/07/2014

Colaboradores

Secretaria Municipal de Saúde – SMS

Dr. José Eduardo Marques Pessanha

Apoio

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

Suporte Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional Pesquisa (CNPq)

Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEMIG)

PRONEX

Fundação Bill e Melinda Gates

Dedico com todo amor

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

Agradecimentos

A Deus pelo refúgio, coragem e força.

Ao orientador Dr. Paulo Pimenta pela oportunidade, orientação, confiança e ensinamentos nestes dez anos de LEM.

Ao Dr. Breno Mello por todos os ensinamentos e grande ajuda sempre.

A Dra. Nágila Secundino pelo apoio, ensinamentos e sugestões.

Ao amigo Dr. Fabrício Melo pela grande ajuda na produção do artigo científico e sugestões na correção desta tese.

Aos amigos Dr. Gustavo Martins e Dr. Nilton Barnabé por contribuírem com sugestões na banca da minha qualificação.

As amigas do grupo dengue, em especial: Helena Rocha, Luciana Pinto e Luiza Prado pela grande ajuda nos experimentos.

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

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

As secretárias Roberta, Fernanda e Andrea pela ajuda e suporte.

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

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

Aos amigos de Curvelo, em especial a Ícaro, Arthur, Amanda, Aline, Sofia, Geralda (Gel) e a galera da *Marechal Lott*, que sempre torcerem por minhas conquistas e pela amizade de tantos anos.

Aos amigos adquiridos ao longo de tantos anos em BH, em especial a Azza, Helena, Dani Zile, Luciana Pinto, Grasi, Fernando, Matheus, Dona Ligia, Júnior, Janaina, Leleco, Lucas, Mônica, Letícia, Cleber, Jefferson e a turma da Ibirati que me receberam tão bem e sempre torceram por mim.

Aos meus pais, Marilene e Pedro Paulo, ao meu irmão Bruno, a Wandinha, e aos familiares, em especial: as tias Lourdes, Gisca, Ângela e Sandra e as primas Fernanda, Sara e Solange pela força, incentivo e por acreditarem em mim.

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

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

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

Sumário

Lista de figuras	XII
Lista de quadro	XIV
Lista de abreviaturas e símbolos	XV
Resumo	XVIII
Abstract	XI X
1 Introdução	20
1.1 Histórico	20
1.2 A Doença	21
1.2.1 Relevância	21
1.2.2 Dengue no Brasil	23
1.2.3 Situação atual da Dengue em Minas Gerais	24
1.2.4 Dengue e seu controle em Belo Horizonte	25
1.2.5 Manifestações Clínicas	27
1.3 Ciclo de transmissão	28
1.4 Controle e Prevenção	29
1.5 O Vetor	30
1.5.1 Vetor primário: <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> - Linnaeus, 1762	30
1.5.2 Vetor secundário: <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> – Skuse, 1894	31
1.5.3 Biologia do vetor	32
1.6 Agente etiológico	33
1.6.1 Gênero <i>Flavivirus</i>	33
1.6.2 <i>Dengue virus</i>	35
1.6.3 Ciclo multiplicativo	37
1.6.4 Infecção do DENV no mosquito vetor	38
1.7 Transmissão transovariana	39
1.8 Competência e Capacidade vetorial	39
2 Justificativa	42
3 Objetivos	43
3.1 Objetivo geral	43

3.2	Objetivos específicos -----	43
4	Métodos -----	44
4.1	Competência Vetorial -----	44
4.1.1	Área de estudo e manutenção das populações de mosquitos -----	44
4.1.2	Células e vírus -----	45
4.1.2.1	Células C6/36 -----	45
4.1.2.2	Vírus -----	46
4.1.3	Multiplicação viral -----	46
4.1.4	Titulação viral -----	46
4.1.5	Infecção dos mosquitos -----	47
4.1.6	Dissecção dos mosquitos -----	48
4.1.7	Extração de RNA -----	48
4.1.8	Transcrição Reversa - PCR em Tempo Rea-----	49
4.1.9	Análise da transmissão vertical natural -----	49
4.1.10	Análise da competência vetorial -----	50
4.1.11	Análise estatística -----	50
5	Resultados -----	51
5.1	Determinação da taxa de transmissão vertical natural do DENV nas populações estudadas -----	51
5.2	Caracterização das taxas de infecção do intestino (IR), taxa de infecção disseminada (DIR) e competência vetorial (CV) da cidade de Belo Horizonte, nos anos de 2009 e 2011 -----	51
5.3	Análise comparativa da taxa de infecção, taxa de infecção disseminada e da competência vetorial entre as populações de mosquitos das nove regionais de Belo Horizonte, nos anos de 2009 e 2011 -----	52
5.3.1	Taxa de infecção do intestino médio - IR - (proporção de corpos infectados com DENV pelo número total de mosquitos analisados) -----	52
5.3.2	Competência Vetorial - CV - (proporção de DENV nas cabeças pelo total de mosquitos analisados) -----	53

5.3.3-Taxa de infecção disseminada do intestino médio – DIR - (proporção de cabeças infectadas com DENV pelo número de mosquitos com os corpos infectados com DENV) -----	53
5.4 Análises estatísticas da taxa de infecção, taxa de infecção disseminada e competência vetorial das populações de <i>A. aegypti</i> das nove regionais de Belo Horizonte, nos anos de 2009 e 2011 -----	56
6 Discussão -----	58
7 Conclusões -----	64
8 Anexo -----	65
8.1 Artigo -----	65
9 Referências Bibliográficas -----	74

Lista de figuras

Figura 1: Emergência da febre do dengue e da febre hemorrágica do dengue após a década de 60-----	21
Figura 2: Distribuição mundial da dengue e do vetor <i>A. aegypti</i> no mundo em 2013. Área em azul no mapa: área com risco contínuo de transmissão de dengue pela presença do vetor. Ponto em vermelho: locais onde há casos da doença..-----	22
Figura 3: Pirâmide representando as doenças causadas pelas infecções de dengue e organizada segundo o grau de gravidade -----	27
Figura 4: Ciclo de transmissão do <i>Dengue virus</i> -----	29
Figura 5: Fotografia do <i>Aedes aegypti</i> -----	30
Figura 6: Fotografia do <i>Aedes albopictus</i> -----	32
Figura 7: Desenho esquemático mostrando os estágios de desenvolvimento do <i>A. aegypti</i> -----	32
Figura 8: Desenho esquemático mostrando a partícula viral. Diagrama mostrando regiões do genoma dos <i>Flavivirus</i> codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais. O polipeptídio é processado em três proteínas estruturais (C, proteína do nucleocapsídeo; M, proteína associada à membrana; e E a proteína do envelope) -----	34
Figura 9: Esquema do <i>Dengue virus</i> maduro -----	36
Figura 10: Estrutura e expressão do genoma dos <i>Flavivirus</i> . A. Estrutura do genoma e elementos do RNA. B. Processamento da poliproteína e genes estruturais e não-estruturais. C. Topologia da poliproteína na membrana -----	36

Figura 11: Ciclo de multiplicação dos *Flavivirus* ----- 37

Figura 12: Etapas necessárias para a infecção por *Flavivirus* e transmissão pelo vetor. As letras indicam os locais de desenvolvimento viral e as setas indicam o caminho percorrido pelo vírus dentro do inseto. Após a ingestão de sangue infectado (A) os vírus entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se replicam e deixam estas células alcançando a hemolinfa (E) e posteriormente, podem infectar e se replicar em outros órgãos do inseto como, por exemplo, as glândulas salivares (H), onde, durante um novo repasto sanguíneo, podem infectar um hospedeiro susceptível. Neste desenho as seguintes letras indicam: (B) intestino médio (C) matriz peritrófica e (F) os túbulos de Malpighi----- 38

Figura 13: Barreiras naturais à infecção pelo *Dengue virus*. IM = intestino médio --- 40

Figura 14: Mapa da cidade de Belo Horizonte ilustrando a localização das armadilhas para oviposição (APO's) distribuídas em pontos pré-determinados, em cada uma das regionais estudadas.----- 45

Figura 15: Desenho esquemático da placa de titulação. Legenda: PBS (azul), controle (CO) não infectado (laranja) e diluições seriadas de vírus (rosa). ----- 47

Figura 16: Avaliação das taxa de infecção, da taxa de disseminação e da competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte, MG, infectadas com DENV-2, nos anos de 2009 e 2011. ----- 52

Figura 17: Mapa esquemático da cidade de Belo Horizonte mostrando gráficos comparativos de IR, DIR e da competência vetorial das populações de *A. aegypti* nos anos de 2009 e 2011. ----- 55

Lista de quadro

QUADRO I: DETALHES DAS TAXAS DE IR, CV E DIR DAS NOVE REGIONAIS DE BELO HORIZONTE ----- 57

Lista de abreviaturas e símbolos

%: porcentagem

μL: microlitros

μg: micrograma

≤: menor e igual

≥: maior e igual

°C: graus Celsius

Å: angstrom

AMOVA: análise de variância molecular

APO: armadilhas para oviposição

cDNA: DNA complementar

CG: complexo de glogi

cm²: centrímetro quadrado

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

Ct: ciclo *threshold*

CV: competência vetorial

DENV: *Dengue virus*

DENV-1: *Dengue virus 1*

DENV-2: *Dengue virus 2*

DENV-3: *Dengue virus 3*

DENV-4: *Dengue virus 4*

DI: disseminação no intestino

DIR: taxa de disseminação do intestino

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatos

DS: Distritos Sanitários

F1: primeira filial (geração F1)

FD: Febre do dengue

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IM: infecção do intestino médio
IR: Taxa de infecção do intestino médio
JEV: vírus da encefalite japonesa
Kb: quilobase
Km²: quilômetro quadrado
L15: meio Leibowitz-15
LEM: Laboratório de Entomologia Médica
LIRAA: Levantamento Rápido de Índices de Infestação para *A. aegypti*.
MEB: barreira de escape do intestino médio
MG: Minas Gerais
MIB: barreira do intestino médio
MIR: taxa de infecção do intestino
mL: mililitros
mm: milímetros
mmHg: milímetro de mercúrio
nm: nanômetro
NS: proteína não estrutural
OMS: Organização Mundial de Saúde
pb: pares de base
PBH: Prefeitura de Belo Horizonte
PBS: tampão fosfato salina
PCR: reação em cadeia da polimerase
PIE: período de incubação extrínseco
Proteína prM: proteína precursora da membrana
Proteína C: proteína do capsídeo
Proteína E: proteína do envelope
Proteína M: proteína da membrana
RE: retículo endoplasmático
RNA: ácido ribonucleico
RT: transcrição reversa
RT-PCR: transcrição reversa- real time em reação em cadeia da polimerase
RVFV: vírus da febre do *Rift Valley*
SCD: Síndrome de Choque por Dengue
SES-MG: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais

SFB: soro fetal bovino

SLEV: vírus da encefalite de *Saint Louis*

SMS-BH: Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte

SP: São Paulo

SVS-MS: Sistema de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde

TBEV: vírus da encefalite causada por carrapatos

TCID50: dose (50) infectante de cultura de tecido

TE: tampão de eluição

U: unidade

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WHO: World Health Organization

WNV: Vírus *West Nile*

YFV: Vírus da febre amarela

Resumo

No Brasil, as epidemias de dengue ainda estão difundidas por todo o país. Além da falta de conhecimento de como os surtos da doença são capazes de iniciar e sustentar o seu ciclo de transmissão, existem poucos estudos avaliando a habilidade das populações brasileiras de *A. aegypti* para transmitir o vírus. O objetivo do nosso estudo foi comparar a susceptibilidade de *A. aegypti* capturados nas nove regionais de Belo Horizonte, ao DENV-2, nos anos de 2009 e 2011. Para tal finalidade, parâmetros como a taxa de infecção (IR), competência vetorial (CV) e a taxa de infecção disseminada (DIR) foram determinadas. Os ovos dos *A. aegypti* de cada regional foram coletadas separadamente e colonizados em um insetário. As fêmeas adultas foram infectadas experimentalmente com DENV-2 e o vírus foi detectado através da RT-qPCR nas amostras dos corpos e cabeças dos mosquitos. Os dados foram analisados através do programa estatístico *Social Sciences* – versão 17. A IR variou de 40% a 82,5% em 2009 e de 60% a 100% em 2011. A CV variou de 25% a 77,5% em 2009 e de 25% a 80% em 2011. Já a DIR oscilou de 68,7% a 100% em 2009 e 38,4% a 86,8% em 2011. Os resultados foram avaliados por um modelo logístico utilizando IR como co-variável. Em 2009, as regionais Norte, Barreiro, Centro-Sul e Venda Nova mostraram uma forte associação. Em 2011, uma forte associação foi observada entre as regionais Centro-Sul, Venda Nova, Oeste e Nordeste. Utilizando a competência vetorial com co-variável, em 2009, as regionais Centro-Sul e Venda Nova apresentaram associação mais relevante. Já em 2011, as regionais Centro-Sul, Venda Nova e Barreiro apresentaram associação significativa. Quando os dados de DIR foram analisados pelos modelos de regressão logística, Pampulha, Centro-Sul, Venda Nova, Oeste, Nordeste e Leste (2009), bem como, Centro-Sul, Venda Nova e Oeste (2011) foram as regionais que apresentaram a associação mais forte. Concluí-se que as populações de *A. aegypti* de Belo Horizonte exibiram ampla variação na sua competência vetorial para transmitir DENV-2. Por isso, dados e estratégias de controle do vetor, de cada uma das regionais, precisam estar disponíveis para os órgãos competentes. Análises futuras precisam ser desenvolvidas para um melhor entendimento das razões pelas quais ocorre esta grande variabilidade na CV e como estes parâmetros se correlacionam com os achados epidemiológicos dos anos seguintes.

Abstract

In Brazil, dengue epidemics are still diffusing throughout the country and it is unclear if outbreaks may initiate a sustainable transmission cycle. There are few studies evaluating the ability of Brazilian *Aedes aegypti* populations to transmit the virus. The aim of this study was to compare the DENV susceptibility of field-captured *Ae. aegypti* populations from nine distinct geographic areas of the city of Belo Horizonte in 2009 and 2011. Parameters as Infection Rate (IR), Vector Competence (VC) and Disseminated Infection rate (DIR) were determined. *Aedes aegypti* eggs from each region were separately collected and hatched in an insectary. Adult females were experimentally infected with DENV-2 and the virus was detected by qPCR in body and head samples. Data were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences version 17. IR varied from 40% to 82.5% in 2009 and 60% to 100% in 2011. VC ranged from 25% to 77.5% in 2009 and 25% to 80% in 2011. DIR oscillated from 68.7% to 100% in 2009 and 38.4% to 86.8 in 2011. The results were evaluated by a logistic model using IR as covariate. In 2009, North, Barreiro, Central South and Venda Nova showed the strongest association. In 2011, the same was observed for Central South, Venda Nova, West and Northeast regions. Using VC as covariate, in 2009, Central South and Venda Nova showed the most relevant association. In 2011, Central South, Venda Nova and Barreiro presented the most revelation association. When DIR data were analyzed by logistic regression models, Pampulha, Central South, Venda Nova, West, Northeast and East (2009) as well as Central South, Venda Nova and West (2011) were the districts showing the strongest association. We conclude that *A. aegypti* populations from Belo Horizonte exhibit wide variation in vector competence to transmit dengue. Because of it, vector control strategies should match the available data for each region. Further analysis should be conducted to better understand the reasons for this large variability of vector competence and how these parameters correlate with epidemiological findings in the following years.

1 Introdução

1.1 Histórico

Os primeiros registros encontrados sobre os sintomas semelhantes à “dengue atual” foram descritos na enciclopédia chinesa publicada durante a Dinastia da China Jin (265 a 420 D.C.). A doença foi chamada de “veneno da água” pelos chineses, pois suspeitavam que ela estivesse relacionada com insetos associados à água. (Howe GM, 1977 e Gubler DJ, 1998). Mais tarde, ao final do século XVIII, surgiram relatos de uma enfermidade semelhante à dengue. Estes foram descritos simultaneamente em 1779 em três distintos continentes: Batávia (Indonésia- Ásia), Cairo (Egito- África) e Filadélfia (Estados Unidos da América- Américas). Tais fatos indicam que tanto o *Dengue virus* (DENV), quanto o mosquito vetor já apresentavam uma distribuição mundial na região dos trópicos há mais de duzentos anos (Henchal EA e Putnak JR, 1990).

Nas Américas, o DENV circulou desde o século XIX até as primeiras décadas do século XX. Na década de 50 ocorreu um silêncio epidemiológico, registrando-se nos anos 60 a reintrodução dos sorotipos 2 e 3, associada à ocorrência de várias epidemias de dengue clássico. Em 1963, foram detectados os primeiros casos de DENV-3 na Jamaica, que depois se disseminou para a Martinica, Curaçau, Antigua, Saint Kitts, Sanguilla e Porto Rico (Ministério da Saúde, 2009).

Já nas décadas seguintes de 80 e 90 os casos da febre hemorrágica do dengue (FHD) se intensificaram, ocorrendo uma expansão territorial do vetor e do vírus (Gubler DJ, 1998; Gubler DJ e Clark GG, 1995). A distribuição da doença, neste período, pode ser observada na figura 1.

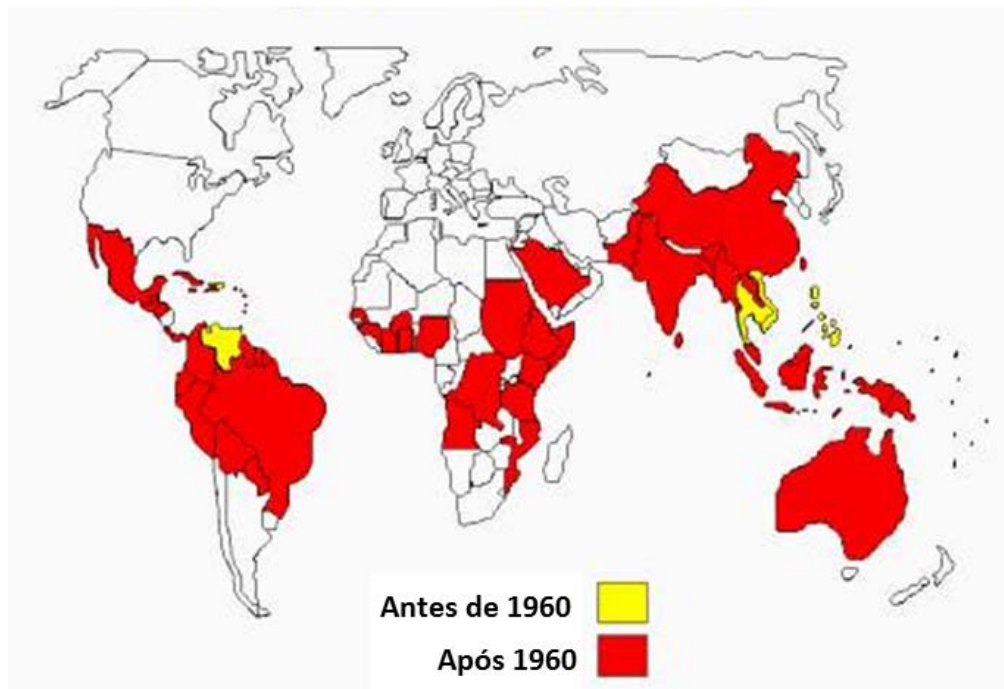


Figura 1: Emergência da febre do dengue e da febre hemorrágica do dengue após a década de 60 (WHO, 2009).

O evento epidemiológico mais relevante na história da dengue nas Américas foi à epidemia de FHD/SCD (síndrome do choque do dengue) que ocorreu em Cuba, no ano de 1981. O DENV-2 estava associado a essa epidemia que foi precedida por outra, causada pelo DENV-1, em 1977. No ano de 1982, Cuba implantou um programa de erradicação do *Aedes aegypti* e manteve índices de infestação próximos à zero até os primeiros anos da década de 90. Entretanto, em 1997 uma nova epidemia foi documentada na província de Santiago de Cuba (Brasil, 2009).

1.2 A Doença

1.2.1 Relevância

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

mais importantes arboviroses que atinge o homem (Holmes EC *et al.*, 1998 e Teixeira MG, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco de contrair dengue no mundo e que anualmente 50-100 milhões de pessoas se infectam, com cerca de 500 mil casos de FHD com 21 mil óbitos, principalmente de crianças (WHO, 2013).

A dengue está distribuída por todo o mundo atingindo regiões tropicais e subtropicais em associação com o mosquito vetor, o *A. aegypti*, predominando em áreas urbanas, semi-urbanas e também em áreas rurais (Mercado-Curiel RF *et al.*, 2008, Chaturvedi UC, 2006, Borges SMAA, 2001, Forattini OP, 1992). A figura 2 ilustra a distribuição mundial da dengue e do seu vetor, *A. aegypti*, no mundo em 2013.



Figura 2: Distribuição mundial da dengue e do vetor *A. aegypti* no mundo em 2013. Área em azul no mapa: área com risco contínuo de transmissão de dengue pela presença do vetor. Pontos em vermelho: locais onde há casos da doença (Fonte: <http://www.healthmap.org/dengue/pt>).

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

1.2.2 Dengue no Brasil

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

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

A propagação viral para o resto do país não se deu a partir desse episódio pelo fato de o mesmo ter sido rapidamente controlado e porque o *A. aegypti* ainda não estava distribuído extensivamente pelo território brasileiro. O vírus da dengue só reapareceu no Brasil cinco anos depois na cidade de Nova Iguaçu (Rio de Janeiro), com a identificação do sorotipo DENV-1. Conseqüentemente, a virose se disseminou para cidades vizinhas, Niterói, Rio de Janeiro e para o restante do país se tornando um problema nacional de saúde pública (Schatzmayr HG e Nogueira RMR, 1986). Devido às dificuldades de implantar-se um programa de controle do vetor efetivo nas grandes comunidades urbanas, houve uma rápida dispersão do vírus e uma explosão da epidemia em vários estados (Schatzmayr HG e Nogueira RMR, 1986).

Quatro anos mais tarde, em 1990, ocorreu a introdução do DENV-2, também no estado do Rio de Janeiro e a subsequente propagação para as outras regiões do país (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Ceará, Brasília, Roraima, Acre, Paraná, Amapá, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Ocorreram muitos casos grave da doença e foi registrado o primeiro caso fatal devido às infecções secundárias (Nogueira RMR *et al.*, 1999).

Ausente das Américas por quase 15 anos, o DENV-3 foi reintroduzido em 1994 atingindo o Brasil em 2000 onde causou graves epidemias de dengue, principalmente no verão de 2001-2002. O sorotipo 3 apresentou rápida dispersão para 24 estados do país no período de 2001 a 2003. As maiores epidemias detectadas até o momento ocorreram nos anos de 1998 e 2002, com cerca de 530 mil e 800 mil casos notificados, respectivamente (Schatzmayr, H.G. *et al*; 2007 e Ministério da Saúde, 2008).

Atualmente no Brasil encontra-se confirmada a circulação dos quatro sorotipos do *Dengue virus*: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e o DENV-4 que foi detectado no país em 2010, após 28 anos sem ser detectado (Temporão JG, 2011 e Nunes MR et. al, 2012). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, a dengue em 2013, encontrava-se com o seguinte cenário: o estado do Ceará registrou 24,6 mil doentes com 55 mortes por dengue. No Pará foram notificados 16.868 casos de dengue em todo o estado. Mato Grosso registrou 42.694 notificações da doença, com 33 óbitos confirmados por dengue. O Rio Grande do Norte teve 97 dos seus 167 municípios com alta incidência da dengue. Várias cidades de Minas Gerais, como Ituiutaba e Uberaba, registraram alto índice de infestação da dengue (SVS-MS, 2013).

1.2.3 Situação atual da Dengue em Minas Gerais

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais (SES-MG), em 2013, foram confirmados mais de 193.450 casos de dengue no estado, com o registro de 89 óbitos. Em 2011 também foi identificada a reintrodução do sorotipo DENV-4 no estado, esse sorotipo não circulava por aqui há quase 30 anos; dessa forma a maior parte da população com menos de 30 anos está susceptível à infecção por este sorotipo (SES-MG, 2013).

Comparado com o ano de 2012, quando foram registrados 22.105 casos da doença, o número de infectados é quase nove vezes maior. A SES usa dois argumentos para justificar o avanço da dengue: o primeiro diz respeito à introdução do vírus tipo 4 causador da doença no estado e o segundo fator se deve à troca de gestão política em aproximadamente 83% das prefeituras, levando à desmobilização do controle epidemiológico (SES-MG, 2013).

Na tentativa de conter o avanço da doença no estado, o governo de Minas Gerais elaborou em 2008, o “Plano Estadual de Contingência da Dengue” que destaca a conscientização das pessoas sobre o combate à dengue e a capacitação dos profissionais de saúde para um melhor diagnóstico e tratamento da doença. O Estado também realiza o LIRaa três vezes por ano, no qual realiza o mapeamento rápido dos índices de infestação por *A. aegypti* em todo o município. Vale ressaltar a importância desse procedimento, pois possibilita a identificação dos criadouros predominantes e a situação de infestação do município, bem como, permite o direcionamento das ações de controle para as áreas mais críticas (SES-MG, 2009).

1.2.4 Dengue e seu controle em Belo Horizonte

O município de Belo Horizonte, localizado na região centro-sul de Minas Gerais, com uma população estimada de 2.412.937 habitantes, segundo o censo demográfico de 2007, está situado a 852 metros de altitude, com clima tropical, temperaturas médias anuais entre 17 e 20°C e índices pluviométricos próximos de 1.300mm anuais (IBGE, 2013).

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

Vale ressaltar, que a divisão da cidade em regionais é apenas uma questão política, e que praticamente não existem barreiras geográficas entre elas. Entretanto, algumas destas regionais possuem particularidades que merecem ser destacadas, de acordo com a Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (2013):

- A regional Barreiro é separada da regional Oeste pelo anel rodoviário e faz limite com os municípios de Contagem, Ibirité, Brumadinho e Nova Lima. Coexistindo com as intensas atividades industriais e comerciais da região, ainda existem diversas áreas verdes e nascentes. Na porção sul/sudeste dessa regional há uma área não

urbanizada, onde se encontram áreas de preservação, como o parque Estadual da Serra do Rola Moça. Já na porção norte há atuação de mineradoras e ocupação imobiliária pouco ordenada (Gomes I, 2005).

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

1.2.5 Manifestações Clínicas

A infecção por DENV pode causar uma doença que inclui desde formas assintomáticas até quadros graves de hemorragia e choque, podendo levar a morte (WHO, 1997). A figura 3 ilustra, através de uma pirâmide, a organização das formas da doença segundo o grau de gravidade.

O período de incubação varia de três a 14 dias, com uma média de quatro a sete dias. Em áreas onde a dengue é endêmica, os sintomas apresentam-se muitas vezes clinicamente inespecífico, especialmente em crianças, nas quais encontram-se apenas sinais de alguma síndrome viral. Alguns fatores são importantes na progressão de um caso de dengue clássico para dengue hemorrágica, tais como: a cepa e os genótipos virais, assim como, a imunidade, idade e fatores genéticos do hospedeiro (Gubler DJ, 1998).

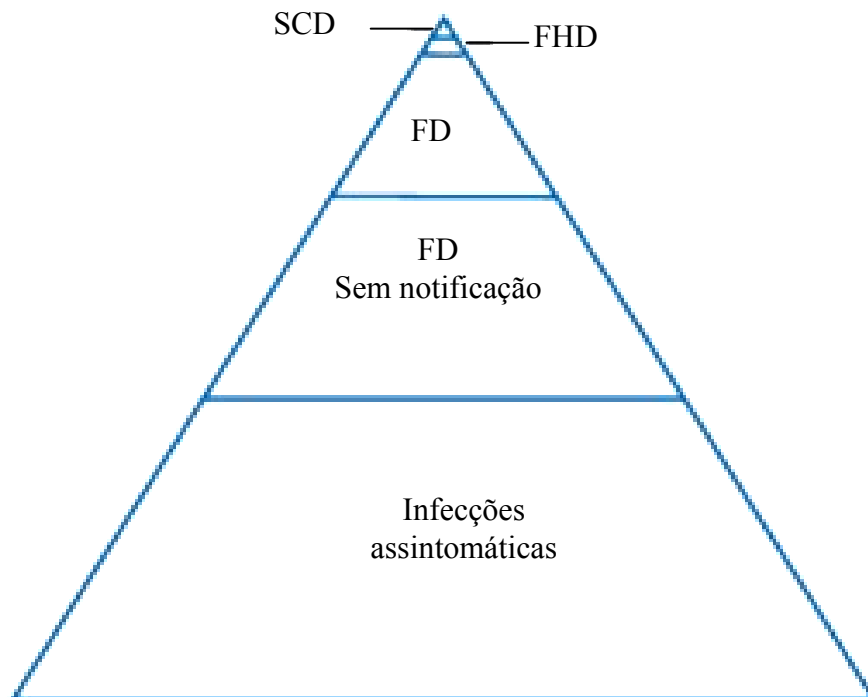


Figura 3 : Pirâmide representando as doenças causadas pelas infecções de dengue e organizada segundo o grau de gravidade. SCD: Síndrome do Choque da Dengue, FHD: Febre Hemorrágica da Dengue, FD: Febre da Dengue (Kyle, JL 2008).

1.3 Ciclo de transmissão

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

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

Mosquito infectado → homem susceptível → homem infectado → mosquito infectado

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

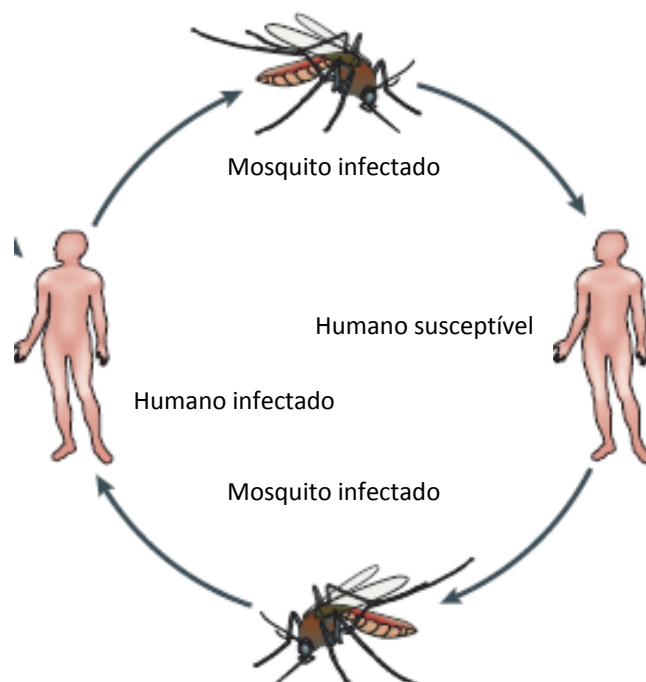


Figura 4: Ciclo de Transmissão do *Dengue virus* (Adaptado de: Whitehead SS, 2007).

1.4 Controle e Prevenção

Atualmente não existem vacinas contra a dengue, apesar do grande avanço nas pesquisas com vacinas que vem sendo realizadas por vários grupos de pesquisas, como as desenvolvidas pela Fundação Oswaldo Cruz e pela farmacêutica francesa Sanofi-Aventis que já estão em fase de estudos clínicos (Brasil, 2014). Sendo assim, os principais métodos para a prevenção da doença ainda dependem do controle do mosquito vetor, principalmente no peridomicílio das residências onde a maioria das transmissões ocorre. Esses incluem: a redução dos locais de reprodução do mosquito, melhoria no manejo dos resíduos sólidos, organização do ambiente urbano, maiores investimentos e efetividade nos programas de educação da rede pública (Malavige GN, 2004).

O controle envolve governo e sociedade no combate do *A. aegypti*. As medidas preventivas são direcionadas principalmente aos criadouros, constituindo-se de ações simples e eficazes, especialmente aquelas que consistem em cuidados a serem adotados pela população. A tecnologia hoje disponível abrange medidas de controle físico,

químico e biológico. Análises laboratoriais também são indispensáveis para a prevenção, pois o diagnóstico correto e o tratamento imediato possuem um papel crucial na prevenção do sofrimento e morte causados pela dengue (Donalísio MR e Glasser CM, 2002; Rigau-Pérez JG, 1998).

1.5 O Vetor

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

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

O *A. aegypti* apresenta as seguintes características fenotípicas: é um mosquito rajado, de coloração escura, com escamas brancas pelo corpo. Sua identificação é facilitada pelo desenho em forma de lira presente no dorso, que pode ser observado a olho nu, como observado na figura 5. Escamas brancas, alternando-se com escamas escuras, são encontradas na região posterior da cabeça e nos segmentos abdominais. (Gadelha DP, 1985 e Rey L, 2001).



Figura 5: *Aedes aegypti* (University of Florida, 1999).

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

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

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

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

O *A. albopictus*, originário da Ásia, é o outro vetor do dengue no Sudeste Asiático e existente no Brasil desde 1986, onde foi identificado pela primeira vez no Rio de Janeiro (Forattini OP, 1986, Paupy C *et al.*, 2009). Este mosquito também conhecido como “tigre asiático” pode ser encontrado na região da Ásia temperada e tropical, Europa, Norte e Sul da América, África e em alguns locais do Pacífico e Oceano Índico. O *A. albopictus* é um mosquito de cor negra, com uma faixa estreita, longitudinal, mediana, branco-prateada, abdômen com faixas basais brancas e pernas marcadas de branco e preto, como mostra a figura 6 (Eiras AE, 2005).

Em algumas partes da Ásia, América do Sul e no Oeste da África, o *A. albopictus* é considerado um importante vetor porque se utiliza tanto de criadouros naturais quanto de criadouros artificiais. Ibáñez-Bernal *et al.* (1997), registraram, pela

primeira vez nas Américas, a infecção natural do *A. albopictus* pelo vírus da dengue em espécimes coletadas durante um surto que ocorreu na cidade de Reynosa no México.



Figura 6: *Aedes albopictus* (University of Florida, 1999).

1.5.3 Biologia do vetor

Os dípteros se desenvolvem através de metamorfose completa (holometabolía), e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto (Consoli RAGB, 1994). O desenho esquemático mostrando as fases de desenvolvimentos do *A. aegypti* está ilustrado na figura 7.

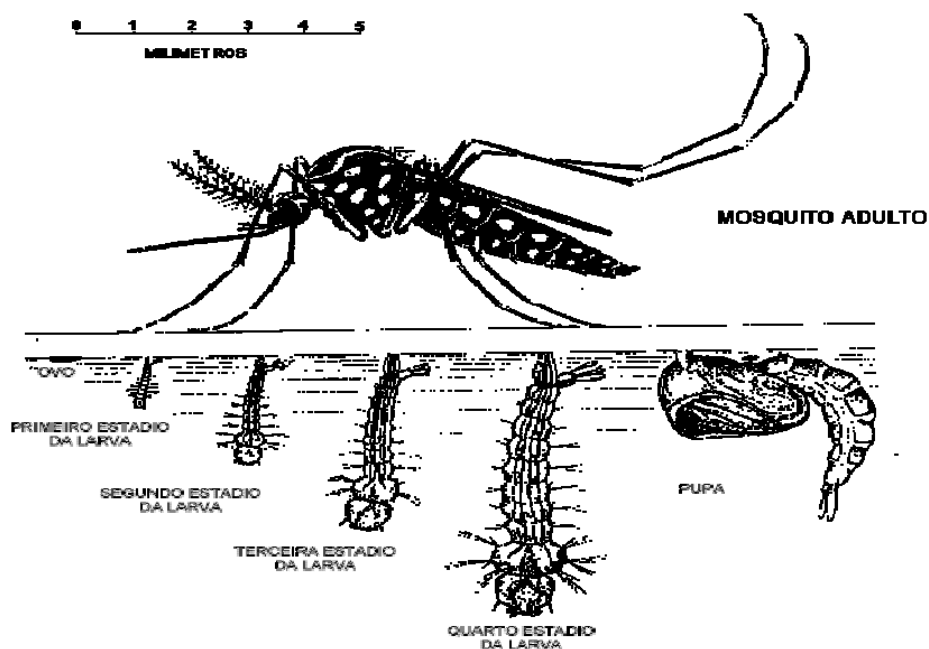


Figura 7: Desenho esquemático mostrando os estágios de desenvolvimento do *A. aegypti* (www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/CA/DENGUE/AEDES2.gif).

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

A larva que emerge da ruptura do ovo é a primeira dos quatro estágios larvais (Pereira ST *et al.*, 2006). Ela cresce sequencialmente de 1 mm para 7 mm de comprimento. A passagem de um estágio larval para o próximo é feita pelo processo de muda durante o qual ocorre o desprendimento do exoesqueleto. A larva passa a maior parte do seu tempo se alimentando. O desenvolvimento larval se completa entre cinco e 10 dias, desde que ocorram condições favoráveis de temperatura (25°C a 29°C) e se inicia a fase de pupa. O estágio pupal não requer alimentação e seu desenvolvimento dura em média de 1 a 3 dias, a partir de então aparecem as características dos adultos como asas, probóscide e patas. Assim que o ciclo gonadotrófico (amadurecimento dos ovos) é completado, a fêmea está apta para a postura. O tempo médio de vida do mosquito adulto é de 30 dias e a cada oviposição, a fêmea coloca de 50 a 200 ovos (revisão em Gadelha DP, 1985).

1.6 Agente etiológico

1.6.1 Gênero *Flavivirus*

A palavra *flavus* é derivada do latim e significa amarelo predizendo a coloração amarelada dos indivíduos acometidos pelo vírus da febre amarela (Theiler M e Smith HH, 1937). O DENV pertence à família Flaviviridae que é constituída por patógenos virais responsáveis por causar doenças graves e morte em animais e humanos. A família

consiste em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* é o maior dentro da família, sendo composto de 70 vírus incluindo o DENV, vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite causada por carrapatos (TBEV), vírus West Nile (WNV) e o vírus da febre amarela (YFV) (Mukhopadhyay S *et al.*, 2005).

Os vírus desse gênero possuem aproximadamente 500 Å de diâmetro e seu material genômico é composto de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, empacotado por um nucleocapsídeo proteico e uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, coberta por mais de 180 cópias de duas glicoproteínas virais (Lindenbach BD e Rice CM, 2003). O genoma dos *Flavivirus* possui aproximadamente 11 Kb e codifica três proteínas estruturais - proteína do capsídeo (C), a proteína precursora da membrana (prM – que é proteoliticamente clivada por uma protease celular para formar proteína M em vírions maduros) e a proteína do envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS) que são essenciais para a replicação viral – NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Mackenzie JS, 2004). A figura 8 ilustra a partícula viral com suas proteínas estruturais e seu genoma.

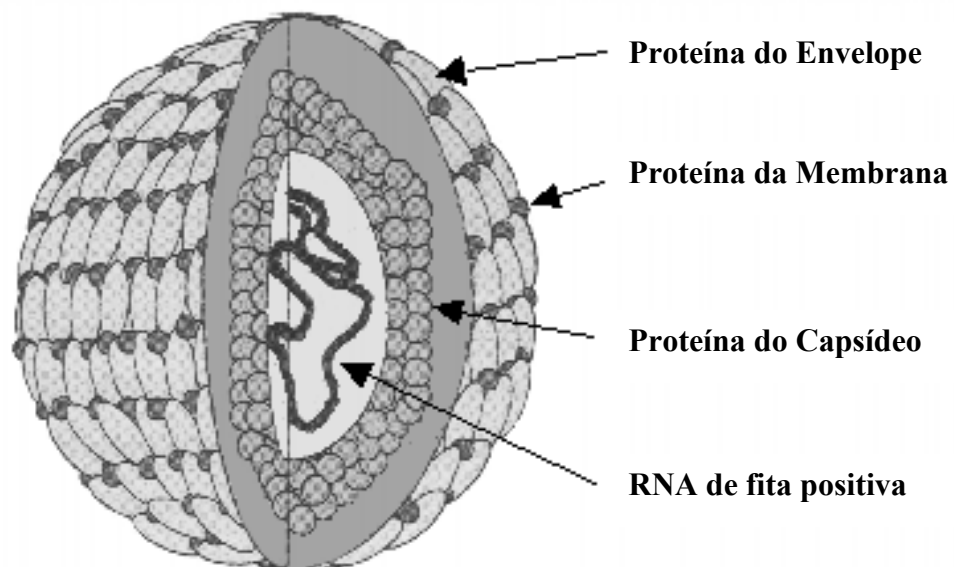


Figura 8: Desenho esquemático mostrando a partícula viral. Diagrama mostrando regiões do genoma dos *Flavivirus* codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais. O polipeptídeo é processado em três proteínas estruturais (C, proteína do nucleocapsídeo; M, proteína associada à membrana; e E a proteína do envelope) (www.dailycal.org/printable.phpid=7167).

1.6.2 *Dengue virus*

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

Os agentes etiológicos da febre amarela e do dengue foram os primeiros a receberem a denominação de vírus, em 1902 e 1907, respectivamente, descritos como agentes filtráveis submicroscópicos. O isolamento do DENV só ocorreu na década de 40, por Kimura, em 1943 e Hotta, em 1944, denominando essa cepa de Mochizuki. Sabin e Schlesinger, em 1945, isolaram a cepa Havaí, quando o primeiro, nesse mesmo ano, ao identificar outro vírus em Nova Guiné, observou que as cepas tinham características antigênicas diferentes e passou a considerar que eram sorotipos do mesmo vírus. As primeiras cepas ele denominou sorotipo 1 e a de Nova Guiné sorotipo 2. Em 1956, no curso da epidemia de dengue hemorrágico no Sudeste Asiático, foram isolados os vírus 3 e 4, definindo-se, a partir daí, que o complexo dengue é formado por quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (revisão em Teixeira MG, 1999).

O vírion maduro possui três proteínas estruturais: a proteína C do nucleocapsídeo, a proteína M associada à membrana e a proteína E do envelope. A proteína C é o primeiro polipeptídeo viral a ser sintetizado. A formação da proteína M se dá a partir de um precursor (proteína pr-M) parece ser crucial na morfogênese do vírus. A função dessa proteína não está clara, mas tem por efeito um aumento da infectividade viral e uma reorganização da estrutura da superfície do vírus que permite a fusão à célula (Després P, 1993). A glicoproteína E está associada a funções biológicas tais como a interações com receptores, a hemaglutinação dos eritrócitos, a indução de anticorpos neutralizantes na resposta imunológica, a fusão dos vírus com a membrana endossômica e o acoplamento viral (Chang GJ, 1997). A estrutura do vírus dengue maduro pode ser observada na figura 9.

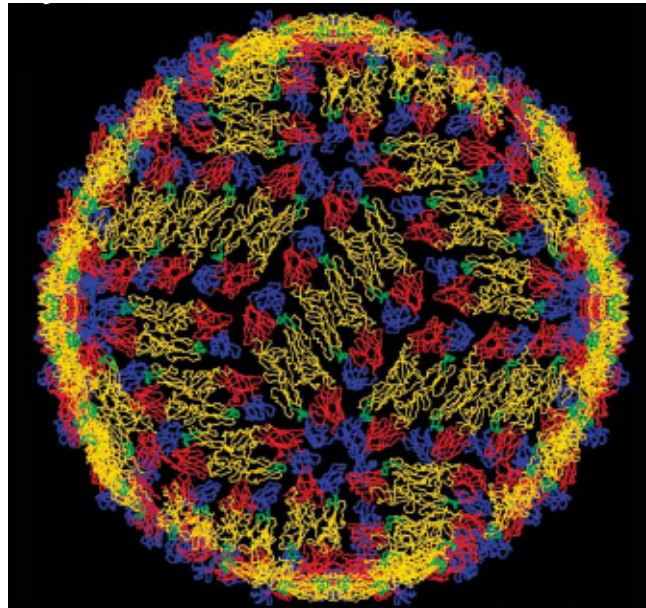


Figura 9: Esquema do *Dengue virus* maduro (Mackenzie JS, 2004).

Existem as outras proteínas não estruturais – NS1, NS2 e NS5 – e outras quatro menores – NS2A, 2B, NS4A e 4B – cujas funções ainda não estão totalmente identificadas (Torres EM, 2005). A figura 10 ilustra a estrutura e a expressão do genoma dos *Flavivirus*.

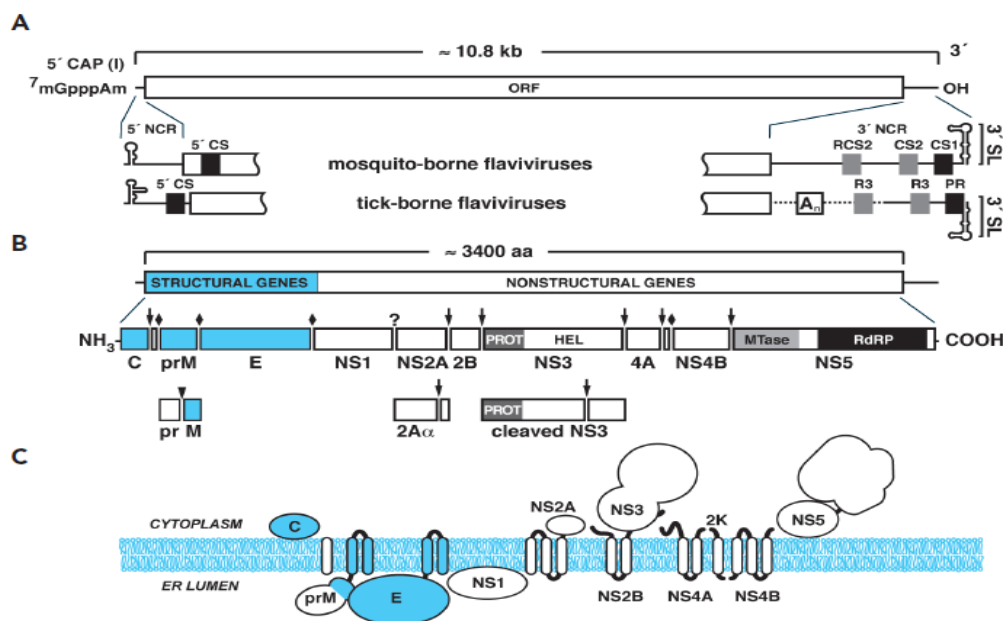


Figura 10: Estrutura e expressão do genoma dos *Flavivirus*. A. Estrutura do genoma e elementos do RNA. B. Processamento da poliproteína e genes estruturais e não-estruturais. C. Topologia da poliproteína na membrana (Lindenbach, 2007).

1.6.3 Ciclo multiplicativo

A multiplicação do DENV pode ser verificada precocemente três horas após a infecção, ocorrendo aparentemente na região perinuclear das células infectadas (Kantoch M, 1980). O vírus funde-se à superfície da célula do hospedeiro e em seguida entra na célula por endocitose mediada por receptor. Após a formação do endossoma ocorre a acidificação do meio nesse compartimento e mudanças na conformação do vírion. Assim a partícula viral perde o revestimento do nucleocapsídeo e o material genético é liberado dentro do citoplasma. A replicação do genoma ocorre dentro de compartimentos intracelulares. A montagem do vírus se inicia na superfície do retículo endoplasmático (RE) quando as proteínas estruturais e os segmentos de RNA recentemente sintetizado estão dentro do lúmen do RE. As partículas virais imaturas e não infecciosas são transportadas através do complexo de Golgi (CG). A proteína pr-M destas partículas são clivadas por protease do hospedeiro resultando na proteína M, essas então tornam-se maduras e infecciosas. Os vírions maduros são subsequentemente liberados por exocitose, como demonstrado na figura 11 (Mukhopadhyay S *et al.*, 2005).

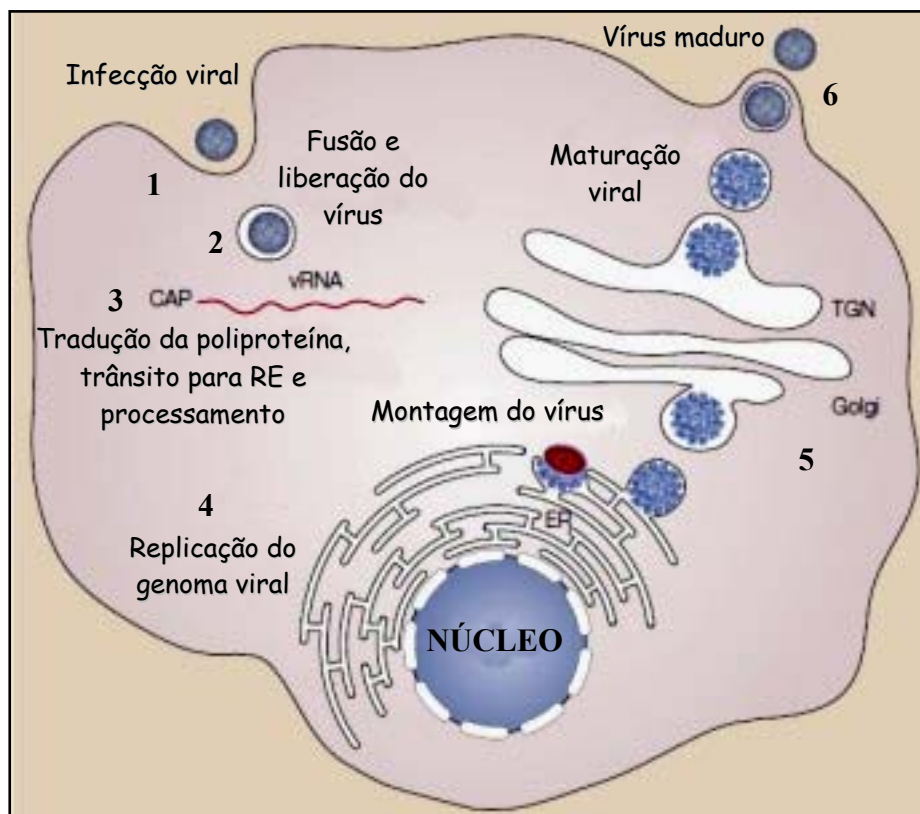


Figura 11: Ciclo de multiplicação dos *Flavivirus* (Adaptado de Mukhopadhyay, 2005).

1.6.4 Infecção do DENV no mosquito vetor

O período que vai desde o repasto infectante até a capacidade de transmissão do vírus pelo mosquito é designado como período de incubação extrínseco (PIE). Após ingestão de sangue contaminado com o DENV, as partículas virais precisam se ligar a receptores específicos do intestino médio do mosquito para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, se replicar nas células epiteliais intestinais para poderem então, deixar o intestino. Uma vez que o vírus consegue deixar o intestino, ele passa para a hemocele podendo infectar órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso. Por fim, é necessário estabelecer a infecção na glândula salivar para que esse mosquito seja considerado apto a transmitir o vírus e partículas virais precisam ser eliminadas juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (Hardy JL *et al.*, 1980; Woodring JL *et al.*, 1996; Black IV WC *et al.*, 2002). As etapas necessárias para a infecção por *Flavivirus* e transmissão pelo vetor estão ilustradas na figura 12.

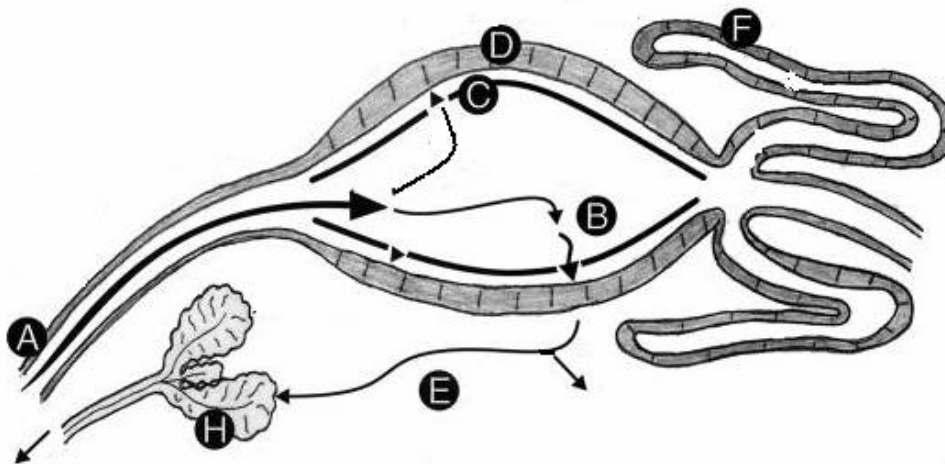


Figura 12: Etapas necessárias para a infecção por *Flavivirus* e transmissão pelo vetor. As letras indicam os locais de desenvolvimento viral e as setas indicam o caminho percorrido pelo vírus dentro do inseto. Após a ingestão de sangue infectado (A) os vírus entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se replicam e deixam essas 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. Nesse desenho as seguintes letras indicam: (B) intestino médio, (C) matriz peritrófica e (F) os túbulos de Malpighi (modificado de Beerntsen *et al.* 2000).

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

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

1.7 Transmissão transovariana

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

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

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

1.8 Competência e Capacidade vetorial

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

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

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

A definição mais aceita para competência vetorial é a habilidade intrínseca do vetor para infecção, multiplicação e transmissão do vírus (Bennett K, 2002). Ela está associada com o número de barreiras anatômicas que determinam a eficiência da infecção no vetor e inclui a susceptibilidade à infecção, isto é, o desenvolvimento do patógeno, duração do período de incubação extrínseco e eficiência da transmissão do patógeno (Beerntsen BT, 2000). Tais barreiras incluem: a barreira de infecção do intestino médio (MIB), a barreira de escape do intestino médio (MEB) e a barreira da glândula salivar (Bennett K, 2002), como ilustradas na figura 13.

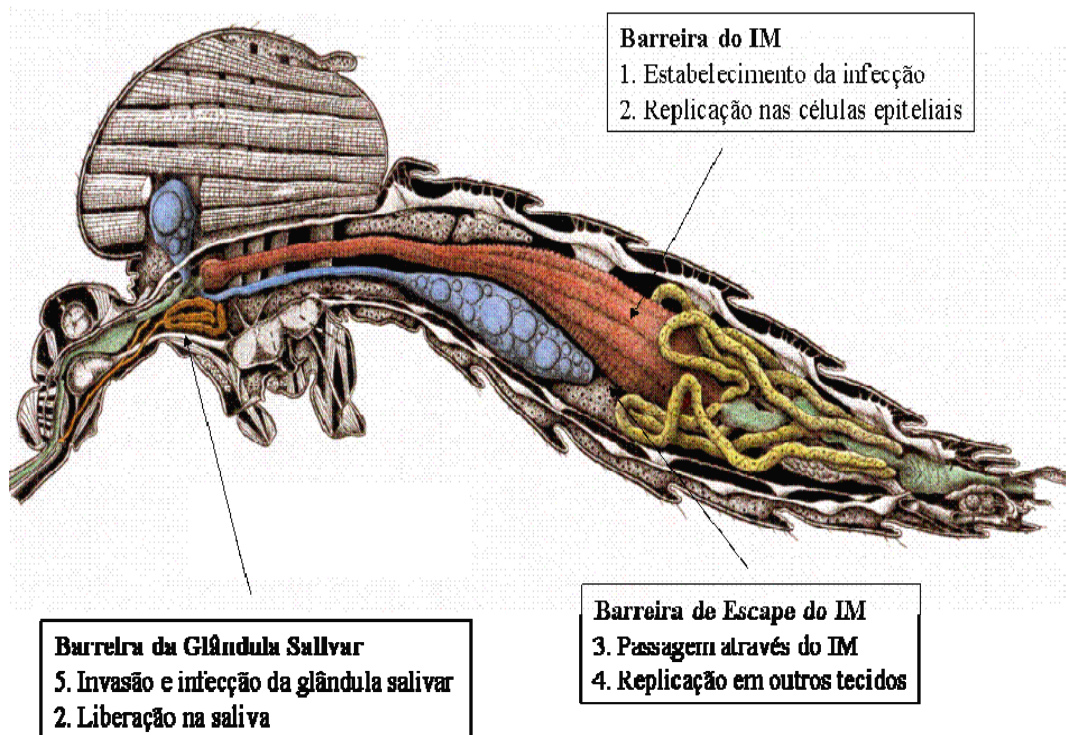


Figura 13: Barreiras naturais à infecção pelo *Dengue virus*. IM = intestino médio (Adaptado de: Jobling, 1987).

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

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

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

2 Justificativa

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

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

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

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

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

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar a competência vetorial das nove populações de *Aedes aegypti* da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao *Dengue virus 2*, nos anos de 2009 e 2011.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a taxa de transmissão natural do DENV na geração F1 das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte.

Avaliar, experimentalmente, o índice de infecção das cabeças e corpos das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte.

Analisar comparativamente as taxa de infecção do intestino (IR), a taxa de disseminação do intestino (DR) e competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte, após alimentação infectante com DENV-2, em dois anos de estudo.

4 Métodos

4.1-Competência Vetorial

4.1.1 Área de estudo e manutenção das populações de mosquitos

O município de Belo Horizonte, localizado na região centro-sul de Minas Gerais, com uma população estimada de 2.412.937 habitantes, segundo o censo demográfico de 2007, está situado a 852 metros de altitude, com clima tropical, temperaturas médias anuais entre 17 e 20°C e índices pluviométricos próximos de 1.300 mm anuais (IBGE, 2013).

Foram estudadas populações de *A. aegypti* originárias das nove regionais do município de Belo Horizonte: Norte, Barreiro, Venda Nova, Centro-sul, Oeste, Nordeste, Noroeste, Leste e Pampulha dos anos de 2009 e 2011.

Os ovos dessas populações foram coletados e cedidos pela Secretaria Municipal de Saúde de Minas Gerais. As armadilhas para oviposição (APO) foram distribuídas em pontos pré-determinados, pela Secretaria Municipal de Saúde, em cada uma das regionais, com o objetivo de cobrir toda a área geográfica das mesmas, como mostra a figura 14. Esses ovos chegaram ao Laboratório de Entomologia Médica (LEM) em palhetas e separados por regionais. Em seguida, as colônias foram estabelecidas e mantidas até a primeira geração (F1).

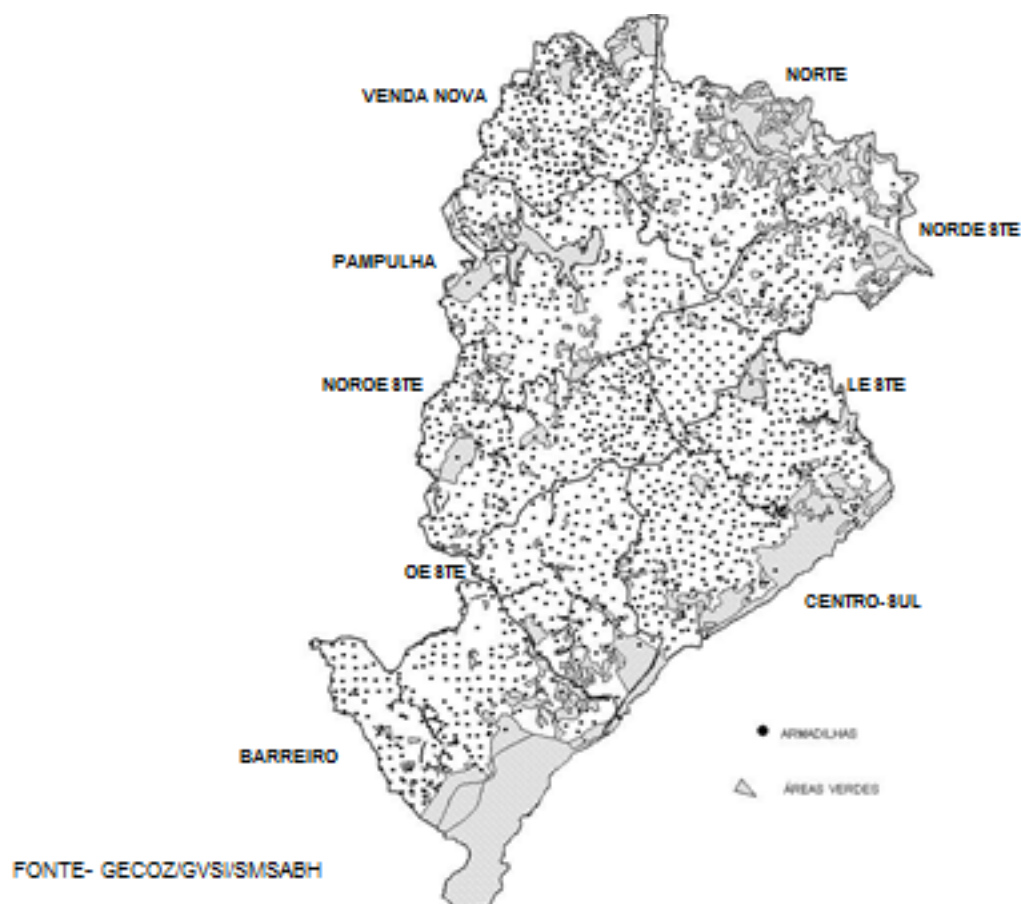


Figura 14: Mapa da cidade de Belo Horizonte ilustrando a localização das armadilhas para oviposição (APOs) distribuídas em pontos pré-determinados, em cada uma das regionais estudadas (Fonte: GECOZ/GVSI/SMSABH).

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

4.1.2 Células e vírus

4.1.2.1 Células C6/36

Células C6/36, proveniente de linhagem contínua de larvas de *A. albopictus*, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Cláudio Antônio Bonjardim (ICB/UFMG). Essas

células foram cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15) da marca Gibco, contendo 20µg/ml de estreptomicina, 5µg/ml de anfotericina B, 200U/ml de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) e permaneceram a 28°C em B.O.D., para passagens do vírus.

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

4.1.2.2 Vírus

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

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

4.1.3 Multiplicação viral

Para a multiplicação viral uma garrafa de cultura (25 cm²) contendo as células C6/36 com 80 a 90% de confluência foi inoculada com 500 µL do DENV-2. Durante uma hora, em intervalos de 10 minutos, o meio contendo o DENV foi homogeneizado sobre a monocamada de células a partir de leves movimentos com a garrafa de cultura, em seguida adicionou-se 5 ml de meio L15 com SFB a 10% e suplementado com antibióticos sendo, por fim, incubada a 25°C. A infecção foi observada através da formação de sincícios e do efeito citopático característicos da infecção viral na cultura de células.

4.1.4 Titulação viral

O título viral foi calculado pelo método TCID₅₀ (Reed e Muench, 1938). Para a realização desse procedimento células C6/36 foram cultivadas em placas de 96 poços

com meio L15 suplementado com antibióticos e SFB a 1%, sendo implantadas $2,5 \times 10^5$ células/poço.

Uma cadeia de diluições (10^{-2} a 10^{-7}) seriadas contendo o vírus foi inoculada, no dia seguinte à preparação descrita acima, sobre as fileiras da placa contendo as células C6/36. Como controle foram utilizados duas colunas com células não infectadas. Após incubação por duas horas, completou-se o volume de cada poço com 100µL de meio L15 contendo SFB a 10% e suplementado com antibióticos.

Em seguida, as placas foram incubadas a 27°C por aproximadamente 10 dias. Para avaliação da titulação foi realizada a contagem de poços positivos, os quais possuíam a presença de sincícios e do efeito citopático, de acordo com os cálculos propostos por Reed LJ e Muench H, 1938. A figura 15 demonstra o desenho esquemático da placa de titulação e de como foram feitas as diluições.

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

Figura 15: Desenho esquemático da placa de titulação. Legenda: PBS (azul), controle (CO) não infectado (laranja) e diluições seriadas de vírus (rosa).

4.1.5 Infecção dos mosquitos

Amostras individuais de 200 fêmeas (geração F1) de *A. aegypti* representativas de cada uma das localidades de estudo, com idade de três a cinco dias foram utilizadas nos experimentos de infecção. As fêmeas foram separadas em gaiolas identificadas e a

solução de açúcar foi suspensa 24 horas antes da alimentação oral sendo mantidas apenas com água.

O repasto infectante foi realizado através de um sistema de membranas. O alimentador artificial foi revestido com membrana animal dissecada da pele de *Gallus domesticus* (um dia de idade). Ao alimentador foi adicionada uma mistura de 2/3 de sangue de camundongo (*Mus musculus*) com o plasma inicialmente inativado e 1/3 do sobrenadante de células C6/36 infectadas com o DENV-2 (vírus fresco).

A média dos títulos dos vírus utilizados nos repastos infectantes foi de $2,67 \times 10^6$ e $3,16 \times 10^5$ TCID₅₀/mL para os experimentos do ano 2009 e 2011, respectivamente.

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

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

4.1.6 Dissecção dos mosquitos

Um total de 40 fêmeas, de cada uma das regionais, foi dissecado no 14º dia após o repasto infectante, momento correspondente ao final do PIE do vírus.

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

4.1.7 Extração de RNA

A cabeça e o corpo dos mosquitos foram macerados em tubos cônicos de 1,5mL, com auxílio de um pistilo plástico, em 200µl de PBS 1X. Após centrifugação, 160µl do

sobrenadante foram processados para extração do RNA viral através do QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram armazenadas a -70°C .

4.1.8 Transcrição Reversa - PCR em Tempo Real

As reações de RT-PCR em Tempo Real foram conduzidas no aparelho ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR da Applied Biosystems e como sistema de detecção foi utilizado o SYBR Green (Power SYBR® Green RNA-to-Ct 1-step – Applied Biosystems), um reagente que emite fluorescência ao se ligar inespecificamente a qualquer dupla fita de DNA.

Foram utilizados nos ensaios oligonucleotídeos comuns para os quatro sorotipos de DENV descritos por Leparc-Goffart, 2009, oligo senso: AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA e anti-senso: CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT. Todos os experimentos foram compostos de duplicatas de padrão, amostras, controle positivo e negativo. A curva gerada pelo padrão consiste em seis pontos variando entre 3×10^5 a 3 cópias virais.

Os resultados foram analisados a partir da comparação com a curva padrão onde as amostras positivas estavam inseridas dentro dos intervalos dos pontos pré-estabelecidos, bem como, o ciclo *threshold* (Ct) e a curva de *melting*.

4.1.9 Análise da transmissão vertical natural

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

A partir desses pools foram feitas as análises moleculares através das extrações do RNA e a RT-PCR em tempo real como descrito acima.

4.1.10 Avaliação da taxa de infecção, competência vetorial e Taxa de infecção disseminada.

A taxa de infecção (IR) foi calculada como a proporção (percentagem) de todos os mosquitos infectados experimentalmente ($n = 40$), em que foi detectada DENV (corpo inteiro). Já a competência vetorial (CV) foi calculada como a proporção de todos os mosquitos infectados experimentalmente ($n = 40$) para os quais foi detectada a presença de DENV na cabeça/glândulas salivares. A análise da competência vetorial foi realizada de acordo com Bennett et al. (2002). Conceitualmente, a taxa de infecção disseminada (DIR) é a proporção de mosquitos infectados com DENV (VC) dividido pela proporção dos mosquitos infectados com o vírus (IR) no corpo ($DIR = VC / IR$).

4.1.11 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa SPSS, versão 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). As diferenças de IR, CV e DIR entre as populações de vetores foram avaliadas por meio dos testes qui-quadrado ou Fisher bicaudal. A comparação desses parâmetros entre os dois anos de estudo foi realizada utilizando o teste t de Student bicaudal (teste de Kolmogorov-Smirnov foi para avaliar a normalidade dos dados). Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

A associação de cada co-variável com IR, VC e DIR (variáveis dependentes) foi testada na análise univariada. Todas as variáveis com valor de $p \leq 0,25$ foram incluídas no modelo completo de regressão logística. Odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC), foram usados como uma estimativa do risco. O teste de Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit foi utilizado para avaliar o ajuste dos modelos (Hosmer DW e Lemeshow, 2000).

5 Resultados

5.1 Determinação da taxa de transmissão vertical natural do DENV nas populações estudadas.

Para a verificação do índice de transmissão vertical natural do DENV, na geração F1 de todas as populações estudadas foi realizada a análise molecular através da técnica da RT-PCR em tempo real, como descrita nos métodos.

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

5.2 Caracterização das taxas de infecção do intestino (IR), taxa de infecção disseminada (DIR) e competência vetorial (CV) da cidade de Belo Horizonte, nos anos de 2009 e 2011.

As análises foram feitas em todas as nove regionais de Belo Horizonte (Norte, Venda Nova, Pampulha, Leste, Centro-Sul, Nordeste, Noroeste, Oeste e Barreiro) durante os anos de 2009 e 2011, as quais revelaram diferenças nas características relacionadas à infecção experimental com DENV-2 nas populações de *A. aegypti*.

De acordo com a figura 16, as taxas de infecção (IR) variaram de 40% a 82,5% (média: $60,6 \pm 8,4$) em 2009 e 60% a 100% (média: $78,1 \pm 6,1$) em 2011. A competência vetorial (CV), infecção nas cabeças e glândulas salivares, variou de 25% a 77,5% (média: $54,7 \pm 7,6$) em 2009 e de 25% a 80% (média: $50,8 \pm 8,2$) em 2011. As taxas de infecção disseminada (DIR) oscilaram de 68,7% a 100% (média: $91,1 \pm 3,3$) em 2009 e de 38,4% a 86,8% (média: $62,4 \pm 6,1$) em 2011. Apesar destas diferenças entre anos, foram apenas estatisticamente significantes para DIR ($p=0,008$).

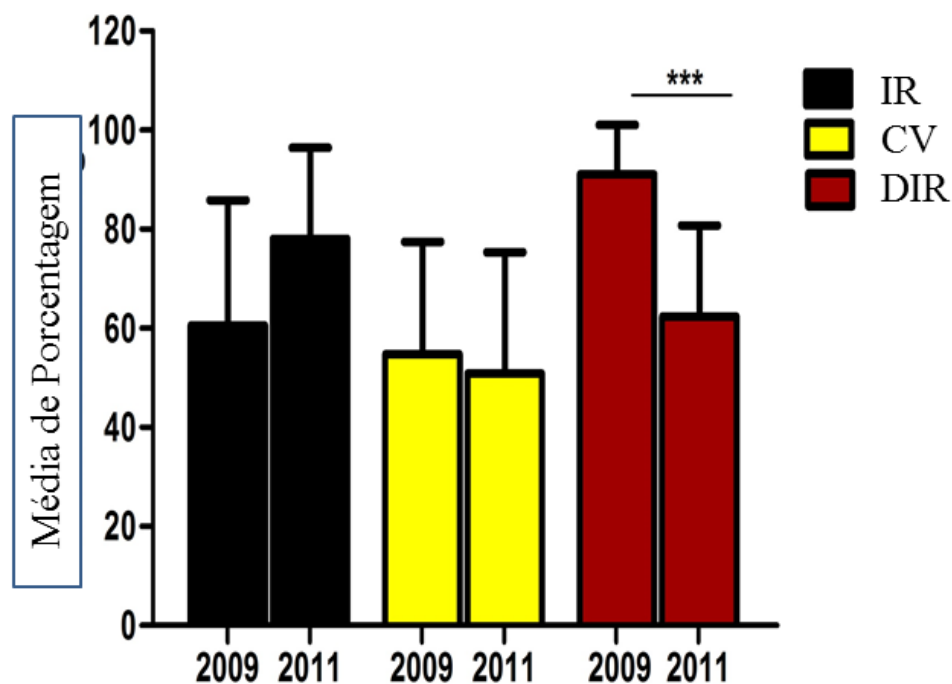


Figura 16 - Avaliação das taxas de infecção (IR), da taxa de disseminação (DIR) e da competência vetorial (CV) das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte, MG, infectadas com DENV-2, nos anos de 2009 e 2011.

5.3 Análise comparativa da taxa de infecção, taxa de infecção disseminada e da competência vetorial entre as populações de mosquitos das nove regionais de Belo Horizonte, nos anos de 2009 e 2011.

5.3.1 Taxa de infecção do intestino médio - IR - (proporção de corpos infectados com DENV pelo número total de mosquitos analisados)

Em 2009, a taxa mais alta de infecção (82,5%) foi detectada em populações de *A. aegypti* de quatro regionais: Norte, Barreiro, Centro-Sul e Venda Nova, sendo a menor taxa de infecção encontrada na regional Pampulha (25%). Análises estatísticas revelaram que essas taxas foram significativamente maiores ($p \leq 10^{-3}$) na regional Norte, Barreiro, Centro-Sul, Venda Nova e Oeste comparadas com as observadas na Pampulha, Nordeste, Leste e Noroeste, como demonstrado na figura 17.

Em 2011, a maior taxa de infecção ocorreu em Venda Nova (100%), seguida pela regional Centro-Sul (97,5%), Oeste e Nordeste ambas com 95%. As regionais Norte e Barreiro apresentaram IR's semelhantes de 65% e a menor IR foi apresentada

pela população da regional Noroeste (55%). A avaliação comparativa dos dados das taxas de infecção mostraram que eles foram significativamente maiores ($p \leq 0,003$) nas regionais Centro-Sul, Venda Nova, Oeste e Nordeste quando comparados com as regionais Norte, Barreiro, Pampulha, Leste e Noroeste. De acordo com a figura 17, nenhuma outra diferença significativa foi observada.

5.3.2-Competência Vetorial - CV - (proporção de DENV nas cabeças pelo total de mosquitos analisados).

Em 2009, as populações de *A. aegypti* da regional Centro-Sul apresentaram o maior valor de competência vetorial calculado (77,5%), sendo o menor valor determinada na população da Pampulha (25%). Comparativamente, de acordo com a figura 17, as análises de todas as regionais mostraram taxas de competência vetorial significativamente maiores ($p \leq 10^{-3}$) nas regionais Norte, Barreiro, Centro-Sul, Venda Nova e Oeste quando comparados com as regionais Pampulha, Noroeste, Leste e Nordeste.

Em 2011, a mais alta taxa de competência vetorial foi verificada para a população da regional Oeste (82,5%), seguida pelas populações de Venda Nova e Centro-Sul (80%). A menor taxa foi encontrada na população da regional Barreiro (25%). Comparativamente, a maior taxa significativa de CV ($p \leq 10^{-3}$) foi encontrada nas regionais Centro-Sul, Venda Nova e Oeste quando comparadas as das regionais Norte, Barreiro, Pampulha, Leste e Noroeste. Além disto, a taxa de CV na regional Nordeste foi significativamente maior ($p \leq 0,009$) que na Pampulha, Barreiro, Leste e Noroeste. Segundo a figura 17, nenhuma outra diferença estatística foi observada.

5.3.3-Taxa de infecção disseminada do intestino médio – DIR - (proporção de cabeças infectadas com DENV pelo número de mosquitos com os corpos infectados com DENV).

Em 2009, a taxa de infecção disseminada foi semelhante entre as populações das regionais, variando de 84,7% a 100%, exceto para a regional Noroeste, a qual apresentou significativamente a menor DIR (68,7%) ($p=0,003$). As populações de mosquitos das regionais Norte, Pampulha, Centro-Sul, Venda Nova, Oeste, Nordeste e

Leste apresentaram de forma significativa as maiores DIR's quando comparadas as regionais Barreiro e Noroeste ($p \leq 0,009$).

Entretanto este perfil não foi observado em 2011, onde as DIR's variaram de 39,2% (Leste) a 86,8% (Oeste). De acordo com a figura 17, os mosquitos das regionais Norte, Pampulha, Centro-Sul, Venda Nova, Oeste e Nordeste apresentaram DIR significativamente mais altas que Barreiro e Leste ($p \leq 0,009$).

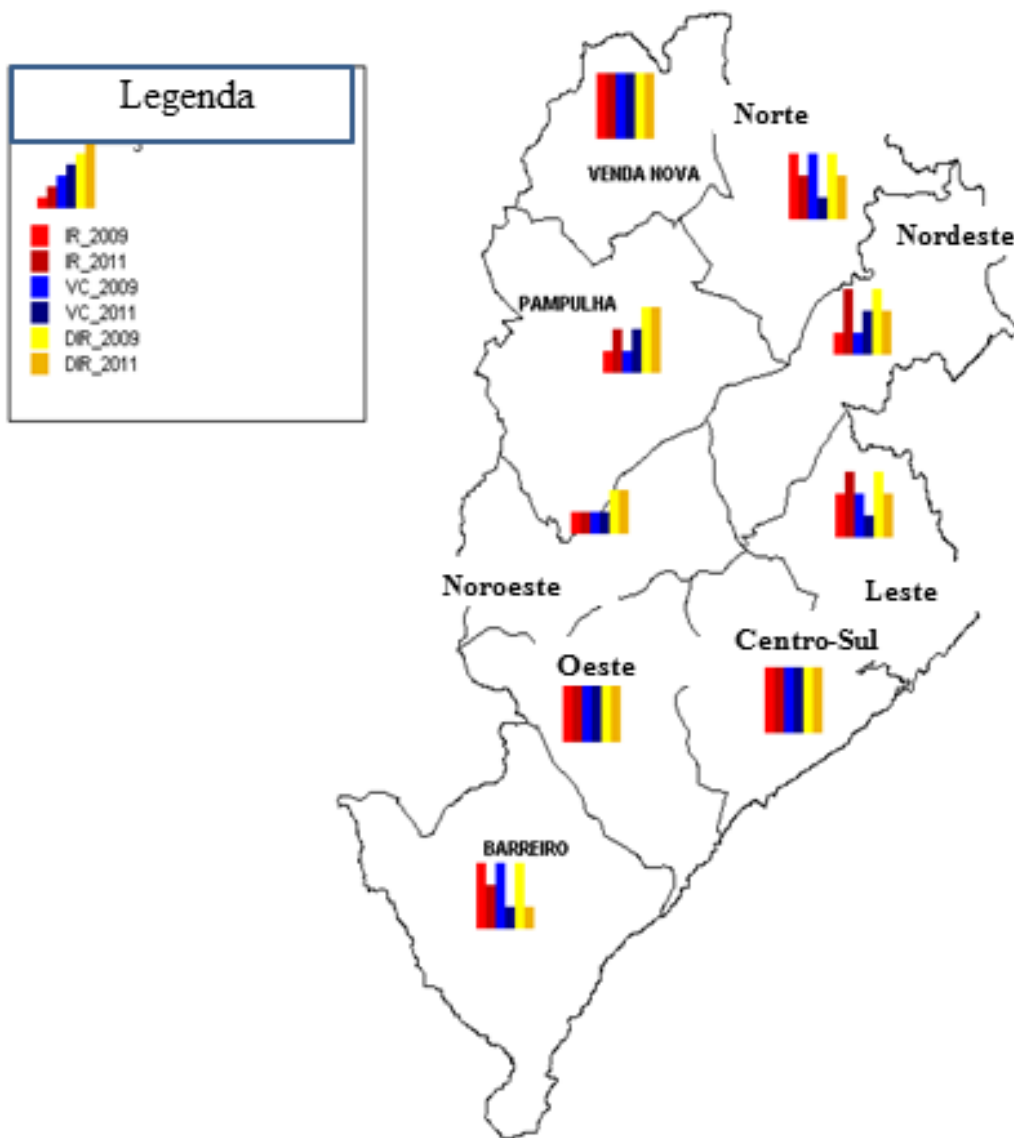


Figura 17 - Mapa esquemático da cidade de Belo Horizonte mostrando gráficos comparativos de IR, DIR e da competência vetorial das populações de *A. aegypti* nos anos de 2009 e 2011.

5.4 Análises estatísticas da taxa de infecção, taxa de infecção disseminada e competência vetorial das populações de *A. aegypti* das nove regionais de Belo Horizonte, nos anos de 2009 e 2011.

Os resultados foram avaliados utilizando um modelo logístico tendo as IR como co-variáveis. Em 2009, as regionais Norte, Barreiro, Centro Sul e Venda Nova apresentaram uma forte associação. Em 2011, o mesmo foi observado para as regionais Centro-Sul, Venda Nova, Oeste e Nordeste. Entretanto, considerando a CV como co-variável, os resultados demonstraram uma associação mais relevante para as regionais Centro-Sul e Venda Nova no anos de 2009. Já em 2011, Centro-Sul, Venda Nova e Oeste foram as únicas regionais que mostraram uma associação mais consistente. As análises dos dados de DIR utilizando os modelos de regressão logística indicaram que as regionais Pampulha, Centro-Sul, Venda Nova, Oeste, Nordeste e Leste, no ano de 2009, bem como, Centro-Sul, Venda Nova e Oeste em 2011 foram as regionais que apresentaram maior associação. O teste de Hosmer-Lemeshow teve uma bom ajuste para todos os modelos. Estas análises podem ser observadas na quadro 1.

QUADRO I: DETALHES DAS TAXAS DE IR, CV E DIR DAS NOVE REGIONAIS DE BELO HORIZONTE

Regionais	Taxas de infecção (IR)		Competência Vetorial (CV)		Taxa de infecção disseminada (DIR)	
	2009	2011	2009	2011	2009	2011
Norte	33/40 (82,5%)	26/40 (65%)	29/40 (72,5%)	14/40 (35%)	29/33 (87,8%)	14/16 (53,8%)
Barreiro	33/40 (82,5%)	26/40 (65%)	28/40 (70%)	10/40 (25%)	28/33 (84,8%)	10/26 (38,4%)
Pampulha	10/40 (25%)	24/40 (60%)	10/40 (25%)	17/40 (42,5%)	10/10 (100%)	17/24 (70,8%)
Centro-Sul	33/40 (82,5%)	39/40 (97,5%)	31/40 (77,5%)	32/40 (80%)	31/33 (93,9%)	32/39 (82%)
Venda Nova	33/40 (82,5%)	40/40 (100%)	30/40 - (75%)	32/40 (80%)	30/33 (90,9%)	32/40 (80%)
Oeste	31/40 (77,5%)	38/40 (95%)	29/40 (72,5%)	33/40 (82,5%)	29/31 (93,5%)	33/38 (86,8%)
Nordeste	13/40 (32,5%)	38/40 (95%)	13/40 (32,5%)	23/40 (57,5%)	13/13 (100%)	23/38 (60,5%)
Leste	16/40 (40%)	28/40 (70%)	16/40 (40%)	11/40 (27,5%)	16/16 (100%)	11/28 (39,2%)
Noroeste	16/40 (40%)	22/40 (55%)	11/40 (27,5%)	11/40 (27,5%)	11/16 (68,7%)	11/22 (50%)

6 Discussão

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

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

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

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

Cumpridas as etapas de colonização e da análise da transmissão vertical natural dos mosquitos, partiu-se para o estudo da competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte.

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

A presença e a densidade dos vetores intensifica a necessidade de ações de controle. No entanto, um importante fato precisa ser considerado: as populações de mosquitos variam na sua permissividade para o desenvolvimento do flavivírus (Black IV WC *et al.*, 2002; Serveson DW *et al.*, 2004 e Gorrochotegui-Escalante N *et al.*, 2005). Este fenômeno é conhecido como competência vetorial, o qual está relacionado à barreiras anatômicas. Estas podem ser determinadas por fatores genotípicos e ou fenotípicos, além de outras particularidades que envolvem interações complexas entre fatores biológicos intrínsecos e extrínsecos dos vírus e do vetor, bem como fatores ambientais (Black IV *et al.*, 2002 e Bennett *et al.* 2002).

Os resultados desse trabalho, em geral, mostraram que a taxa de infecção nos corpos dos mosquitos analisados foram mais alta e que uma proporção significativa de indivíduos não desenvolveu a infecção com DENV nas cabeças até o fim do período de incubação extrínseco do vírus no vetor. Conseqüentemente, os mosquitos com infecção apenas nos corpos não estão atuando como vetores, não sendo capazes de transmitir o DENV através da alimentação sanguínea para os seus hospedeiros. Este fato variou entre as populações de *A. aegypti* das regionais, bem como, entre os anos de estudo em Belo Horizonte.

Em 2011, as infecções de corpo dos mosquitos da maioria das regionais foram mais altas que no ano de 2009, exceto para Norte e Barreiro. Entretanto, esta observação não refletiu em altas taxas de infecção nas cabeças e na competência vetorial nas mesmas regionais em 2011 quanto comparadas as taxas de 2009. Este fato sugere que a

maioria das populações de 2011 foi capaz de se infectar com o DENV mais facilmente que as populações de 2009, mas suas barreiras intrínsecas foram mais eficientes para impedir a migração do vírus para a cabeça e glândulas salivares. Observou-se que as regionais Centro-Sul, Venda Nova e Oeste apresentaram as maiores taxas de infecções nos corpos e nas cabeças nos dois anos de estudo.

Em 2009, a maioria das regionais, exceto a Noroeste, apresentaram altas taxas de infecção disseminada, acima de 80%. Percebe-se que, uma vez os mosquitos destas regionais apresentaram infecções de corpos, o vírus foi capaz de atingir as cabeças com altas taxas de infecção, permitindo que estas populações agissem como efetivos vetores para o DENV. No entanto, o mesmo fenômeno não foi observado no ano de 2011, onde somente as populações das regionais Centro-Sul, Venda Nova e Oeste mostraram altas taxas de infecção disseminada semelhantes as das populações de 2009. Provavelmente, as populações de *A. aegypti* de 2011 expressaram barreiras intrínsecas do intestino médio mais efetivas, impedindo a migração do vírus para a glândula salivar. Estes resultados também indicam que fenótipos biológicos das populações de mosquitos, os quais estão relacionados com a interação vírus/mosquitos, podem variar significativamente de anos em ano ou estação para estação. Esta diversidade pode ser explicada pelas flutuações populacionais e o fluxo de genes entre as populações de vetores. Vale destacar que, as taxas de infecção disseminada, especialmente em 2009, foram mais altas, independente da regional dos quais as populações de mosquitos foram adquiridas.

Outro fator que é importante ser considerado na dinâmica da transmissão do DENV na natureza é a manutenção vertical do vírus nas populações de vetores (transmissão transovariana) (Higgs S e Beaty BJ, 2004; Buckner EA, 2013). Considerando as altas taxas de infecção do intestino, mas as baixas taxas de infecção disseminada nas populações de *A. aegypti* de Belo Horizonte em 2011, é provável que o potencial de transmissão transovariana para a manutenção do DENV nas populações de mosquitos foi maior nos *A. aegypti* estudados em 2011 que em 2009. Em contrapartida, os mosquitos de 2009 parecem ter uma maior capacidade para transmitir o DENV através do repasto sanguíneo do que pela transmissão vertical. Relacionando este evento ao número de casos de dengue nestes dois anos de estudo: 23.332 casos em 2009 e apenas 8.529 casos em 2011, esta informação ajuda a suportar esta hipótese.

Além disto, baseado nos dados das últimas duas décadas, a endemicidade da dengue em Belo Horizonte, mostrou que o número de casos teve picos em cerca de três anos, diminuindo novamente por períodos variáveis mostrando a natureza dos ciclos epidêmico e inter-epidêmico da doença (Prefeitura de Belo Horizonte, 2014). É possível que em Belo Horizonte, a não permanência da dengue em humanos esteja relacionada à transmissão transovariana do vírus dentro das populações de *A. aegypti*, ou seja, o vetor atuando como um reservatório do DENV. Chaves *et al.* (2014), mostrou que o DENV pode ser passado pela transmissão transovariana através de no mínimo seis gerações de *A. aegypti* de uma localidade de Belo Horizonte. Mais estudos são necessários para melhor entendimento do papel da transmissão transovariana e a manutenção do DENV na natureza. Este fato levanta a questão do vetor atuar como reservatório de DENV durante períodos inter-epidêmicos.

Cada uma das nove regionais avaliadas neste estudo possuem características geográficas particulares, no entanto nenhuma destas características impede ou limita a dispersão dos *A. aegypti* o que resultaria num isolamento geográfico destas populações. Almeida *et al.* avaliou em 2007 a associação entre variáveis socioeconômicas, demográficas, infraestrutura urbana e áreas de risco classificadas de acordo com a ocorrência de dengue e a persistência da transmissão em Belo Horizonte. Observou-se neste estudo o local de incidência de 99.469 casos de dengue que foram identificados durante sete ondas epidêmicas na cidade e classificadas de acordo com sua vulnerabilidade para a transmissão da doença e caracterizada quanto as suas variáveis sócio-demográficas indicando assim a heterogeneidade do espaço urbano de Belo Horizonte.

Como já descrito na literatura, a competência vetorial é restrita ao processo de interação vetor-patógeno, é controlada por fatores genéticos e está associada com o número de barreiras anatômicas que determinam a eficiência da infecção no vetor (Beerntsen *et al.* 2000). Outros estudos também mostraram que o *A. aegypti* possui uma variação contínua em sua competência para transmitir o flavivírus (Black IV WC *et al.*, 2002; Bennett KE *et al.*, 2002; Serveson DW *et al.*, 2004; Gorrochotegui-Escalante N *et al.*, 2005). O primeiro estudo que avaliou a competência vetorial de populações de *A. aegypti* para o DENV foi realizado por Bennett *et al.* (2002). Neste estudo, os autores

analisaram a variação da competência vetorial de 24 populações de *A. aegypti* do México e Estados Unidos para o DENV-2 e demonstraram que estas populações possuíam variações significantes em suas habilidades para transmitir o DENV. Resultados semelhantes foram observados neste estudo, exceto em uma pequena área. Nós observamos variações consideráveis na competência do *A. aegypti* dentro e entre as populações analisadas em coleções de uma pequena área espacial e temporal.

Diferenças na susceptibilidade do *A. aegypti* para transmitir DENV como foram avaliadas nas nove populações de Belo Horizonte, durante 2009 e 2011, pode está relacionadas à dispersão das populações do inseto e/ou um possível acasalamento entre indivíduos das diferentes regiões. Estes resultados indicam a importância de um estudo de genética de populações para determinar a relação genética entre estas populações, bem como, uma investigação do polimorfismo genético que pode estar relacionado com a competência vetorial.

Nosso estudo apresentou resultados significantes, entretanto pesquisas adicionais serão necessárias para conduzir um melhor entendimento quanto a variabilidade na competência vetorial. Por exemplo, a correlação dos dados das taxas de infecção, taxas de infecção disseminada e competência vetorial com a epidemiologia da doença resultaria em descobertas de medidas de controle do vetor mais eficientes.

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

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

Portanto, o desenvolvimento de novas metodologias que visam auxiliar o controle do vetor e o entendimento dos mecanismos da interação vírus-vetor-homem, são de suma importância nos dias de hoje. Foi a partir daí que nosso trabalho foi desenvolvido buscando avaliar comparativamente a competência vetorial das populações de *A. aegypti* da cidade de Belo Horizonte a fim de apontar regiões onde o vetor possui a maior capacidade de transmitir o DENV, bem como, conhecer a dinâmica deste vetor dentro do município. Estes dados aumentam a importância de medidas de controle do vetor em conformidade com a competência vetorial encontrada em cada regional.

7 Conclusões

A partir dos nossos resultados podemos concluir que:

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

2-As populações de *A. aegypti* de Belo Horizonte exibiram uma ampla variação na competência do vetor para transmitir o DENV.

3-Estes dados aumentam a importância do desenvolvimento de medidas de controle de acordo com a competência vetorial encontrada em cada regional.

4-Nosso estudo foi pioneiro no Brasil e analisamos, comparativamente, a competência vetorial das populações de *A. aegypti*, das nove regionais da cidade de Belo Horizonte, para DENV-2, em dois anos de estudo, de acordo com Bennett *et al.* (2002).

8 Anexo

8.1 Artigo

RESEARCH

Open Access

Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city

Caroline M Gonçalves¹, Fabrício F Melo¹, Juliana MT Bezerra¹, Bárbara A. Chaves², Bruno M Silva², Luciana D Silva⁴, José EM Persechini⁵, Jorge R Aias⁶, Nádia FC Secundino⁷, Douglas E Nonts⁸ and Paulo FP Pimenta^{7*}

Abstract

Background: In Brazil, dengue epidemics erupt sporadically throughout the country and it is unclear if outbreaks may initiate a sustainable transmission cycle. There are few studies evaluating the ability of Brazilian *Aedes aegypti* populations to transmit dengue virus (DENV). The aim of this study was to compare DENV susceptibility of field-captured *Ae. aegypti* populations from nine distinct geographic areas of the city of Belo Horizonte in 2009 and 2011. Infection Rate (IR), Vector Competence (VC) and Disseminated Infection Rate (DIR) were determined.

Methods: *Aedes aegypti* eggs from each region were collected and reared separately in an insectary. Adult females were experimentally infected with DENV-2 and the virus was detected by qPCR in body and head samples. Data were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences version 17.

Results: IR varied from 400% to 82.5% in 2009 and 80.0% to 1000% in 2011. VC ranged from 25.0% to 37.5% in 2009 and 25.0% to 80.0% in 2011. DIR oscillated from 68.0% to 100.0% in 2009 and 384% to 86.8 in 2011. When the results were evaluated by a logistic model using IR as covariate, North, Barreiro, South-Central and Venda Nova showed the strongest association in 2009. In 2011, a similar association was observed for South-Central, Venda Nova, West and Northeast regions. Using VC as covariate, South-Central and Venda Nova showed the most relevant association in 2009. In 2011, South-Central, Venda Nova and Barreiro presented the greatest relevant associations. When DIR data were analyzed by logistic regression models, Pampulha, South-Central, Venda Nova, West, Northeast and East (2009) as well as South-Central, Venda Nova and West (2011) were the districts showing the strongest associations.

Conclusions: We conclude that *Ae. aegypti* populations from Belo Horizonte exhibit wide variation in vector competence to transmit dengue. Therefore, vector control strategies should be adapted to the available data for each region. Further analysis should be conducted to better understand the reasons for this large variability in vector competence and how these parameters correlate with epidemiological findings in subsequent years.

Keywords: Dengue virus (DENV), *Aedes aegypti*, Field population, Infection rate, Vector competence, Disseminated Infection rate

* Correspondence: pimenta@ufop.edu.br

¹ Laboratory of Medical Entomology, Federal Research Center - FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Gonçalves et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Dengue is a tropical disease and the most important mosquito-vector-borne viral infection of humans. There are approximately 50 million people infected with dengue each year and about 500,000 of these individuals are hospitalized with dengue hemorrhagic fever, mainly in the tropical and sub-tropical countries of Southeast Asia, the Pacific and the Americas. Remarkably, despite efforts aimed at control, the annual average number of dengue cases reported to The World Health Organization (WHO) has increased dramatically in recent years. Moreover, a geographic expansion of active dengue transmission has been observed over this same time period [1,2]. In 2013, countries in the Americas reported more than 2.3 million cases of dengue, with 37,692 cases of severe dengue and 1,280 deaths, resulting in a mortality rate of about 0.05%. Brazil has reported the majority of the dengue cases during the last two decades [3].

Dengue virus (DENV) is a positive-strand RNA virus (*Flavivirus*; *Flaviviridae*). The DENV complex consists of four closely related but antigenically distinct serotypes (DENV-1, -2, -3 and -4). They are transmitted by several mosquito species of the genus *Aedes* (*Stegomyia*). For all DENV serotypes *Ae. aegypti* is the primary vector. The co-circulation of the 4 serotypes increases the risk of severe forms of dengue. Six years ago, DENV-4 was detected in Manaus, the capital city of the state of Amazonas infecting patients with an acute febrile illness [4]. All four DENV serotypes are currently circulating or co-circulating in different areas of Brazil including Belo Horizonte, the city where this study was conducted. In recent years, dengue outbreaks have led to many atypical cases, including myocarditis, hepatitis, meningoencephalitis and acute kidney failure, and fatality rates have also increased [4].

The mosquito *Ae. aegypti* is distributed in subtropical and tropical areas of the globe and is now endemic in many countries. In the Americas, *Ae. aegypti* is predominantly found in urban and semi-urban areas of 25 nations and 9 territories [5], although, in recent years, its presence has also been reported in rural areas [5,6]. Most Brazilian states are infested with *Ae. aegypti* and consequently at risk of dengue transmission [4]. Due to the importance of *Ae. aegypti* as a vector of dengue and yellow fever virus, this mosquito species has been the subject of numerous studies focusing on population genetics and vector competence [7].

Aedes aegypti becomes infected when the mosquito bites and acquires an infected blood meal from a DENV-infected human, the primary host of the virus. The mosquito infection depends on factors such as DENV virulence, physical barriers and innate immunity that can confer resistance or susceptibility of an *Ae. aegypti* population. Effectively, this intrinsic permissiveness of a vector to an infection, for example, replication and transmission

of the virus to a new human host, is related to a number of anatomical barriers. The vector susceptibility will depend on completion of the DENV life cycle by crossing physical barriers, which include target organs such as the midgut, hemocoel and salivary gland [8-10]. Infectious mosquito bites after this extrinsic incubation period (EIP) can result in an infection for humans [11,12].

The transmission of DENV by *Ae. aegypti* in any geographic area depends on many factors, several of which are well defined. These include intrinsic features related to the environment and intrinsic factors associated with the virus/vector interaction including: (a) the proportion of individual mosquitoes that can be infected in a population considering presence of the virus in the insect body, which is defined as infection rate (IR); (b) the proportion of mosquitoes in which DENV can complete its life cycle (i.e., practically, virus present in the head reaching the salivary glands), which is defined as vector competence (VC) [13]; and (c) the vector's ability to transmit DENV which is more precisely related to the disseminated infection rate (DIR), which is the proportion of DENV-infected mosquito heads (VC) in an infected population with virus dispersed in the body (IR).

Overall, the epidemiological pattern of dengue disease in tropical countries is a complex phenomenon. In Brazil, dengue epidemics are still diffusing through out the country and outbreaks may or may not initiate a permanent and sustainable transmission cycle. Despite the importance of dengue as a disease that impacts millions of people, there are only a few studies evaluating the ability of Brazilian *Ae. aegypti* populations to transmit the virus. A better understanding of the relationship between DENV and mosquito vector is critical to the development of new and effective methodologies targeting the vector for control.

The goal of this work was to compare DENV susceptibility of field-captured *Ae. aegypti* populations in the city of Belo Horizonte in two years, 2009 and 2011. The city has approximately 2.3 million inhabitants and has recorded thousands of endemic cases of dengue during the last two decades, with more than 80,000 cases reported in 2013. This study focused on intrinsic factors that affect the ability of the vector to transmit DENV by comparing the IR, VC and DIR of *Ae. aegypti* populations from nine distinct geographic areas of the city. The data presented here should be taken into account in future studies aimed at understanding dengue transmission dynamics in a large urban setting and in the development of effective strategies for vector control.

Methods

Study area

The research was performed in the city of Belo Horizonte, capital of Minas Gerais, located at latitude 19°49'01",

longitude 47°57' 21" and an altitude of 858 m above sea level. The city occupies an area of 302 km², with a population of 2,375,151 inhabitants and population density of 7,867 inhabitants/km² according to the census carried out by the Brazilian Institute of Geography and Statistics in 2010 [14]. The city has a tropical climate with temperatures ranging from 18°C to 27°C and annual average of 21°C. The relative humidity remains near 65% and the average annual rainfall is approximately 1,500 mm, being more frequent from October to March [15]. The city is divided into nine administrative regions: Pampulha, Barro Preto, South-Central, Venda Nova, West, North, North-west, East and Northeast. In the present study we collected mosquitoes from all nine regions.

Mosquito collection

Aedes aegypti eggs were collected in 2009 and 2011. The collections were conducted in all districts of Belo Horizonte city. Eggs were collected with ovitraps in collaboration with the field-agents of the city's Secretary of Health, which is responsible for detecting, monitoring and controlling mosquito populations. Larvae from field-collected eggs were hatched in artificiality at a temperature of 28°C and relative humidity of 80%. The adults from each region were reared in separate cages and infection experiments were performed with 3–5 day old female mosquitoes.

Virus

The dengue virus serotype 2 used in all assays was a Brazilian strain isolated from a hemorrhagic fever patient in 1991, provided by the Molecular Microbiology and Virology Laboratory of the Esquel Dias Foundation located in Belo Horizonte. Prior to the experiments, frozen virus samples were amplified in cultures of C6/36 cells with Leibovitz-15 medium and supplements (20 µg/ml Gentamicin, 5 µg/ml Amphotericin B, 2000 U/ml Penicillin plus 2% inactivated Fetal Bovine Serum). Virus titration followed the TCID50 method [16]. The mean viral titer used in the infection experiments was 5×10^7 TCID₅₀/mL.

Experimental infection

Two hundred *Ae. aegypti* G₀ females from each of the nine districts were infected via a glass feeding device containing blood and DENV-2. Briefly, the females were covered with a skin of young *Galleria domestica*. A mixture comprising 2/3 of blood mouse (*Mus musculus*) and 1/3 of C6/36 cell suspension infected with DENV-2 was added to the feeders and offered to the mosquitoes as described elsewhere [17]. One hour after feeding, only fully engorged females were separated in cages and maintained with 10% glucose solution *ad libitum* until the 14th day after experimental infection, the time necessary for completion of the EIP.

Dissection and DENV-RNA extraction

A total of 40 infected females were randomly removed from each of the nine experimentally infected groups. They were carefully dissected under a stereoscope and their bodies and heads (always with attached salivary glands) placed in separate vials. Viral RNA was extracted from the two samples of each mosquito using the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Detection of DENV by real-time qPCR

DENV-2 detection in the body and head of *Ae. Aegypti* was facilitated using qPCR. The reaction was performed in an ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR machine (Applied Biosystems) using the Power SYBR Green RNA-to-CT 1-step detection system (Applied Biosystems). The 3' Non-coding region primers, B1-forward (5'-AGGACTYAGAGGTTAGAGGAGA-3') and B2-reverse (5'-CGYCTGTGGCCTGGAWTGAT-3') were used [18]. All analyses were performed in duplicate with standardized samples (to provide standard curves), positive control and negative control. The results were obtained using a standard curve and analyzing the melting curve for the specificity of the amplified products (~78.6°C) and to approximately CT 35, as outlined in The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) [19].

Evaluation of infection rate, vector competence and disseminated infection rate

The Infection Rate (IR) was calculated as the proportion (percentage) of all experimentally infected mosquitoes ($n = 40$) in which DENV was detected (whole body). In contrast, the Vector Competence (VC) was calculated as the proportion of all experimentally infected mosquitoes ($n = 40$) for which DENV was detected in the head/salivary glands. The analysis of vector competence was performed according to Bennett *et al.* (2002) [19]. Conceptually, the Disseminated Infection Rate (DIR) is the proportion of DENV-infected mosquito heads (VC) of all infected mosquitoes with virus (IR) in the body (DIR = VC/IR) [19].

Statistical analysis

Data were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences of IR, VC and DIR among the vector populations were evaluated using the two-tailed chi-square or Fisher's tests. Comparison of these parameters among the two years of study was performed using the two-tailed Student's *t* test (the Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit was used to assess the normality of the data). *P* values < 0.05 were considered significant. The association of each district covariate *t* with IR, VC and DIR (dependent variables) was tested by univariate analysis. All

the variables with a *P*-value of 0.25 or less were included in the full logistic regression model. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were used as an estimate of the risk. The Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test was used to evaluate the fit of the models [20].

Results

Prior to the experimental DENV-infections, sub-samples of eggs from all *Ae. aegypti* populations were screened by qRT-PCR to confirm they were negative for natural dengue virus infection. This scrutiny of possible natural infection of the mosquitoes was necessary since this study was developed with adult female mosquitoes derived from field-collected eggs from endemic areas.

Characterization of the IR, VC and DIR of the Belo Horizonte city

Analysis across all nine districts of Belo Horizonte from the two collections, revealed dissimilarities in the characteristics related to experimental DENV-infection of the *Ae. aegypti* mosquitoes. The infection rates (IR) varied from 40.0% to 82.5% (60.6 ± 8.4) in 2009 and 60.0% to 100.0% ($mean = 78.1 \pm 6.1$) in 2011. The vector competence (VC), infection of mosquito heads and salivary glands, ranged from 25.0% to 77.5% ($mean = 54.7 \pm 7.6$) in 2009 and 25.0% to 80.0% ($mean = 50.8 \pm 8.2$) in 2011. The disseminated infection rates (DIR) oscillated from 68.7% to 100.0% ($mean = 91.1 \pm 3.3$) in 2009 and 38.4% to 86.8 (52.4 ± 6.1) in 2011. Despite these differences between the two collection years, the differences were only statistically significant for the DIR ($p = 0.008$) (Figure 1).

Infection rates (proportion of DENV detected in the body related to the total number of blood-fed mosquitoes)
 In 2009, the highest IR (82.5%) was detected for *Ae. aegypti* populations from four regional districts (North,

Barrino, South-Central and Venda Nova). The lowest IR in 2009 (25.0%) was found in Pampulha. Comparative statistical analysis revealed that the IRs were significantly higher ($p < 10^{-3}$) in North, Barrino, South-Central, Venda Nova and West than in those observed in Pampulha, Northeast, East and Northwest districts. In 2011, the highest IRs were considerably higher with an IR of 100% calculated for Venda Nova, 97.5% for South-Central, and 95.0% calculated for both the West and Northeast districts. The North and Barrino districts had similar IRs (65.0%), and the lowest IR (25.0%) was calculated for Northwest. Comparative evaluation of the IR data showed that they were significantly higher ($p < 0.0003$) in South-Central, Venda Nova, West and Northeast districts compared to the North, Barrino, Pampulha, East and Northwest districts. No other significant differences were observed (Table 1).

Vector competence (proportion of DENV in the head/salivary glands of total of blood-fed mosquitoes)

For the 2009 *Ae. aegypti* populations, the highest VC was calculated for the South-Central district (77.5%) and the lowest for Pampulha district (25.0%). Comparatively, the analysis of all regional districts illustrated significantly higher VC rates ($p < 10^{-3}$) in North, Barrino, South-Central, Venda Nova and West districts than in Pampulha, Northwest, East and Northeast districts (Table 1). In 2011, the highest VC rates were higher than those determined for 2009. In 2011 the highest VC was calculated for the mosquito population from the West district (82.5%). The next highest rate was reported for populations from the South-Central and Venda Nova districts (80.0%), and the lowest VC rate was from mosquitoes from the Barrino district (25.0%). Comparatively, there were significantly higher VC ($p < 10^{-3}$) in South-Central, Venda Nova and West than in those observed in North, Barrino, Pampulha, East and Northwest. Moreover, the VC rate in the Northeast region

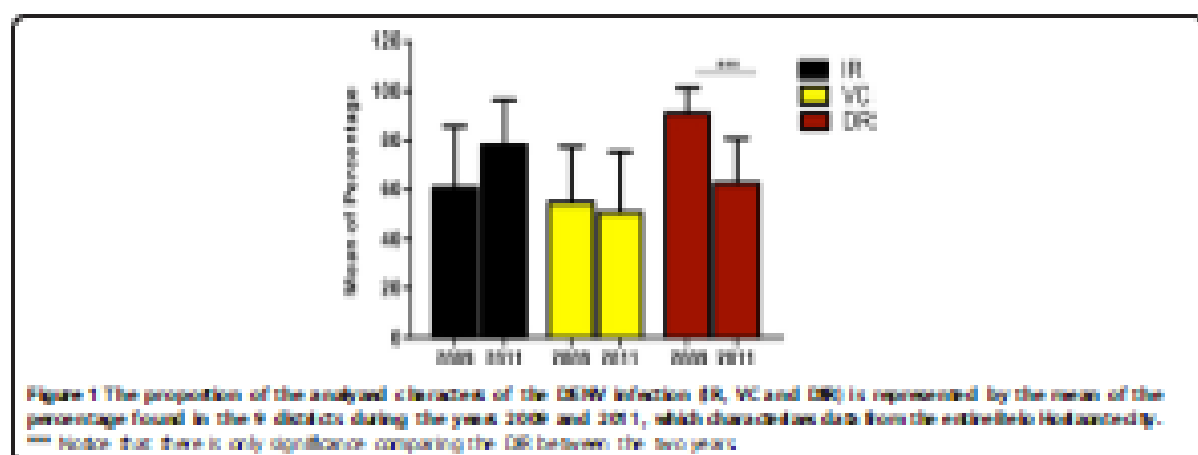


Table 1 Details of the IR, VC and DIR of the 9 regional districts

Districts	Infection rates (IR)		Vector competence (VC)		Disseminated infection rate (DIR)	
	2009	2011	2009	2011	2009	2011
North	33/40 (82.5%)	35/40 (87.5%)	26/40 (65%)	14/40 (35%)	26/33 (78.8%)	14/16 (87.5%)
Barrisiro	33/40 (82.5%)	35/40 (87.5%)	26/40 (65%)	12/40 (30%)	26/33 (78.8%)	12/16 (75%)
Pampulha	10/40 (25%)	24/40 (60%)	12/40 (30%)	12/40 (30%)	12/10 (100%)	12/14 (85.7%)
Central-South	33/40 (82.5%)	19/40 (47.5%)	21/40 (52.5%)	13/40 (32.5%)	21/33 (63.6%)	13/14 (92.9%)
Venda Nova	33/40 (82.5%)	40/40 (100%)	22/40 (55%)	13/40 (32.5%)	22/33 (66.7%)	13/16 (81.2%)
West	10/40 (25%)	35/40 (87.5%)	26/40 (65%)	33/40 (82.5%)	26/33 (78.8%)	33/36 (91.7%)
Northeast	10/40 (25%)	35/40 (87.5%)	13/40 (32.5%)	22/40 (55%)	13/13 (100%)	22/26 (84.6%)
East	16/40 (40%)	35/40 (87.5%)	16/40 (40%)	11/40 (27.5%)	16/16 (100%)	11/16 (68.8%)
Northwest	16/40 (40%)	22/40 (55%)	11/40 (27.5%)	11/40 (27.5%)	11/16 (68.8%)	11/13 (84.6%)

¹Infection rate (IR) is the proportion of DENV-infected mosquitoes (incidence of virus in the body) of the total mosquito sample (n = 40). ²The vector competence (VC) is the proportion of DENV-infected mosquito heads (incidence of virus in the salivary gland) of the total mosquito sample (n = 40). ³The disseminated infection rate (DIR) is the proportion of DENV-infected mosquito heads (VC) of an infected population (incidence of virus in the body IR).

was significantly higher ($p < 0.009$) than in Pampulha, Barrisiro, East and Northwest. No other significant differences were observed (Table 1).

Disseminated infection rate (proportion of DENV in the head/salivary glands related to the total number of mosquitoes with DENV in the body)

In 2009, the DIR was very similar among the regional districts, varying from 84.7% to 100%, except for the Northwest region for which a significantly lower DIR was calculated (68.7%) ($p < 0.001$). The mosquito populations of North, Pampulha, South-Central, Venda Nova, West, Northeast and East presented DIRs significantly higher than Barrisiro and Northwest districts ($p < 0.009$). However, this profile was not observed in 2011 when the DIR varied from 34.4% (Barrisiro) to 86.9% (West). The mosquitoes of North, Pampulha, South-Central, Venda Nova, West, and Northeast presented DIRs significantly higher than Barrisiro and East districts ($p < 0.009$) (Table 1). Figure 2 summarizes the IRs, VCs and DIRs found in all regional districts of Belo Horizonte showing plots directly superposed over the city map.

Statistical analysis of the IR, VC and DIR of the *Ae. aegypti* populations

Results were evaluated in a logistic model having the IR as covariate. In 2009, North, Barrisiro, South-Central and Venda Nova presented the strongest associations. In 2011, the same was observed for South-Central, Venda Nova, West and Northeast regions. However, considering VC as covariate, the results demonstrated the most relevant association for South-Central and Venda Nova districts in 2009. In 2011, South-Central, Venda Nova and Barrisiro regions were the ones showing the strongest associations. The Hosmer-Lemeshow test showed good fit of all models. Analysis of DIR data using logistic regression models indicated that Pampulha, South-Central,

Venda Nova, West, Northeast and East (2009) as well as South-Central, Venda Nova and West (2011) were the districts with the strongest associations. The Hosmer-Lemeshow test showed good fit of all models.

Discussion

Understanding the relationship between DENV and its vector, *Ae. aegypti*, is critical for epidemiological reasons. Government health authorities fight against the vector as the only available tool for the control of dengue disease. There are no drugs or vaccines available to cure or prevent dengue in humans at this time. The presence and density of vectors determine the intensity of the necessary vector control actions. However, an important fact must be considered: the mosquito populations vary in their permissiveness for flavivirus development [7, 21, 22]. This phenomenon is known as vector competence, which is related to the barriers encountered by the virus from its entry in the mosquito to its release in the saliva during blood feeding [6]. With this knowledge, control efforts can target mosquito populations with greater competence to transmit dengue and prevent higher risk for specific regional areas.

Our results, in general, illustrate that although infection rates in some *Ae. aegypti* populations were high, a significant proportion of individuals did not develop DENV infection of the head/salivary glands by the end of the IIP. Consequently, mosquitoes with DENV in the thorax and abdomen, but not in the head/salivary glands, were not competent vectors and would not be able to transmit viruses by bite to new vertebrate hosts such as humans. To complicate matters, this trait varied regionally among *Ae. aegypti* populations as well as between the two collection years in Belo Horizonte.

In 2011, whole body infections of mosquitoes from most regions were higher than in 2009, except for the North and Barrisiro regions. However, this observation

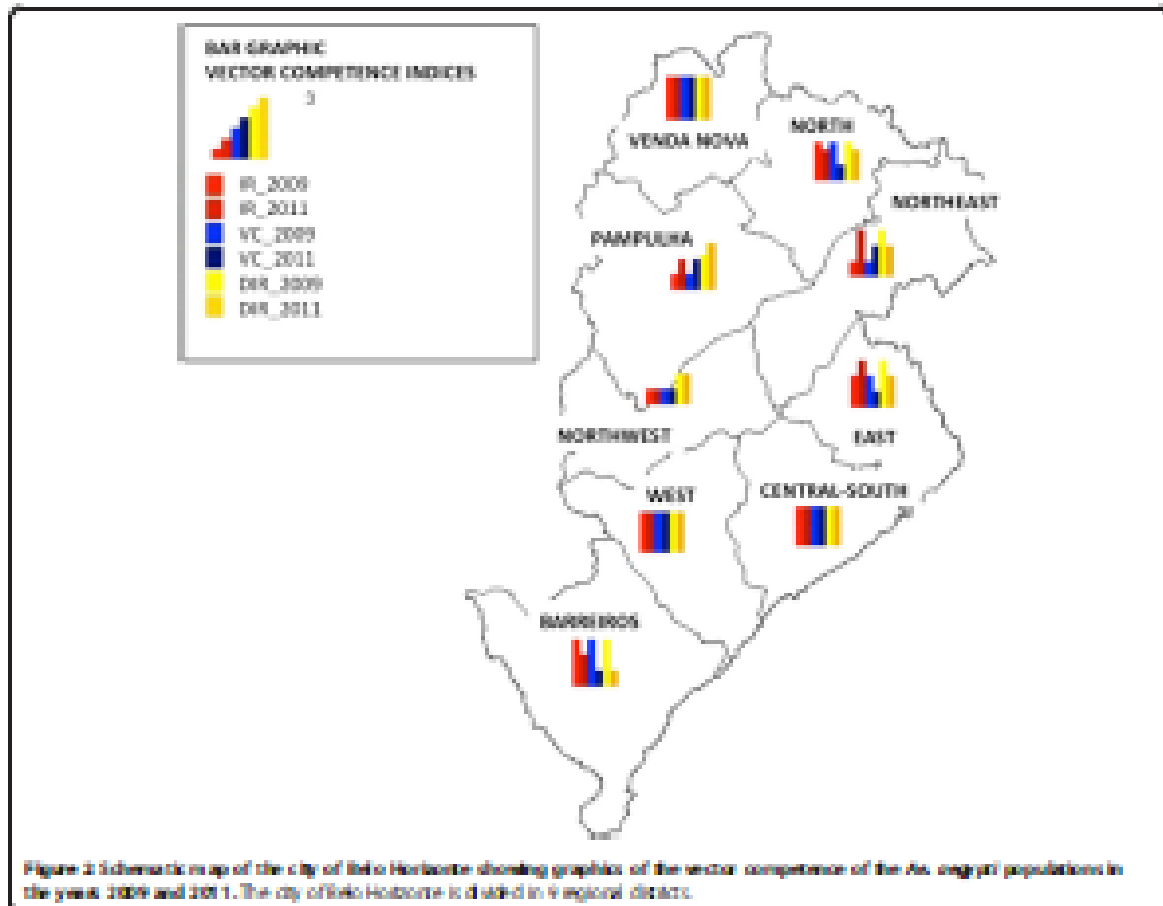


Figure 2 Schematic map of the city of Belo Horizonte showing graphics of the vector competence of the *Ae. aegypti* populations in the years 2009 and 2011. The city of Belo Horizonte is divided in 9 regional districts.

was not reflected in higher head/salivary gland infection rates or vector competence across the same regions in 2011 as compared to 2009. It would appear that most mosquito populations from 2011 were capable of acquiring the virus more efficiently than 2009 populations, but that their intrinsic barriers were more capable of blocking virus migration to the head/salivary glands. It was noticed that South-Central, Venda Nova and West regions consistently presented the highest infection rates in the body and head for both collection periods.

In 2009, most regions, except the Northwest, presented very high-disseminated infection rates, most above 80%. It seems that, once the mosquitoes from these regions acquired whole body infections, virus was capable of reaching the heads/salivary glands at high rates, likely making these populations effective vectors for the DENV. However, the same phenomena were not observed in 2011 when only the South-Central, Venda Nova and West regions showed similarly high dissemination rates. This might indicate that 2011 *Ae. aegypti* population expressed more effective intrinsic barriers to virus migration from

the body to the head/salivary gland. The findings also illustrate that biological phenotypes of mosquito populations, which are related to the mosquito-virus interaction, can vary significantly from region to region and year to year. This diversity may be explained by population fluctuations and gene flow among vector populations. It should be emphasized that the disseminated infection rates were very high, specifically in 2009, independent of the region from which the study population was acquired.

It is important to consider that besides DENV transmission to the human host by the vector (horizontal transmission), DENV is also maintained in the vector population vertically (transovarial transmission) [23-26]. Considering the higher IR but lower DR in Belo Horizonte in 2011, it appears that the potential of transovarial transmission to maintain DENV in the mosquito populations was greater in *Ae. aegypti* captured in 2011 than 2009. In contrast, the mosquito population sampled in 2009 appeared to have a greater likelihood to transmit dengue by bite to humans than to offspring. Comparison of the number of dengue cases in these two years: 23,302 cases in 2009 and

only 8,529 cases in 2011 may support this hypothesis [27]. Moreover, based on data from the last two decades, the endemicity of dengue in Belo Horizonte shows that the number of cases peaks over a 3 year period, followed by a decrease for variable periods illustrating the nature of the epidemic and inter-epidemic cycles [28]. It is possible that in this region, non-persistence of dengue in humans is related to transovarial transmission of DENV within the *Ae. aegypti* population, that the vector acts as the inter-epidemic viral reservoir. Recently, Chavez and collaborators [29] demonstrated that DENV virus could be passed by transovarial transmission through at least six generations of a population of *Ae. aegypti* originating from Belo Horizonte. An alternative hypothesis for DENV not being identified in the salivary glands is because it could not leave the midgut due to the mosquito midgut barrier, a major determinant of vector competence [19]. Further studies are necessary to better understand the role of transovarial transmission and maintenance of DENV in non-human/hot cycles during inter-epidemic years.

Other studies have also shown that *Ae. aegypti* has a continuous variation in its competence to transmit flavivirus [7,19,21,22]. The first study that evaluated the vector competence of *Ae. aegypti* populations to DENV was performed by Bennett et al. [19]. In this study, the authors analyzed the variation in vector competence of 24 *Ae. aegypti* populations from Mexico and the United States for DENV-2 and demonstrated that these populations show significant variation in their ability to transmit DENV. Similar results were observed in this study, except over a much smaller area. We observed considerable variation in vector competence within and between populations analyzed from short spatial and temporal collections.

Conclusions

Changes in *Ae. aegypti* susceptibility to transmit dengue as assessed in this nine populations, during the two collection periods, could be related to movement of the insect population and/or possible mating between the individuals from different regions. These findings illustrate the need for population genetic studies to determine the genetic relatedness of these populations, and to investigate the genetic polymorphisms that may be associated with vector competence. We report significant results from this study. However, further studies need to be conducted to better understand the variability in vector competence. For example, the correlation of ER, VC and DIER data with the epidemiology of dengue could result in findings that lead to more effective control measures. We conclude, therefore, that *Ae. aegypti* populations of Belo Horizonte exhibit a wide variation in vector competence to transmit dengue viruses. These data enhance the importance of developing vector

control measures in accordance with the vector competence found in each region.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PPP, BMS, NCS, JMM, DM and JA conceived and designed the experiments (DM, BMS and NCS), field collection and laboratory procedures (HGL, BPP, BMS and LLS), statistical data analysis (CML, PRA, BMS, LLS, BPP, PA, NCS, DM) and manuscript preparation and manuscript preparation. The manuscript is a part of the PhD thesis developed by CML and supervised by PPP and NCS. PPP and NCS are probability fellows of the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq). All authors read and approved the final version of the article.

Acknowledgements

This study was partially funded by NIH (National Institutes Foundation) (P01DA03303) (DM and PPP) and by the following Brazilian agencies: Foundation of the Institute Gonçalo Cruz (FONICUZ) (PPP and NCS); Strategic Programme for Supporting Health Research (PAPES) (PPP); Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (PPP and NCS); Thematic Programme of Support to Centers of Excellence (PRONEX-Dengue Network) (PPP and NCS); and Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG) (PPP and NCS).

Author details

¹Laboratory of Medical Entomology, Federal Research Research Center - FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ²Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. ³Municipal Health Secretariat of Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁴Department of Internal Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁵Medical Entomology, Federal Council of Medicine, Virginia, USA. ⁶Department of Molecular Entomology and Immunology, Johns Hopkins Malaria Research Institute, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.

Received: 29 April 2014 Accepted: 26 June 2014

Published: 11 July 2014

References

1. Guzman MG, Halstead SB, Atkins H, Brady P, Foster J, Sakler DJ, Hwang JH, Koenig A, Margolis HS, Mastrototone J, Nathan MB, Pebody RG, Simonsen L, Tipples G, Tseloni S, Peeling RW: Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**(suppl 1):7-16.
2. World Health Organization (WHO): *Dengue and dengue fever* (Geneva: WHO, 2010).
3. Pan American Health Organization (PAHO): <http://www.paho.org/hq/>
4. Figueiredo RM, Novaco FO, Rocha MS, Melo MB, Melo IS, Melo MMF, Costa CA, Faria P: Dengue virus Type 4, Minas Gerais, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:667-668.
5. Christoval LG: The course of Dengue. *Infect Dis* 2008, **124**:467-470.
6. Mendes-Cunha B, Black WC, Moura Mde L: Allelic variation in a possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *PLoS One* 2008, **3**:1-5.
7. Black WC, Bennett G, Brown C, Garmacheva-Hopfinger N, Hoffman Mary C, Ferenchick-Johnson J, Moura Mde L, Falcão de A, Chaves R, Brady R: Random susceptibility in *Aedes aegypti*. *Acta Tropica* 2002, **13**:33-39.
8. Hertz FC, Auer G, Stacey S, Haberman H, Mendel C, Garmacheva N, Brady R: The transmission of the dengue envelope protein: implications for virus entry and release. *Acta Tropica* 1999, **9**:33-39.
9. Huang H, Lee P-L, Chen H-H, Chen L-R, Kao C-L, Ting C-C: Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* 1999, **267**:166-167.
10. Ho L: *Poliovirus particles or dengue particles: do both enter a mosquito?* *Acta Tropica* 2008, **103**:1-10.
11. Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmore SB, Musick A: Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Tropical Hyg* 1987, **36**:1-10.
12. Schneider B, Weil A, Rietveld-Groenewald J, Chadee DD, American Df: Investigations of dengue-2 susceptibility and body size among *Aedes aegypti* populations. *Med Vet Entomol* 2007, **21**:170-176.

9 Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: MS, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf.

Buckner EA, Alto BW, Lounibos LF: Vertical Transmission of Key West Dengue-1 Virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes from Florida. *J Med Entomol* 2013, 50: 1291-1297.

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

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

Chaves BA, Secundino NFC, Melo FF, Campolina TB, Gonçalves CM, Bezerra JMT, Campanelli ES, Guedes BAM, Cecílio, AB, SilvaBM, José E M Pessanha JEM, NorrisDE, Pimenta PFP: High rate of transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* offspring associated with fluctuating vector competence suggests that the vector is also a reservoir. 2014. (*Submitted*)

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

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

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

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

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

Eiras AE. Culicidae. In: Neves DP, editor. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 355-367.

Estado de Minas.
http://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2012/04/04/interna_gerais,287164/bh-registra-primeiro-caso-de-dengue-tipo-4.shtml. 2012. Visitado no dia 20/02/2013.

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

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

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

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

Gomes I. Sistemas Naturais em áreas urbanas: estudo da Regional Barreiro, Belo Horizonte, MG. Caminhos de Geografia. 2005; 13(14): 139-150.

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

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

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

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

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

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

Higgs S, Beaty BJ. Natural cycles of vector-borne pathogens. *In: Biology of Disease Vectors*. 2nd Edition. Edited by Marquardt WC. London: Elsevier; 2004: 167-186.

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

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

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

IBGE. 2013. Cidades: Minas Gerais: Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>

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

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

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

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

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

Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, Tuiskunen A, Moureau G, Charrel R, de Lamballerie X. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *J Clin Virol.* 2009 May;45(1):61-6.

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

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

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

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

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

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

Ministério da Saúde. 2014. Programa Nacional de Combate a Dengue. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>.

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

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

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Cardoso JF, Sousa EC Jr, Nunes KN, Rodrigues SG, Abecasis AB, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg Infect Dis.* 2012 Nov;18(11):1858-64.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infect. Paris.* 2009; 11(14-15): 1177-1185.

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

Prefeitura de Belo Horizonte. 2013. Dengue. Disponível em: <http://www.pbh.gov.br/smsa/bhdengue>.

Prefeitura de Belo Horizonte. 2013. Regionais de Belo Horizonte. Disponível em: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=pbh&tax=5627&lang=pt_BR&pg=5120&taxp=0&.

Prefeitura de Belo Horizonte. 2014. Dengue. Disponível em: <http://www.pbh.gov.br/smsa/bhdengue>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Secretária de Estado de Saúde de Minas Gerais. 2013. Informe Epidemiológico sobre a Dengue. Disponível em: <http://gaia.saude.mg.gov.br>.

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

Secretária de Vigilância Sanitária - Minas Gerais. Disponível em: <http://www.combateadengue.com.br/category/noticias-dengue/page/2/>.

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

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. 1999, 8(4):5-33.

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

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg Infect Dis. 2011;17:938–40.

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

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

Torres, Eric Martínez. Dengue. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. 344 p.: ilus.; tab.; Graf.

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

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

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

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

World Health Organization (WHO). *Dengue and Severe Dengue.* 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>

