



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE  
DA AMAZÔNIA OCIDENTAL

**DETECÇÃO DE VÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA  
EM *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) NA CIDADE DE  
RIO BRANCO - ACRE**

**FABIANO ARAGÃO PACHECO**

**RIO BRANCO - AC  
2018**

**FABIANO ARAGÃO PACHECO**

**DETECÇÃO DE VÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA  
EM *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) NA CIDADE DE  
RIO BRANCO - ACRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde**.

**Orientadora:** Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Leila Priscila Peters

**RIO BRANCO - AC**

**2018**

**FABIANO ARAGÃO PACHECO**

**DETECÇÃO DE VÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA  
EM *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) NA CIDADE DE  
RIO BRANCO - ACRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde**.

**Orientadora:** Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Leila Priscila Peters

Aprovado em: 30/07/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho  
Orientadora – Universidade Federal do Acre

---

Prof. Dr. Emmerson Correa Brasil da Costa  
Membro Interno - Universidade Federal do Acre

---

Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto  
Membro Externo - Universidade Federal do Acre

Dedico este Mestrado primeiramente a Deus, que em sua infinita misericórdia me concedeu força e saúde para sempre seguir adiante mesmo nos momentos de adversidades. A minha mãe por ser minha fortaleza, desejo ter sido merecedor de todo seu esforço para me proporcionar uma boa formação.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e pelas graças que recebo a cada estação. Sabes de cada dificuldade, e em ti busco forças para superá-las.

À minha mãe e minha filha as mais amadas, por sempre estarem ao meu lado me incentivando a desenvolver o meu melhor.

Ao meu pai (*in memoriam*), por ter me proporcionado a possibilidade de uma boa formação, a vida está constantemente nos lembrando que devemos aproveitar todos os momentos densamente, sempre sem esquecer de demonstrar as pessoas o quão elas são importantes em sua vida, ainda que não mais esteja aqui, você foi muito importante para mim e certamente sentiria orgulho por mais essa minha conquista.

À minha querida Lígia, minha grande companheira, saiba que és uma ampla incentivadora das grandes decisões da minha vida, compartilho com você mais essa conquista.

À minha orientadora, Profa. Dra. Clarice Maia de Carvalho, pela amizade, pela paciência, confiança, ensinamentos e excepcional orientação prestada neste trabalho. Sua atenção, competência técnica e apoio profissional foram fundamentais. Minha amiga meu singelo agradecimento.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Leila Priscila Peters, pela suplementar orientação, apoio, por ter me estimulado a estudar e aprender, pela dedicação e muitas horas que aplicou a este trabalho. Agradeço por sua paciência, compreensão e ajuda em todos os momentos. À você, meu muitíssimo obrigado.

Ao meu amigo Marcos Venicius Malveira de Lima por seu grande incentivo para que tomasse a decisão de realizar o mestrado.

Ao Prof. Dr. Leonardo Augusto Kohara Melchior, agradeço pela voluntariedade e o tempo dedicado, sua contribuição foi fundamental para elaboração final do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, por serem continuamente solícitos e me ajudarem sempre que foi necessário.

Aos meus amigos “os diferentes”, pelo apoio e compreensão. Mesmo não podendo estar sempre juntos, sei que posso contar em qualquer circunstância.

Ao meu amigo Janis Lunier de Souza, pelo incentivo, força e vasto conhecimento em entomologia repassado, nunca me deu um não como resposta. Você é um profissional exemplar te agradeço por tudo.

À todos os amigos do Serviço de Entomologia do Departamento de Vigilância em Saúde da Prefeitura Municipal de Rio Branco, pela informações e ajuda fornecidas.

Aos Agentes de Endemia da Secretaria Municipal de Saúde de Rio Branco, pelo trabalho digno que realizam nos bairros, por essa excelência e reconhecimento da população fui bem recebido em todos os lugares onde realizei coletas, senti na pele o quão árdua é esta atividade. À vocês guerreiros obrigado.

À Prefeitura Municipal de Rio Branco nas pessoas do Prefeito à época, Marcus Alexandre Médici Aguiar Viana da Silva, e do Secretário Municipal de Saúde, Otoniel Almeida dos Santos, pela liberação de minhas atividades laborais para a realização deste estudo. Por tudo muito obrigado.

Aos meus colegas de trabalho Auditores Ficais da Divisão de Vigilância Sanitária, pelo incentivo e apoio.

Ao Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde FAPAC/SESACRE/ PPSUS MS/CNPq pelo financiamento do projeto “Detecção de Vírus Dengue, Chikungunya e Zika em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Rio Branco – Acre” coordenado pela Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho que permitiu a execução desta dissertação.

À coordenação do mestrado em Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental, na pessoa de seu Coordenador Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva, pela excelência na organização e transparência do trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, meus agradecimentos.

PACHECO, Fabiano Aragão. **Detecção de Vírus Dengue, Chikungunya e Zika em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Rio Branco – Acre.** 2018. 61 fl. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.

## RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é originário da África, pertencente à família Culicidae, considerado como importante vetor de doenças por possuir a habilidade de se adaptar às condições adversas no meio ambiente das áreas urbanas. É responsável pela transmissão de arboviroses importantes como dengue, chikungunya e Zika, doenças endêmicas, com surtos na maioria dos países das Américas. A fêmea da espécie é a única a transmitir os vírus ao homem de forma horizontal, porém admite-se também, a transmissão vertical, onde há transmissão direta no vetor a sua prole. Nesse contexto, o estudo objetivou detectar a ocorrência de vírus dengue, chikungunya e Zika em larvas de *Aedes aegypti* de ovos coletados na natureza no município de Rio Branco – Acre. As coletas foram realizadas em pontos estratégicos com armadilhas do tipo ovitrampa. Após a eclosão dos ovos, as larvas no quarto estágio, foram segregadas em *pools* com 30 unidades cada, maceradas de forma mecânica, sendo processada para a extração de RNA. A presença do genoma viral foi detectada através da técnica RT-PCR convencional utilizando oligonucleotídeos específicos para os vírus DENV, CHIKV e ZIKV. Dos 65 bairros investigados, 26 apresentaram ovitrapas com presença de ovos de *Aedes aegypti* e para detecção de vírus nessas amostras, foi utilizado o método *one-step*, para a investigação de DENV e ZIKV e o método *two-step* para detecção de CHIKV. Um e seis *pools* de larvas exibiram um resultado de peso molecular consistente com os controles positivos para DENV e CHIKV, respectivamente, com pequenas variações de similaridade em ambas as análises, nenhum *pool* apresentou paridade para o ZIKV. Assim, a transmissão vertical do DENV e do CHIKV foi observada em 3,6% e 20,7%, respectivamente, das amostras pesquisadas na cidade de Rio Branco, com a distribuição dos casos em regiões urbanas e populosas.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*; arboviroses; transmissão vertical; RT-PCR.

PACHECO, Fabiano Aragão. **Detection of Dengue, Chikungunya and Zika viruses in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the City of Rio Branco – Acre.** 2018. 61 fl. Dissertation (Master in Health Sciences in Western Amazonia) - Federal University of Acre, Rio Branco, 2018.

## ABSTRACT

*The Aedes aegypti mosquito is a member of the Culicidae family, which originated in Africa. It is regarded as an important disease vector owing to its ability to adapt to adverse conditions in urban environments. Aedes aegypti is responsible for the transmission of important arboviral diseases, such as dengue, chikungunya, and Zika, all of which are endemic to most American countries and cause outbreaks. The female mosquito is responsible for the horizontal transmission of the virus to humans; however, vertical transmission, which is direct transmission to the offspring of the vector, has also been reported. In this context, our study aimed to detect the occurrence of dengue, chikungunya, and Zika virus in Aedes aegypti larvae hatched from eggs collected in the wild within the municipality of Rio Branco – Acre. Egg collections were carried out using ovitraps at strategic points. After hatching, larvae in the fourth instar were segregated into pools containing 30 individuals, mechanically macerated, and processed for RNA extraction. Viral genomes were detected by conventional RT-PCR using oligonucleotide primers specific for DENV, CHIKV, and ZIKV viruses. Ovitrap in 26 of the 65 neighborhoods investigated contained Aedes aegypti eggs and were investigated further. In these samples, a one-step RT-PCR method was applied to the investigation of DENV and ZIKV, and a two-step method was applied for CHIKV detection. One and six larvae pools exhibited a molecular weight result consistent with the DENV- and CHIKV-positive controls, respectively, with a small similarity in variations in both analyses. No pools exhibited parity with ZIKV controls. Thus, vertical transmission of DENV and CHIKV was observed in 3.6% and 20.7% of samples surveyed in the city of Rio Branco, respectively, with positive cases distributed within urban and more populated regions.*

**Keywords:** *Aedes aegypti*; arboviral diseases; vertical transmission; RT-PCR.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - <i>Aedes aegypti</i> – mosquito adulto .....  | 16 |
| <b>Figura 2</b> - Cabeça de <i>Aedes aegypti</i> A (fêmea), B (macho). a. antena; pa. palpo maxilar; pr. probóscida. ....   | 17 |
| <b>Figura 3</b> - Desenho do esquema de multiplicação viral no vetor <i>Aedes aegypti</i> .....   | 18 |
| <b>Figura 4</b> - Ovos de <i>Aedes aegypti</i> .....  | 19 |
| <b>Figura 5</b> - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .....   | 19 |
| <b>Figura 6</b> - Diagrama mostrando regiões do genoma do DENV codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais. ....   | 21 |
| <b>Figura 7</b> - Genoma do DENV. Proteínas estruturais e não estruturais indicados pelas cores. ....   | 22 |
| <b>Figura 8</b> - Distribuição do vírus Dengue no mundo 2010 - 2015. ....   | 24 |
| <b>Figura 9</b> - Estrutura genômica do CHIKV. Proteínas estruturantes .....  | 25 |
| <b>Figura 10</b> - Distribuição do vírus Chikungunya no mundo no ano de 2018. ....  | 27 |
| <b>Figura 11</b> - Estrutura do vírus Zika e seu genoma.....  | 28 |
| <b>Figura 12</b> - Distribuição do vírus Zika no mundo passado e presente.....  | 30 |
| <b>Figura 13</b> - Mapa da cidade de Rio Branco – Acre.....   | 37 |
| <b>Figura 14</b> - Armadilha de coleta do tipo ovitrampa. ....  | 38 |
| <b>Figura 15</b> - Distribuição dos locais de instalação das armadilhas ovitrampas na cidade de Rio Branco. ....  | 43 |
| <b>Figura 16</b> - Distribuição dos locais de coleta com presença de ovos de <i>Ae. aegypti</i> e larvas.....   | 44 |
| <b>Figura 17</b> - Produto RT-PCR em gel de agarose a 2% obtidos para DENV a partir de pools de larvas de <i>Ae. aegypti</i> . ....   | 45 |
| <b>Figura 18</b> - Produto da RT-PCR em gel de agarose a 2% obtidos para CHIKV .....  | 46 |
| <b>Figura 19</b> - Produto da RT-PCR em gel de agarose a 2% obtidos para CHIKV .....  | 46 |
| <b>Figura 20</b> - Distribuição dos locais com resultado análogos ao controle positivo para presença de DENV e CHIKV em larvas de <i>Ae. aegypti</i> na cidade de Rio Branco. ... | 47 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1** - Total de ovos de *Ae. aegypti* coletados segundo bairro de instalação das ovitrampas.....39
- Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados para identificação dos vírus DENV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, ZIKV, CHIKV e seus sorotipos. ....41

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|            |  |
|------------|--|
| µL         | Microlitro   |
| cDNAs      | DNA complementares   |
| CHIKV      | Chikungunya vírus  |
| DENV 1 a 4 | Dengue vírus sorotipos 1 a 4                                   |
| DH         | Dengue Hemorrágica   |
| EBC        | Empresa Brasileira de Comunicação                              |
| FUNASA     | Fundação Nacional de Saúde                                     |
| IBGE       | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                |
| min.       | Minuto   |
| N          | Norte  |
| OMS        | Organização Mundial de Saúde                                   |
| OPAS       | Organização Pan-Americana de Saúde                             |
| RNA        | ácido ribonucleico   |
| RT-PCR     | Reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa |
| S          | Sul  |
| SCD        | Síndrome do Choque da Dengue                                   |
| SE         | Semana Epidemiológica  |
| seg.       | Segundo  |
| SGB        | Síndrome de Guillain Barré                                     |
| SINAN      | Sistema Nacional de Agravos de Notificação                     |
| UV         | ultravioleta   |
| WHO        | World Health Organization                                      |
| ZIKV       | Zika vírus   |

# SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>  | <b>16</b> |
| 2.1      | <i>Aedes aegypti</i>  | 16        |
| 2.2      | Dengue  | 21        |
| 2.3      | Chikungunya   | 25        |
| 2.4      | Zika  | 28        |
| 2.5      | Transmissão vertical (transovariana) de arbovírus em <i>Aedes aegypti</i> | 31        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>35</b> |
| 3.1      | Objetivo Geral  | 35        |
| 3.2      | Objetivos Específicos   | 35        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>36</b> |
| 4.1      | Caracterização da Área e População de Estudo                              | 36        |
| 4.2      | Coleta  | 37        |
| 4.3      | Eclosão de larvas   | 39        |
| 4.4      | Extração do ácido ribonucléico viral                                      | 40        |
| 4.5      | Transcriptase reversa seguida de reação da polimerase em cadeia           | 40        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>   | <b>43</b> |
| 5.1      | Coleta e eclosão de ovos de <i>Aedes aegypti</i>                          | 43        |
| 5.2      | Avaliação dos Oligonucleotídeos   | 44        |
| 5.3      | RT-PCR método <i>one-step</i> para detecção DENV                          | 44        |
| 5.4      | RT-PCR método <i>two-step</i> para detecção de CHIKV                      | 45        |
| 5.5      | RT-PCR método <i>one-step</i> para detecção de ZIKV                       | 47        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b>  | <b>48</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO</b>  | <b>52</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>53</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) é originário da África pertencente à família Culicidae, possui medidas inferiores a um centímetro, de cor preta com listras brancas no corpo e nas pernas, sua picada é indolor, não coça e o adulto vive em média 45 dias (SILVA; MARIANO; SCOPEL, 2008). A espécie se reproduz através da água estagnada, potável ou não, basicamente depositando seus ovos, onde eclodem, surgindo assim larvas que irão se alimentar da matéria orgânica presente na coleção líquida parada, avançando a fase de pupa e finalmente em mosquito adulto (MONTEIRO, 2016).

É possível verificar que o vetor *Ae. aegypti* está presente em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e representa uma ameaça para a saúde global, pois é eficaz em transmitir vários tipos de vírus que causam doenças, como Dengue, Chikungunya e Zika (WHO, 2017a). Estas doenças, no Brasil, estão entre as arboviroses que apresentam maior circulação transmitida pelo *Ae. aegypti* (BRASIL, 2015). Os vírus causadores da Dengue e Zika pertencem à família Flaviviridae, já o vírus que ocasiona a Chikungunya está incluído na família Togaviridae (MANIERO et al., 2016).

A doença causada pelo vírus dengue (DENV), é endêmica e está presente em mais de 100 países do mundo, se estima que atualmente cerca de 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estão sob o risco da infecção pelo DENV (WHO, 2017b).

A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou sintomática. A primeira manifestação é a febre que tem duração de dois a sete dias, geralmente alta (39 a 40 °C), de início abrupto, associada à cefaleia, adinamia, mialgias, artralgias e a dor retro-orbitária (BRASIL, 2016).

Outra importante arbovirose transmitida através da picada do *Ae. aegypti* é a febre chikungunya causada pelo vírus chikungunya (CHIKV), cuja difusão a exemplo da dengue ocorre pela picada de fêmeas dos mosquitos *Ae. aegypti* contaminadas pelo CHIKV (BRASIL, 2015). Quando comparada com a dengue, a chikungunya apresenta características que amplificam a disseminação da doença e aumentam as possibilidades de grandes e explosivas epidemias, entre estas características estão à maior proporção de casos sintomáticos, menor tempo de incubação intrínseca, maior

período de viremia e menor período de incubação extrínseca (DONALISIO; FREITAS, 2015).

Com relação ao vírus Zika (ZIKV), possivelmente foi introduzido no Brasil durante a Copa do Mundo de Futebol realizada no Brasil em 2014 (MANIERO et al., 2016). A importância da arbovirose causada pelo ZIKV se dá pela possibilidade do mesmo ocasionar consequências graves em recém nascidos com danos permanentes a estruturas cerebrais (KINDHAUSER et al., 2016), além de estar associada a casos de síndrome de Guillain-Barré (GBS) e diferentes complicações neurológicas como encefalite, meningoencefalite, parestesias, paralisia facial e mielite conforme associação estabelecida no surto ocorrido na Polinésia no ano de 2013 e 2014 (ARAUJO, 2016).

Nos mosquitos vetores de DENV, CHIKV e ZIKV a transmissão pode ocorrer de forma horizontal e vertical. Na transmissão horizontal, uma fêmea não infectada pode se infectar a partir do nutrimento sanguíneo de um hospedeiro contaminado por outra fêmea infectada pelo vírus (HIGGS; BEATY, 2004), Já na transmissão vertical, o vírus é transmitido da fêmea infectada do vetor para sua progênie, podendo ser do tipo transovariana com o vírus dentro do ovo ou transovo com o vírus na superfície do ovo (LAMBRECHTS; SCOTT, 2009).

A importância epidemiológica da transmissão vertical é negligenciada, a maioria dos programas de controle de mosquitos vetores preconizam suas ações ao combate do mosquito, doando pouca ou nenhuma cautela aos ovos que encontram-se espalhados no ambiente (LEANDRO, 2015).

Nesse sentido, a vigilância virológica utilizando técnicas moleculares, como a reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), têm se mostrado útil e capaz na detecção da presença de vírus em vetores a partir de ovos encontrados no meio ambiente (GUEDES et al., 2010).

Assim, em face dos surtos e epidemias de arboviroses no mundo e do problema em saúde pública que se tornou ao longo dos anos, o presente estudo objetiva detectar a ocorrência de DENV, CHIKV e ZIKV em larvas de *Aedes aegypti*, eclodidas em laboratório após a coleta de ovos no meio natural na cidade de Rio Branco – Acre.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* (Figura 1) é considerado nos dias atuais, como o mais importante vetor de doenças por possuir a habilidade de se adaptar às condições do meio ambiente nas áreas urbanas (NUNES et al., 2016). De origem africana, sugere-se que no sul do deserto do Saara, a espécie tenha se tornado antropofílica, domiciliada e adaptada ao meio produzido pelo homem (BARRETO et al., 2008). O mosquito foi introduzido no Brasil entre os séculos XVI e XIX sendo considerado erradicado em 1955 (FORATTINI, 2002). O último foco de mosquito *Ae. aegypti* foi extinto do país no dia 2 de abril daquele ano, porém, essa erradicação não foi totalmente efetiva por conta da fronteira entre os estados localizados na região Norte com países como a Venezuela e as Guianas, onde o mosquito não havia sido erradicado (MARTINS et al., 2010).

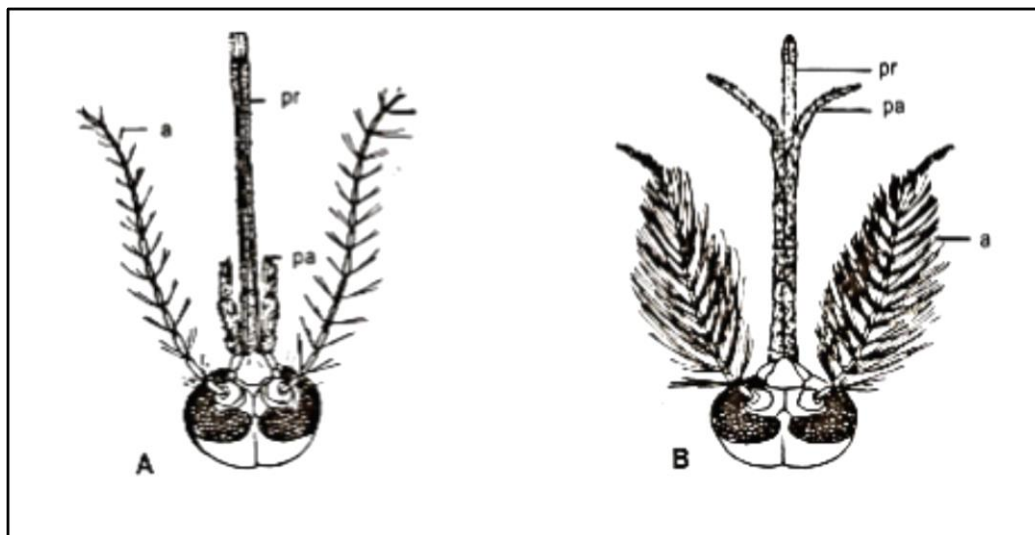


**Figura 1** - *Aedes aegypti* – mosquito adulto

Fonte: BRASIL (2016).

Na estrutura morfológica do vetor, destaca-se uma cabeça onde está inserido um par de antenas com o flagelo constituído por 15 a 16 segmentos dotados de longos pelos. Nas fêmeas (Figura 2A), os pelos são escassos, já nos machos (Figura 2B) são bastante numerosos e conferem aspecto plumoso às antenas. Possuem também palpos maxilares que têm a função sensorial, sendo inseridos lateralmente entre as

antenas e a base da probóscide, sendo nas fêmeas mais curtos que estas, já nos machos mais longos. A estrutura por completo forma um aparelho bucal do tipo picador-sugador nas fêmeas e do tipo sifonador-sugador nos machos (SOUSA, 2013).



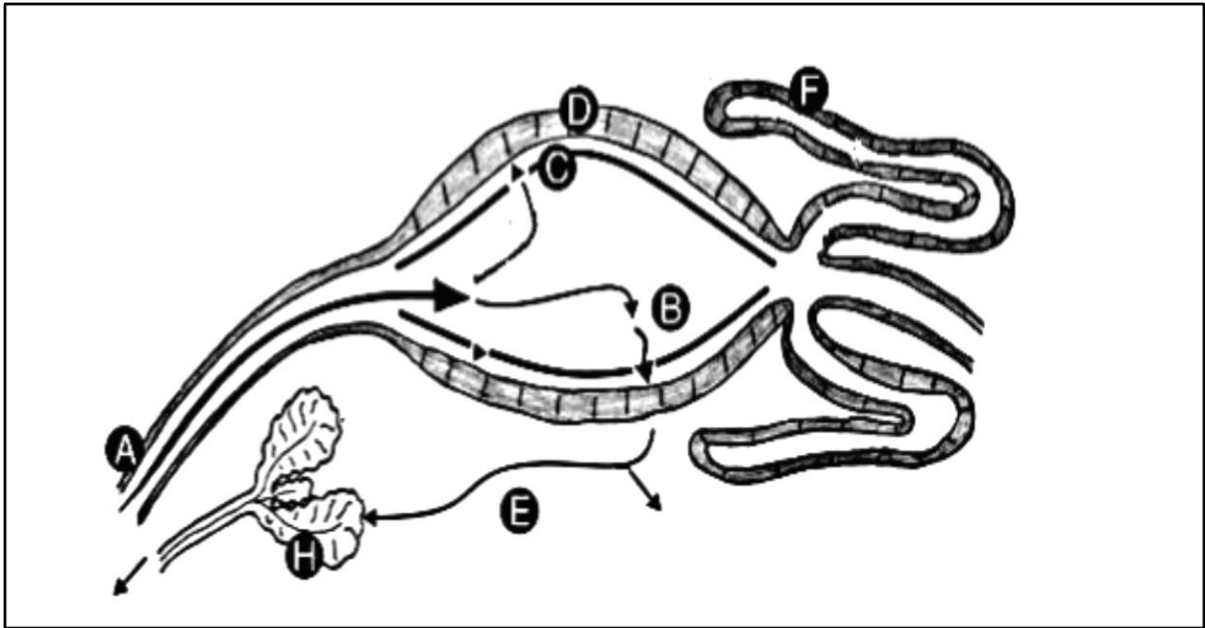
**Figura 2** - Cabeça de *Aedes aegypti* A (fêmea), B (macho). a. antena; pa. palpo maxilar; pr. probóscida.

Fonte: NEVES et al. (2005).

Tanto machos como fêmeas do *Ae. aegypti* se alimentam de substâncias açucaradas, como néctar e seiva (BARATA et al., 2001). Somente a fêmea pica o homem para sugar sangue (hematofagia), as fêmeas da espécie necessitam das proteínas presentes no sangue do hospedeiro para que ocorra a maturação dos ovos, onde a digestão do sangue fornece os aminoácidos que serão transportados para os ovários e incorporados nos oocistos (CLEMENTS, 2000). Geralmente, a hematofagia é mais voraz a partir do segundo ou terceiro dia depois da emergência da pupa e da cópula com o macho. (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2018)

Por ter preferência por sangue humano, a fêmea, ao picar um indivíduo infectado, adquire o vírus. Os vírus se replicam no intestino do vetor e se disseminam para as glândulas salivares (Figura 3) e ovários (LUPI; CARNEIRO; COELHO, 2007). Isso ocorre após o período de incubação do vírus no mosquito, que varia de 9 a 12 dias (MULLER, 2011).





**Figura 3** - Desenho do esquema de multiplicação viral no vetor *Aedes aegypti*. As letras indicam os locais de desenvolvimento viral e as setas indicam o caminho percorrido pelo patógeno dentro do inseto. Após a ingestão de sangue infectado (A) os vírus entram nas células epiteliais do intestino médio (D), se replicam e deixam estas células alcançando a hemolinfa (E) e posteriormente, podem infectar e se replicar em outros órgãos do inseto como, por exemplo, as glândulas salivares (H), onde, durante um novo repasto sanguíneo, podem infectar um hospedeiro susceptível. Neste desenho as seguintes letras indicam: (B) intestino médio (C) matriz peritrófica e (F) os túbulos de Malpighi.

Fonte: modificado de BEERNTSEN et al. (2000).

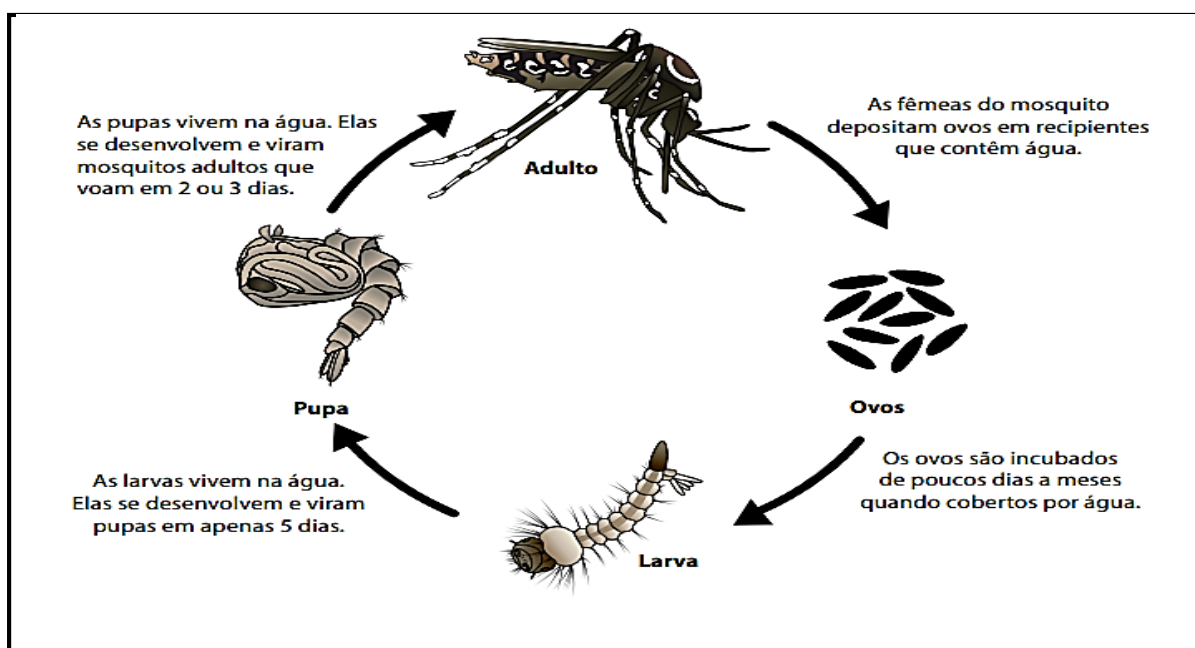
Para sua reprodução, o vetor necessita de locais sombreados e recipientes que contenham água parada (potável ou não). Estes recipientes são comumente encontrados em resíduos sólidos urbanos em domicílios, como pneus, latas, vidros, vasos, caixas d'água, cisternas, entre outros (MONTEIRO, 2016). Após achar o lugar ideal para se reproduzir, a fêmea deposita seus ovos (Figura 4) nas paredes internas e molhadas do recipiente com água, acima da linha da água, os ovos aderem-se às paredes do recipiente, podendo sobreviver secos até 8 meses (CDC, 2016).



**Figura 4 - Ovos de *Aedes aegypti***

Fonte: Elaborado pelo autor

O desenvolvimento do embrião de *Ae. aegypti* em condições ambientais favoráveis, tais como de temperatura e umidade, é completado em 48 horas (BRASIL, 2001). Quando a água cobre os ovos, eles eclodem e deles saem às larvas, posteriormente estas se desenvolvem e se tornam pupas, que também vivem na água. A partir da pupa, surge o mosquito adulto. Todo este ciclo de vida, do ovo ao mosquito adulto, dura apenas de 7 a 10 dias (Figura 5) (CDC, 2016).



**Figura 5 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti***

Fonte: CDC (2018)

A adaptação ao meio humano, a antropofilia, domiciliação e endofilia, com utilização de reservatórios antrópico, permitiu ao *Ae. aegypti* se tornar presente em grandes quantidades nas cidades e aglomerados humanos mais densos, além de ter sua disseminação orientada pelos meios de transporte (CATÃO, 2011).

O mosquito *Ae. aegypti* apresenta grande capacidade de adaptação a criadouros artificiais, o que possibilita o aumento de sua população e, por conseguinte, o aparecimento de epidemias devido ao seu hábito antropofílico (LOZOVEI; MARCONDES, 2001).

O controle de *Ae. aegypti* tem sido um desafio, uma vez que é considerado o principal vetor dos quatro sorotipos do vírus DENV circulantes no Brasil (DENV-1, DENV-2 DENV-3 e DENV-4), além de transmitir os arbovírus CHIKV e ZIKV, recém emergidos no Brasil (ZARA et al., 2016). Os Arbovírus são vírus causadores de arboviroses, sendo que sua transmissão se dá através da atividade de artrópodes hematófagos que transmitem o vírus para os seres humanos e outros animais através da picada (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

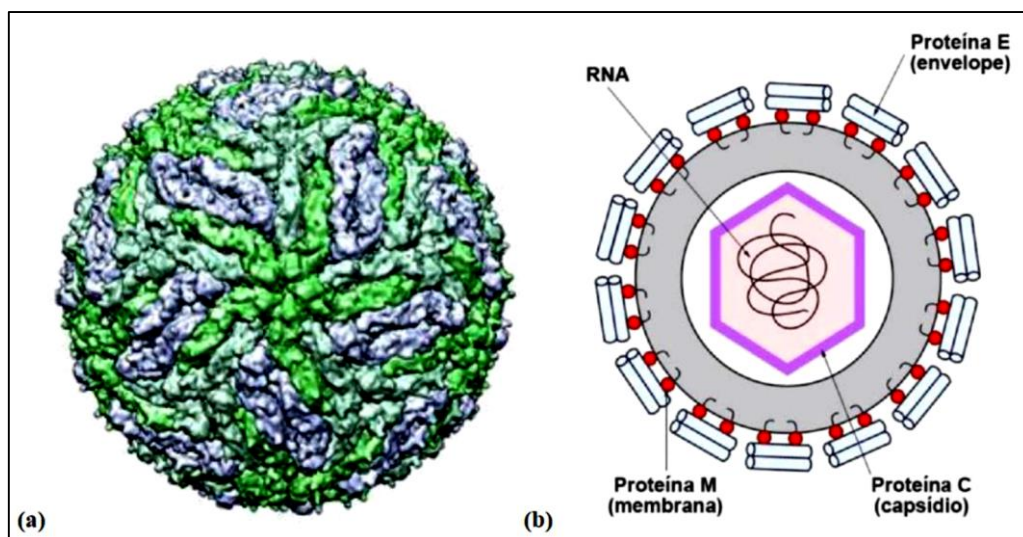
O único continente onde os arbovírus não são endêmicos é o Antártico, estes vírus tendem a ter uma distribuição geográfica e climática restrita, como parte de um subsistema ecológico especial representado pelos vírus, vetores, hospedeiros amplificadores e reservatórios (RUST, 2012).

As arboviroses são de grande relevância na saúde pública, devido a uma série de fatores, que vão desde a diversidade de agentes infecciosos envolvidos e a pluralidade de manifestações clínicas, até a inexistência de apoio laboratorial eficiente, a ausência de medidas imunoproláticas para a maioria das infecções correntes e a dificuldade na implementação e manutenção de medidas educativas e sanitárias (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Assim, a circulação de múltiplos vírus transmitidos pelo *Ae. aegypti* (DENV1-4, CHIKV, ZIKV), não havendo imunopreveníveis para todos eles, representa um cenário preocupante, aumentando em muito a busca de estratégias exitosas no controle do mosquito (MACIEL et al., 2012).

## 2.2 Dengue

O DENV, causador da dengue, é um arbovírus membro da família Flaviviridae e gênero Flavivírus, com um ssRNA (positive-sense single-stranded RNA viroses) de cadeia simples e senso positivo (LLYAAS et al., 2011), possui um genoma de 11 Kb de comprimento que contém uma única região de leitura aberta com aproximadamente 10.700 nucleotídeos variando a depender do sorotipo que codificam três proteínas estruturais: C, prM e E (Figura 6) (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004).

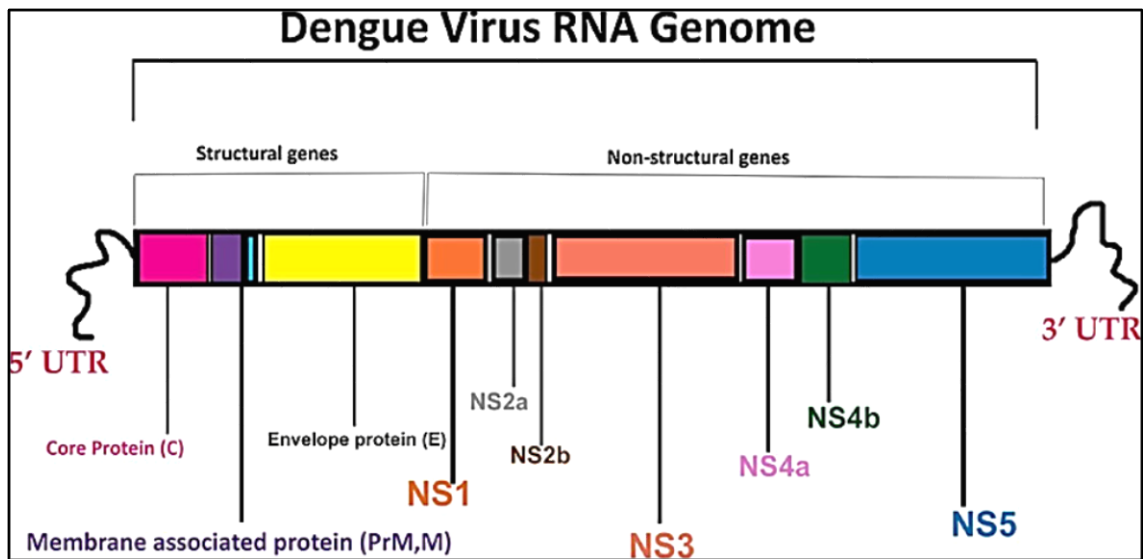


**Figura 6** - Diagrama mostrando regiões do genoma do DENV codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais. O polipeptídeo é processado em três proteínas estruturais (C, proteína do nucleocapsídeo; M, proteína associada à membrana; e E a proteína do envelope).

Fonte: Figueiredo (2013).

Além das proteínas estruturais, o DENV apresenta sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 importantes para a replicação viral e processamento do polipeptídeo, e regiões não codificantes curtas, ambas nas extremidades 5' e 3' (Figura 7) (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004).

Sendo composto por vários sorotipos (1-4), o DENV pode causar severos sintomas aos humanos semelhantes com a gripe e às vezes complicações letais como a dengue hemorrágica e a síndrome do choque, sendo ainda o principal vetor do vírus o mosquito *Ae. aegypti* (WU et al., 2010).



**Figura 7** - Genoma do DENV. Proteínas estruturais e não estruturais indicados pelas cores. Três proteínas estruturais (proteína central, proteína do envelope e proteína associada a membrana) a 5' UTR e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 a 3' UTR.

Fonte: WADOOD et al. (2017).

A doença ocasionada pelo DENV é transmitida pela picada do mosquito fêmea *Ae. aegypti* contaminada, sendo que a infecção do vetor se dá após o mesmo alimentar-se com o sangue humano de um indivíduo na fase aguda da doença (SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007).

Apesar de cinco sorotipos do DENV já terem sido identificados, somente quatro desses estão presentes no Brasil, a quinta variação, DENV-5 é encontrado no Sudeste Asiático mais precisamente nas florestas de Sarawak na Malásia (MUSTAFA et al., 2015). Quando uma pessoa é infectada por um destes vírus a sua imunidade é vitalícia para aquele sorotipo específico contraído, ocorrendo uma proteção parcial e transitória contra a infecção subsequente dos outros vírus. Porém, caso o mesmo paciente contraia um dos outros sorotipos isso aumenta o risco de doença mais grave, podendo levar o paciente à uma febre hemorrágica (LUPI; CARNEIRO; COELHO, 2007).

As manifestações clínicas da infecção por dengue começam após o tempo de incubação de 3 a 7 dias, onde a primeira fase se caracteriza por febre, seguida de um período crítico de defervescência e, por fim, a fase de recuperação (SIMMONS et al., 2012). O episódio de uma enfermidade febril inespecífica é de curta duração, cursando com faringite, rinite, tosse branda e febre baixa, sendo estes sintomas mais comuns em lactantes e crianças pré-escolares (BRASIL, 2013).

Com relação ao tratamento, por se tratar de uma doença dinâmica, que permite que o paciente evolua de um estágio a outro rapidamente, o manejo adequado depende do reconhecimento precoce de sinais de alerta, do contínuo monitoramento, re-estadiamento dos casos e da pronta tomada de condutas que garantam a estabilidade hemodinâmica e ventilatória dos pacientes, além, é claro, das medidas de apoio aos fortuitos comprometimentos orgânicos (VERDEAL et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), através da Estratégia Global para Prevenção e Controle da Dengue, a vigilância epidemiológica é o elemento fundamental na prevenção e controle desta doença (HALSTEAD, 2013).

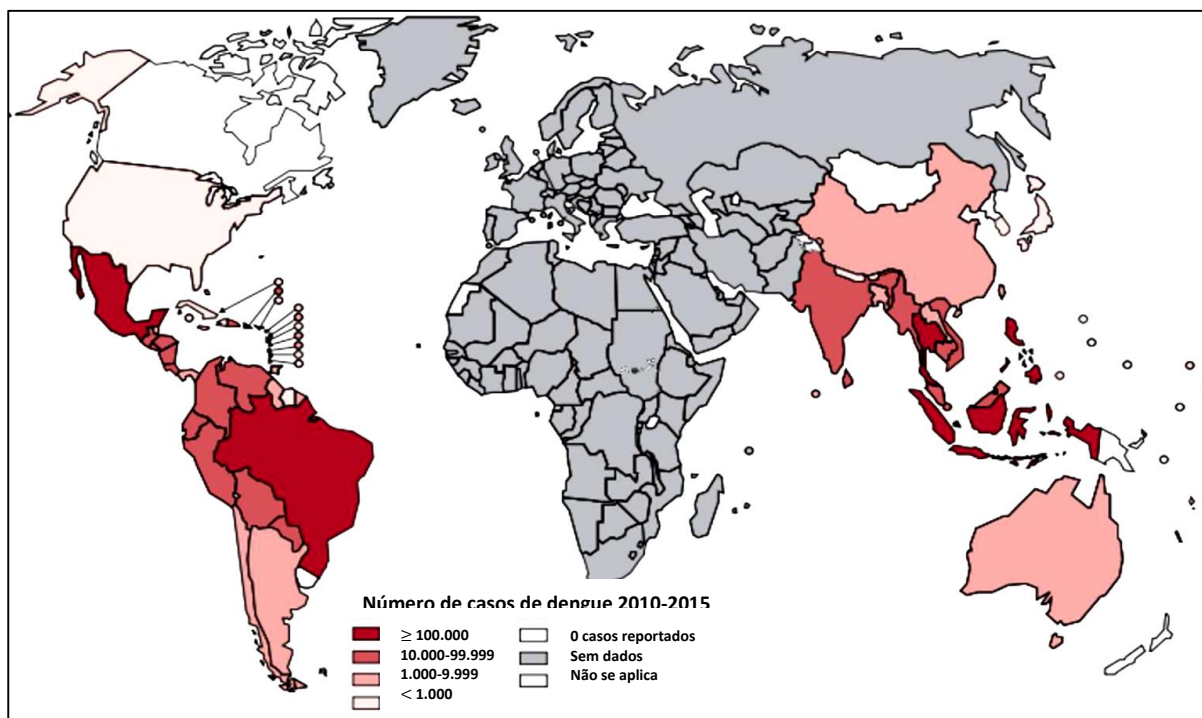
A vigilância epidemiológica é essencial, pois através do sistema de notificações, é possível planejar ações para uma determinada região endêmica para este agravo (SANTOS et al., 2016). Esta ação está inteiramente conectada ao controle do vetor *Ae. aegypti*, que é um elemento efetivo de prevenção. Assim, acabar com os focos de propagação do mosquito compõe parte eficaz da prevenção da doença (VALENTE et al., 2012). São essenciais assim, a contínua vigilância e o desenvolvimento das ações educativas na população, apontando para a importância da prevenção e controle, evitando a propagação do agravo (BRASIL, 2009).

A forma grave da doença, chamada de dengue hemorrágica (DH) ocorre geralmente após reinfecções, mas às vezes acontece após infecções primárias, especialmente em lactantes. Essas pacientes têm carga viral consideravelmente mais alta e taxa mais lenta de redução da carga viral e complexos imunes contendo vírus do que pacientes com dengue clássica (WANG et al., 2006).

A DH pode ou não se associar à síndrome do choque da dengue (SCD). O choque, nessa situação, é consequente ao grande aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma (RIGAU-PEREZ et al., 1998). Em alguns casos a SCD ocorre antes ou mesmo sem a instalação dos fenômenos hemorrágicos. Consideram-se como sinais e sintomas preditores de SCD a dor abdominal contínua, vômitos persistentes, hepatomegalia dolorosa, presença de derrames cavitários, sangramentos importantes, elevação súbita do hematócrito (THONG, 1998).

Quanto a distribuição a dengue se difunde em uma larga faixa abaixo e acima do Equador, 35° N a 35° S (Figura 8).





**Figura 8** - Distribuição do vírus Dengue no mundo 2010 - 2015.

Fonte: WHO (2016). adaptado pelo autor.

Todos os anos, 400 milhões de pessoas no mundo, tanto em regiões tropicais e subtropicais estão infectadas por DENV com taxa estimada de 21.000 mortes (BHATT et al., 2013).

Até a metade da década de 1990, o Sudeste Asiático se constituía na região do mundo mais atingida por dengue, e a partir de então, os países das Américas Central e do Sul passaram a se destacar nesse panorama e começaram a contribuir com mais da metade dos casos notificados dessa doença no mundo. Naquela década, apenas no ano de 1998, o Brasil registrou mais de 700 mil casos (TEIXEIRA; BARRETO, 2008).

No Brasil, a incidência de dengue teve um crescimento significativo na década de noventa, atingindo o nível mais elevado em 1998, quando foram oficialmente registrados cerca de 530 mil casos. Houve uma redução acentuada em 1999, com 210 mil casos, e um pequeno crescimento em 2000, quando foram notificados 240 mil casos (FUNASA, 2001).

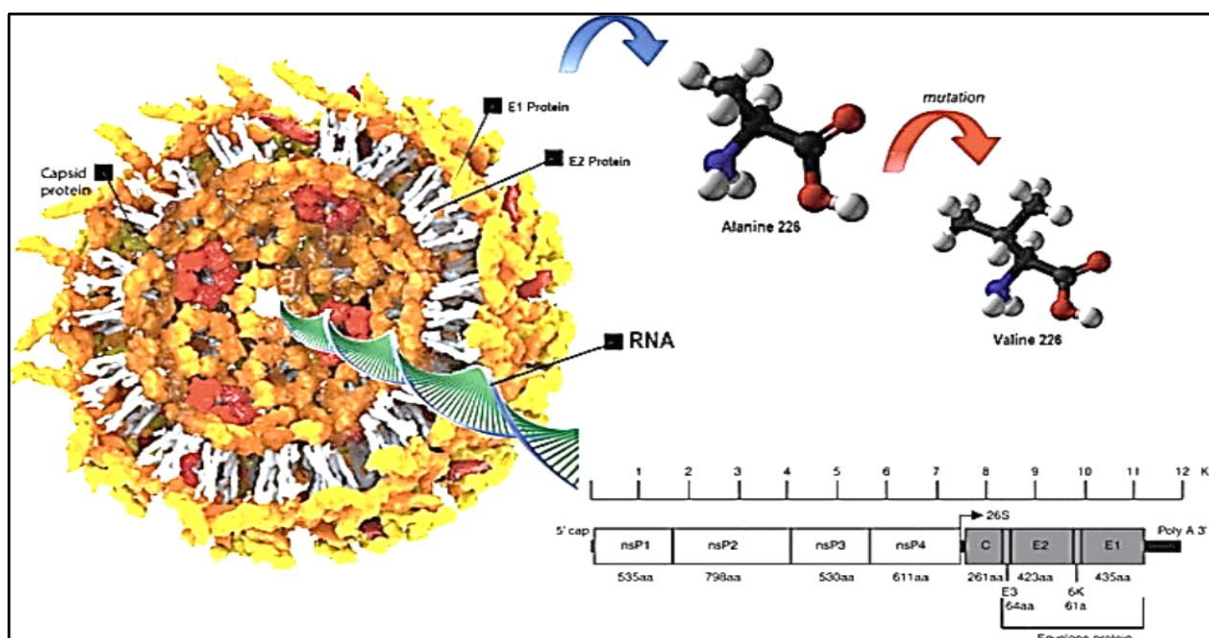
Em 2016, da Semana Epidemiológica (SE) 1 a 52, foram registrados 1.483.623 casos prováveis de dengue, e em 2017, até a SE 35, foram registrados 219.040 casos prováveis da infecção no país, com uma incidência de 106,3 casos/100 mil habitantes, e outros 183.529 casos suspeitos foram descartados (BRASIL, 2017).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em 2016 somente na cidade de Rio Branco, capital do estado do Acre, houve 5.351 casos confirmados de Dengue, sendo que 1.870 foram ratificados através de exames laboratoriais com a sorologia dos pacientes, e os 3.841 restantes, tiveram sua classificação encerrada no sistema por vínculo epidemiológico.

### 2.3 Chikungunya

Outra importante arbovirose é a Chikungunya, ocasionada pelo CHIKV, pertencente à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, originário da África, onde circula em intricados ciclos silvestres envolvendo vetores do gênero *Aedes* (NASCI, 2014).

Apresenta o tamanho de 60-70 nm, possuindo um envelope lipoprotéico no qual estão implantadas espículas glicoprotéicas virais (E1+E2). O capsídeo tem simetria icosaédrica que envolve o genoma de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples de polaridade positiva, que codifica as quatro proteínas não estruturais (NSP1-NSP4) e as três proteínas estruturais principais: capsídeo, envelopes de glicoproteínas (E1-E2) e E3 e 6k (Figura 9) (THIBERVILLE et al., 2013).



**Figura 9** - Estrutura genômica do CHIKV. Proteínas estruturantes: Proteína do capsídeo, envelope de glicoproteínas – E1 e E2. Fita simples de RNA contendo codificantes das proteínas não estruturantes NSP1 – NSP4.

Fonte: SILVA-JÚNIOR et al. (2017).



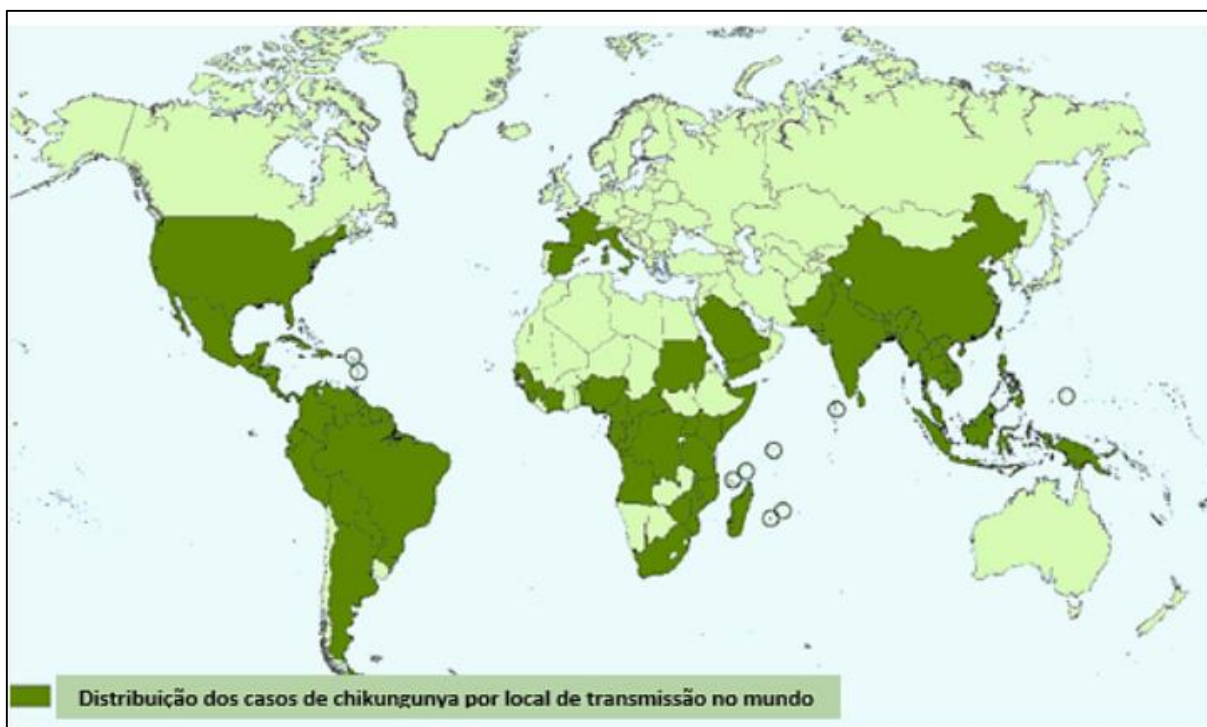
Foi isolado em 1952, na Tanzânia, sendo a primeira documentação do CHIKV ocorrido com sua introdução no Sudeste Asiático e na Índia, instalando-se em um ciclo esporádico de transmissão urbano que continua até hoje, onde *Ae. aegypti* é o principal vetor (NASCI, 2014).

Em humanos, após a infecção por CHIKV, há um período de incubação com duração de 2 a 4 dias com média de alcance de 1 a 12 dias (LAM et al., 2001). Os sintomas aparecem 4 a 7 dias após a infecção, e possui duas fases, a primeira aguda, onde os indivíduos apresentam febre alta, calafrio, cefaleia, náusea, vômito, fadiga, dor nas costas, mialgia e artralgia simétrica podendo ser intensa, afetando as extremidades, principalmente os tornozelos, punhos e falanges. Quando a dor articular persiste além do período de recuperação, tem-se a fase crônica da doença, nesta, a poliartralgia prolonga-se por semanas e até anos, compromete a qualidade de vida do paciente (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016).

Como não há terapia antiviral específica para a infecção por CHIKV, o tratamento dos casos consiste em cuidados de suporte, incluindo administração de analgésicos e anti-inflamatórios para aliviar os sintomas articulares (HONORIO et al., 2015). O objetivo do tratamento, portanto, é controlar a febre, reduzir o impacto do processo imunológico, tratar a dor, eliminar o edema além de minimizar os efeitos das erupções e evitar o aparecimento de lesões articulares crônicas (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016).

Com a recente introdução e propagação da febre chikungunya nas Américas, houve um ressurgimento no interesse da criação da vacina, que já está passando por fase de testes em animais (PLANTE et al., 2015). Neste cenário, o único meio para controlar a sua propagação é a redução na população de *Ae. aegypti* como também a limitação do contato humano com este vetor, além da implementação de programas de vigilância, utilizando como parâmetros os já existentes para o controle da dengue e a detecção viral em mosquitos e em soro de casos suspeitos (WEAVER, 2014).

Com relação à dispersão da doença, a partir de 2005 o vírus rapidamente se espalhou pelas ilhas do sudoeste do Oceano Índico, inúmeros casos importados foram notados em países ocidentais não tropicais, que continuaram a ocorrer e, em 2013, o CHIKV foi introduzido na região do Caribe (PAHO, 2014). Expandindo-se a partir 2014 para as áreas continentais das Américas (Figura 10).



**Figura 10** - Distribuição do vírus Chikungunya no mundo no ano de 2018.

Fonte: CDC (2018), adaptado pelo autor.

Apesar de quadros severos não sejam corriqueiros e não aconteçam choques ou hemorragias importantes como na dengue, manifestações neurológicas entre elas encefalite, meningoencefalite, mielite, síndrome de Guillain Barré e miocardite podem trazer gravidade aos casos, principalmente, em bebês e idosos (POWERS; LOGUE, 2007).

Estudos recentes em laboratórios revelaram o vírus em mosquitos machos, sinal de presença da transmissão vertical do vírus, apesar dos machos não transmitirem o vírus para os humanos, eles podem transmitir para as fêmeas durante o acasalamento (ROUGERON et al., 2015).

Recentemente houve uma invasão para as Américas, com mais de 1 milhão de casos registrados até 2014 (KRAEMER et al., 2015). Em 2016, no Brasil, no intervalo da SE 1 a 52, foram registrados 277.882 casos prováveis de febre chikungunya, e em 2015 foram 20.901 ocorrências.

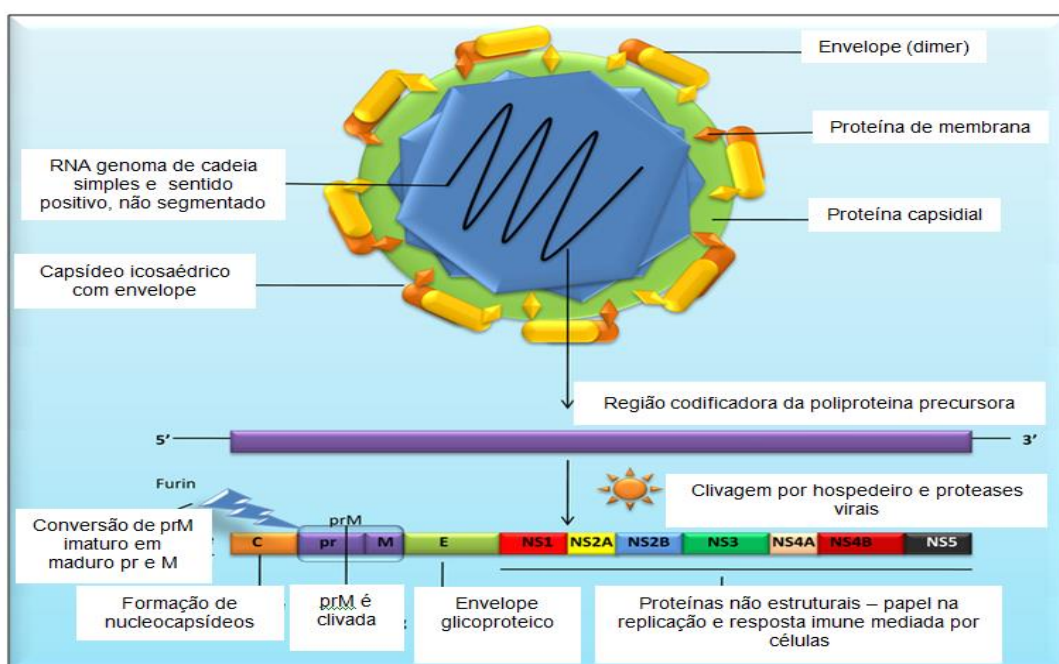
Em 2017, até a SE 35, foram registrados 171.930 casos prováveis de febre chikungunya no país, com uma incidência de 83,4 casos por 100 mil habitantes, destes, 121.734 (70,8%) foram confirmados e outros 36.334 casos suspeitos foram descartados (BRASIL, 2017). Os dados de febre chikungunya do SINAN passaram a

partir da SE 10 de 2016 a estarem disponíveis online, essas informações mostram que na cidade de Rio Branco, houve 45 casos confirmados da doença.

Apesar da baixa mortalidade a febre chikungunya como doença, leva impactos econômicos e sociais importantes, principalmente devido à produtividade humana perdida devido a incapacidade ocasionada pela doença e pela possibilidade de cronificação de seus sintomas (WEAVER et al., 2014).

## 2.4 Zika

O ZIKV, causador da doença Zika pertence à família Flaviviridae, sendo considerado um arbovírus. Apresenta três tipos de linhagem, duas de origem africana e uma de origem asiática (PINTO-JUNIOR et al., 2015). O genoma do ZIKV compreende uma molécula de RNA de sentido positivo de fita única de 10,8 kb que contém uma região não traduzida de 100 nt 5' (UTR), um único quadro de leitura de 10 kb de 420 nt 3' UTR (KUNO; CHANG, 2007). A leitura aberta do quadro codifica uma única poliproteína, que é posteriormente processada no cápsideo (C); membrana precursora (prM); proteína do envelope (E); e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 11) (SHINGH et al., 2016).



**Figura 11** - Estrutura do vírus Zika e seu genoma.

Fonte: SHINGH et al. (2016), adaptado pelo autor.

Seu vetor é o mosquito *Ae. aegypti* e foi encontrado pela primeira vez na floresta localizada em Uganda denominada Zika, por isto essa denominação (FAYE et al., 2013). O vírus foi identificado numa fêmea de macaco *Rhesus*, e a partir do seu soro, foi isolado pela primeira vez em 20 de abril de 1947 (VASCONCELOS, 2015). No entanto, apenas em 1964 foi relatado o primeiro caso da doença em seres humanos, onde um médico que trabalhava em Uganda se infectou com o vírus e realizou uma descrição clínica detalhada da sua própria infecção (HAYES, 2009).

O ZIKV pode entrar em contato com os seres vivos por intermédio da picada do mosquito *Ae. aegypti*, relações sexuais, contato com sangue infectado e de mãe para filho durante a gestação (BASARAB et al., 2016).

Com um período de incubação de 3 a 14 dias, a infecção pelo ZIKV é benigna com duração de 2 a 7 dias, sendo similar a outras infecções por arbovírus (CDC, 2016). As manifestações clínicas são inespecíficas e por essa razão, podem ser confundidas com outras doenças febris. Esse aspecto, associado ao fato de parte dos pacientes apresentarem sintomas leves e não procurarem atendimento médico e a indisponibilidade de testes diagnósticos específicos nas unidades hospitalares contribui para a subnotificação dos casos e desconhecimento da real incidência da febre pelo ZIKV (ZANLUCA et al., 2015).

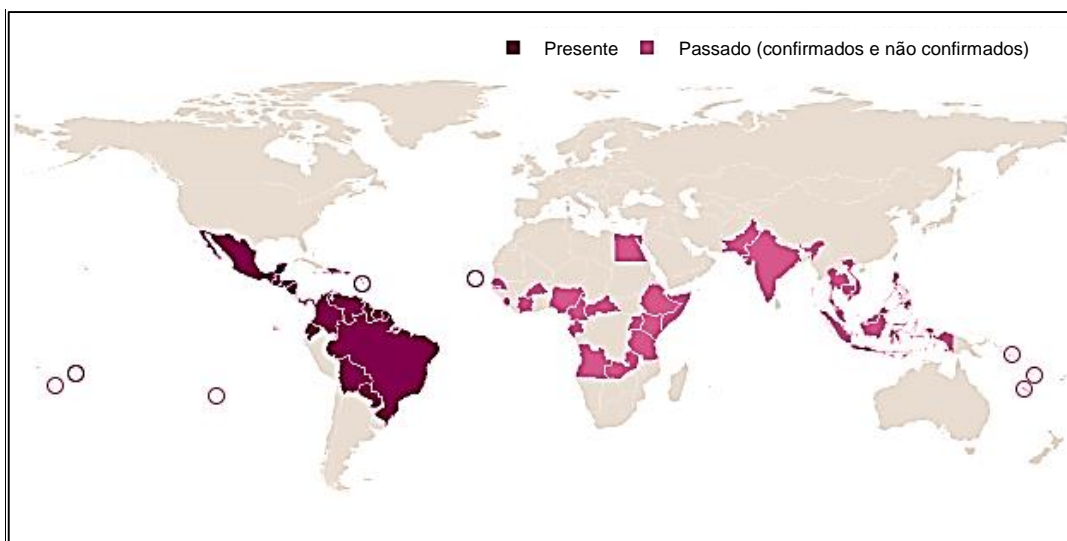
A infecção é caracterizada pela existência de um exantema maculo-papular pruriginoso com ou sem febre, associado a sinais e sintomas como conjuntivite não purulenta, poliartralgia, edema periarticular, mialgias, dor retro-ocular, vômitos e adenomegalias (DE CARVALHO et al., 2016).

A doença é geralmente rápida e não requer um tratamento específico, os indivíduos afetados devem repousar bastante, beber muitos líquidos e tratar as dores e a febre com medicamentos comuns. Não há até o momento, nenhuma vacina disponível (WHO, 2016).

A prevenção do agravo passa por algumas medidas individuais e ambientais, o combate ao vetor é altamente recomendado, evitando o ambiente propício ao seu desenvolvimento, ainda assim, por sua capacidade extraordinária de adaptação biológica, deve se considerar sua extinção difícil. As medidas ambientais incluem identificar e eliminar as áreas onde o mosquito se desenvolve, águas paradas dentro e fora de casa, pois são áreas propícias ao desenvolvimento do vetor (SCHRAM, 2016).

Embora a doença tenda a evoluir de forma favorável, há relatos de complicações neurológicas tardias, provavelmente imunomediadas, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), relatada tanto nos surtos ocorridos na Polinésia Francesa na última década, como nas epidemias recentes ocorridos no Brasil, nos estados do Rio Grande do Norte e na Bahia (ZANLUCA, 2015).

Segundo informações disponibilizadas no ano de 2017 pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), somente em 2015 quando as primeiras ocorrências de ZIKV foram registradas no país, o número de casos de microcefalia em recém nascidos registrado foi de 2.401, além de 29 óbitos ocorridos em 549 municípios brasileiros. Esses eventos foram divulgados em um boletim epidemiológico no dia 15 de dezembro de 2015, número consideravelmente maior que os 781 casos ocorridos entre os anos de 2010 a 2014 fato correlacionado com o aumento da disseminação do ZIKV no mundo (Figura 12), por ter o número majorado junto do surto do vírus Zika, há suspeita de que os dois fatos estejam ligados.



**Figura 12** - Distribuição do vírus Zika no mundo passado e presente

Fonte: CDC (2016) adaptado pelo autor

O número estimado de casos da doença no Brasil é de cerca de 1,5 milhões desde o início do surto (BASARAB et al., 2016). Em 2016, da SE 1 a SE 52, foram registrados 216.207 casos prováveis de Zika no país, sendo confirmados laboratorialmente 8 óbitos ocorridos no Rio de Janeiro (4), Espírito Santo (2), Maranhão (1) e Paraíba (1). Em 2017, até a SE 35, foram registrados 15.586 casos

prováveis de febre pelo vírus Zika no país, com taxa de incidência de 7,6 casos/100 mil hab., e destes, 6.679 (42,9%) foram confirmados (BRASIL, 2017).

Em 2016, na cidade de Rio Branco, segundo o banco de dados do SINAN, foram notificados 1.382 casos suspeitos de pacientes infectados pelo ZIKV, do total notificado foi realizada a pesquisa do vírus através da sorologia em 9% dos pacientes, com confirmação de 73 casos, que representa 68% do total analisado, outros 13 casos foram confirmados através do critério clínico-epidemiológico, totalizando 86 eventos admitidos da doença.

## **2.5 Transmissão vertical (transovariana) de arbovírus em *Aedes aegypti***

Uma das questões básicas que há muito tempo intrigam os arbovirologistas é como os arbovírus persistem durante condições ambientais adversas (períodos frios em regiões temperadas e secas quentes em zonas tropicais), quando vetores adultos, como mosquitos, estão ausentes ou em números muito baixos. A explicação para tal pergunta pode estar relacionada a transmissão vertical (transovariana) de seus vetores (THAGAMANI et al., 2016).

Nesse tipo de transmissão, a fêmea transmite o patógeno à sua progênie, sendo muito comum de ocorrer em alguns arbovírus (WOODRING; HIGGS; BEATY, 1996).

A transmissão vertical de um vírus do vetor diretamente para sua prole é um mecanismo para a sua manutenção na natureza durante condições ambientais aversas e quando a maioria dos hospedeiros vertebrados em potencial é imune, seja como resultado de imunização por vacina ou infecção natural (THAGAMANI et al., 2016).

Ao transmitir os vírus a sua prole, lhe permite uma sobrevivência, acredita-se que haja relação com sua manutenção durante o período onde há uma redução do número de mosquitos adultos ou quando diminui a quantidade de casos de infecção viral em humanos (ROSEN et al., 1983).

Existem relatos sobre a transmissão vertical viral em populações de *Ae. aegypti* dentro e fora do Brasil, sendo identificada na fase larval do mosquito, ou mesmo ainda no ovo (PESSANHA et al., 2011).

Durante a transmissão transovariana, quando as partículas virais se multiplicam em embriões latentes, o órgão envolvido na multiplicação viral pode ser considerado um importante fator na longevidade e sobrevivência daquele hospedeiro (JOSHI; MOUYRA; SHARMA, 2002).

No *Ae. aegypti*, esse mecanismo de disseminação viral pode cumprir um papel significativo na manutenção do DENV no meio ambiente, permitindo que ele resista a condições climáticas com ausência de chuvas, estações frias e ainda a ausência temporária de hospedeiros (FORATTINI, 2002; ANGEL; JOSHI, 2008). A transmissão de DENV por fêmeas de mosquitos a sua progênie tem sido sugerida desde a década de 1970, porém somente foi demonstrado na natureza em meados da década de 80 (HULL et al., 1984), e a primeira evidência veio laboratorialmente (ROSEN et al., 1983).

A compreensão da epidemiologia de arbovírus como o DENV não é completa e, em particular, de como o vírus persiste em condições desfavoráveis, numerosas hipóteses são propostas, mas a única delas efetivamente demonstrada é a existência de transmissão do vírus por seus mosquitos vetores, a transmissão vertical na natureza por sua vez, sempre estima-se ocasionalmente e sem a relevância necessária, mas este modo de transmissão pode ser mais importante do que geralmente é considerado (LE GOFF et al., 2011).

Diversos estudos realizados ao longo dos anos, demonstram que a infecção vertical está ocorrendo em *Ae. Aegypti* em uma proporção relativamente alta, favorecendo o surgimento de mosquitos já infectados com vírus como o DENV, no início de epidemias, este mecanismo pode ser responsável pela manutenção do vírus durante os períodos interepidêmicos, em áreas críticas com elevada densidade de mosquitos e incidência de doença (CRUZ et al., 2015).

Mesmo que não sejam bem quantificados, sabe-se que o período de tempo entre a detecção do RNA viral da dengue no mosquito e os primeiros casos humanos geralmente ocorre dentro de algumas semanas (LEE; ROHANI, 2005). No caso do estudo realizado por Le Goff et al. (2011), os primeiros casos da doença em humanos foram declarados e/ou identificados somente na próxima estação de transmissão, quase um ano após a presença estabelecida no vetor. Este exemplo demonstra que a transmissão vertical da dengue é subestimada em epidemias.

Assim como para DENV, os ovos de *Ae. aegypti* que resistem à dessecação, e sobrevivem por mais tempo no meio hostil, levam à possibilidade de persistência do

CHIKV no meio através da transmissão vertical (MILLER et al., 2000). O Método ouro de transmissão do CHIKV continua de longe sendo o horizontal, com o surgimento do novo genótipo ECSA do CHIKV em 2005, vários surtos foram notificados em diferentes regiões da África, Ásia e Europa, gerando muita especulação com relação ao padrão de transmissão diferente deste vírus emergente, e os trabalhos voltaram-se evidentemente para o método conhecido de difusão do vírus e o seu ciclo vetor-hospedeiro (AGARWAL et al., 2014). Contudo diferentes estudos em laboratórios demonstraram a transmissão vertical de CHIKV em distintas regiões da Ásia e África a partir de 2008, como o ocorrido na Tailândia (THAVARA et al., 2009).

Diversos estudos relatam a identificação da transmissão vertical em cenários experimentais, confirmando a existência deste padrão de difusão viral, sendo que a transmissão aparenta ser um fenômeno mais comum em mosquitos durante ciclos gonotróficos subsequentes após uma infecção arboviral (AGARWAL et al., 2014). Assim a resistência à dessecação de ovos de *Ae. aegypti*, transmissão vertical é susceptível de facilitar a sobrevivência e persistente do vírus durante períodos desfavoráveis entre as epidemias. Esta sobrevivência do vírus tem imensa implicação epidemiológica, aumentando ainda mais risco de possíveis futuros surtos (AGARWAL et al., 2014).

Em se tratando de ZIKV, este é primariamente mantido por transmissão horizontal entre mosquitos *Ae. aegypti* e humanos, como também com outros vetores *Aedes* spp (WEGER et al., 2016). Apesar desta constatação, pesquisas apontam a presença da transmissão vertical de ZIKV entre o *Ae. aegypti* e sua progênie. A taxa deste tipo de infecção por ZIKV em testes realizados em laboratórios por exemplo, varia dependendo da espécie do mosquito, da região geográfica estudada, a qualidade do vírus, o estágio de desenvolvimento do mosquito testado (imaturo ou adulto), o método do ensaio do vírus, a temperatura de criação larval, o intervalo entre a infecção inicial e a primeira refeição de sangue e o ciclo ovariano da prole examinada (THAGAMANI, 2016).

Já na natureza, o aumento exacerbado e rápido da detecção do ZIKV em uma determinada região pode estar associada a infecção de vetores através da transmissão vertical é o que demonstra o trabalho realizado por Faye et al. (2013) no período chuvoso no Sul do Senegal.

Outro estudo realizado por Ciota et al. (2017) com larvas da Argentina e México, identificou que o vírus ZIKV tem uma capacidade relativamente alta para ser



transmitido verticalmente, com uma tendência de aumento da transmissão com o tempo e ovoposição adicional. Este achado sugere que a sobrevivência e os ciclos gonotrópicos podem ser chaves determinantes do sucesso da transmissão vertical na natureza.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Detectar a presença de vírus Dengue, Chikungunya e Zika em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na cidade de Rio Branco, Estado do Acre.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Verificar a ocorrência de Vírus Dengue, Chikungunya e Zika em larvas de *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) na cidade de Rio Branco, Estado do Acre;
- Conhecer as áreas da cidade de Rio Branco com circulação de larvas de *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) infectados por Dengue, Chikungunya e Zika;
- Verificar a ocorrência da transmissão vertical de vírus Dengue, Chikungunya e Zika em larvas de *Ae. aegypti* por meio da técnica de PCR convencional;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

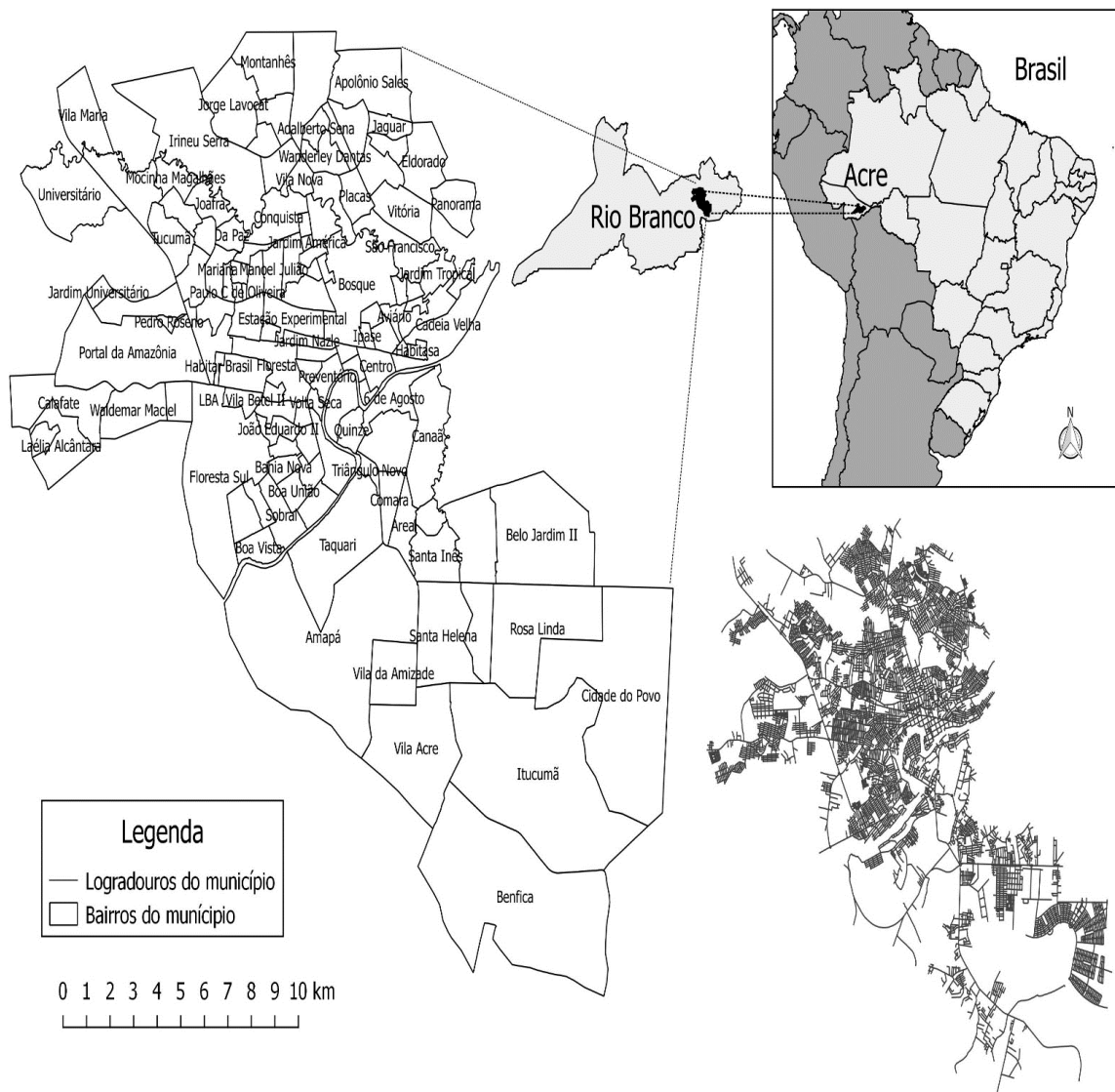
### 4.1 Caracterização da Área e População de Estudo

A cidade de Rio Branco é a capital do Estado do Acre (Figura 13), encontra-se na mesorregião do Vale do Acre e na Microrregião de Rio Branco, fazendo divisa com os municípios de Sena Madureira, Bujari e Porto Acre ao norte e Senador Guomard, Capixaba, Xapuri e Brasiléia ao sul.

A população do município em 2013 foi estimada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 357.294 habitantes, sendo o maior município do estado e apresentando uma densidade populacional de 38,73 habitantes por Km<sup>2</sup>, 48,68% da população são homens e 51,32% são mulheres, 91,82% da população vivem na zona urbana e 8,18% na zona rural (IBGE, 2010).

A cidade está dividida em 131 bairros, divididos em 10 regionais urbanas administrativas. Para a divisão das regionais se levou em consideração os problemas e potencialidades locais, infra-estrutura, equipamentos comunitários existentes, estágios de urbanização, as características geográficas e ambientais e ainda os vínculos políticos, as afinidades sociais de produção e de gênero, os anseios coletivos e as identidades culturais historicamente constituídas (DANTAS, 2010).

Assim, as regionais foram divididas com as respectivas quantificações de bairros na seguinte distribuição: Regional Baixada (16 bairros), Regional Belo Jardim (7 bairros), Regional Cadeia Velha (21 bairros), Regional Calafate (11 bairros), Regional Estação Experimental (28 bairros), Regional Floresta (10 bairros), Regional Seis de Agosto (10 bairros), Regional São Francisco (10 bairros), Regional Tancredo Neves (13 bairros) e Regional Vila Acre (5 bairros).



**Figura 13** - Mapa da cidade de Rio Branco – Acre

Fonte: Elaborado pelo autor

## 4.2 Coleta

A coleta dos ovos de *Ae. aegypti* foi realizada em 69 pontos estratégicos, como por exemplo, em borracharias, oficinas, cemitérios e depósitos de máquinas. Os pontos de coleta abrangeram um total de 65 bairros (Quadro 1) da Cidade de Rio Branco e ocorreu entre os meses de fevereiro a junho de 2018. Os endereços foram fornecidos pelo serviço de entomologia da Secretaria Municipal de Saúde.

Para a captura foi utilizado armadilhas ovitrampas (Figura13) simulando o ambiente para a procriação de *Ae. aegypti*. Essa armadilha, trata-se de um vaso preto

de 20 cm de altura e diâmetro de 15 cm, preenchido com água, sendo inserido palhetas de eucatéx mediando 17 cm x 3 cm, com um de seus lados áspero, tornando-se adequadas para a postura dos vetores fêmeas. As palhetas ficaram dispostas verticalmente no interior do vaso e presas por clips. Dentro do recipiente, foi adicionado levedo de cerveja em pó, 1g para 50mL de água e deste preparo 1mL foi misturado a 100mL de água limpa dentro da armadilha. As ovitrampas foram numericamente identificadas e permaneceram nos locais elegidos por um período de 7 dias.



**Figura 14** - Armadilha de coleta do tipo ovitrampa.

Fonte: Elaborado pelo autor

**Quadro 1** - Total de ovos de *Ae. aegypti* coletados segundo bairro de instalação das ovitrapas

| Ov. | Bairro                      | No. de ovos | Ov. | Bairro               | No. de ovos |
|-----|-----------------------------|-------------|-----|----------------------|-------------|
| 1   | Seis de agosto              | 0           | 36  | Montanhês            | 0           |
| 2   | Cidade Nova                 | 85          | 37  | São Luiz             | 0           |
| 3   | Centro 2º. Distrito         | 53          | 38  | Vila Nova            | *           |
| 4   | Quinze                      | 0           | 39  | Jorge Lavocart       | 0           |
| 5   | Nemaia                      | 0           | 40  | Jardins das Flores   | 0           |
| 6   | Canaã                       | 50          | 41  | Raimundo Melo        | 0           |
| 7   | Santa Inês                  | 0           | 42  | Placas               | 0           |
| 8   | Corrente                    | 0           | 43  | Iniciação Agrícola   | 80          |
| 9   | Lot. Luiz Augusto           | 0           | 44  | Santa Terezinha      | 0           |
| 10  | Vila Acre                   | 0           | 45  | Loteamento Flora     | 0           |
| 11  | Cadeia Velha                | 75          | 46  | Lot. Joafra          | 0           |
| 12  | Capoeira                    | 68          | 47  | Mocinha Magalhães    | 0           |
| 13  | 4º. BEF                     | 0           | 48  | Jardim Primavera     | 0           |
| 14  | Olaria João Vila            | 0           | 49  | Conj. Tangará        | 90          |
| 15  | São João                    | 0           | 50  | Ipanema              | 0           |
| 16  | Boque                       | 120         | 51  | Ipanema              | 150         |
| 17  | Bosque                      | 62          | 52  | Preventório          | 81          |
| 18  | Aviário                     | 63          | 53  | Abraão Alab          | 100         |
| 19  | Distrito Industrial         | 0           | 54  | Ivete Vargas         | 0           |
| 20  | Francisco de Oliveira Conde | 0           | 55  | Residencial Calafate | *           |
| 21  | Lot. Farhat II              | 71          | 56  | Iniciação Agrícola I | 0           |
| 22  | São Francisco               | 0           | 57  | Conj. Castelo Branco | 0           |
| 23  | Village W. Maciel           | 0           | 58  | Sobral               | 130         |
| 24  | Vila Ivonete                | 0           | 59  | Glória               | 150         |
| 25  | Jardim América              | 51          | 60  | Boa União            | 0           |
| 26  | Procon                      | 75          | 61  | Sanacre              | 0           |
| 27  | Eldorado                    | 190         | 62  | João Paulo           | 0           |
| 28  | Eldorado                    | 100         | 63  | Airton Senna         | 0           |
| 29  | Oscar Passos                | 150         | 64  | Aeroporto Velho      | 160         |
| 30  | São Francisco I             | 0           | 65  | Palheiral            | 190         |
| 31  | Conj. Adalberto Sena        | 0           | 66  | Novo Horizonte       | 0           |
| 32  | Lot. Céu Azul               | 85          | 67  | Conj. LBA            | 90          |
| 33  | Alto Alegre                 | 75          | 68  | Conj. LBA            | 200         |
| 34  | Tancredo Neves              | 0           | 69  | Floresta             | 90          |
| 35  | Irineu Serra                | 0           |     |                      |             |

Ov.= ovitrapa; Lot.=loteamento; Conj.= Conjunto. \*larvas eclodiram antes dos 7 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.3 Eclosão de larvas

Todas as técnicas e reações aplicadas neste estudo com exceção da coleta do material ocorreram no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre. As ovitrapas foram observadas em microscópio estereoscópico para confirmar a presença de ovos do mosquito *Ae. aegypti*. A eclosão ocorreu a partir dos ovos

coletados diretamente em paletas de madeira em quantidade variada. As paletas foram acomodadas em recipiente fechado por 30 dias nas condições estabelecidas (lugar seco e livre de umidade) e depois submersos em água por 4 dias. A criação das larvas ocorreu em dispositivos de plástico transparente, cobertas por uma tela de malha fina, onde era ofertada como alimento 100 mg de ração para peixe (Nutribetta), as mesmas desenvolveram-se até o quarto estágio sendo identificadas segundo a chave dicotômica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Em seguida foram lavadas por duas vezes em água destilada e separadas de acordo com o dia e local de coleta em *pools* de no máximo 30 indivíduos e congeladas ainda vivas a -80°C.

#### **4.4 Extração do ácido ribonucléico viral**

Para a extração do RNA foram feitos “*pools*” de até 30 larvas. Nesses *pools* foi adicionado *beads* de vidro e adicionado 300 µL da solução tampão PBS (livre de RNases) refrigerado. As amostras foram agitadas vigorosamente por 5 minutos e centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. A extração de RNA foi realizada utilizando Trizol (Sigma) e o Kit comercial Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Research), e a técnica realizada de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi tratado com DNase (Sigma) e foi armazenado em freezer a -80°C. A qualidade do RNA foi verificado em gel de agarose 1%.

#### **4.5 Transcriptase reversa seguida de reação da polimerase em cadeia**

Os materiais genéticos extraídos dos vírus DENV, CHIKV E ZIKV utilizados no presente estudo foram fornecidos pelo Departamento de Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Após a extração do RNA total, o material genético foi submetido a técnica de RT-PCR. Para a detecção do vírus DENV foi usado o par de *primers* D1 e D2 responsável por amplificar o gene *C-prM*, produzindo um fragmento de 511 pb (LANCIOTTI et al., 1992).

Com relação ao ZIKV, os oligonucleotídeos ZIKVENV-F e ZIKVENV-R foram utilizados para amplificar o gene *NS5*, gerando fragmento de 364 pb (FAYE et al., 2008).

Para detectar o CHIKV foram utilizados os oligonucleotídeos CHIKF e CHIKR que amplificam o gene *E1* desse vírus, produzindo fragmento de 330 pb (KUMAR et al., 2007). As sequências dos oligonucleotídeos usados nesse trabalho estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados para identificação dos vírus DENV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, ZIKV, CHIKV e seus sorotipos.

| Oligonucleotídeos | Sequência (5' – 3')                     | Fragmento (pb) |
|-------------------|---|----------------|
| D1                | 5' – TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG – 3'  | 511 pb         |
| D2                | 5' – TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC – 3' | 511 pb         |
| ZIKVENV-F         | 5' – GCTGGDGCRGACACHGGRACT – 3'         | 364 pb         |
| ZIKVENV-R         | 5' – RTCYACTGCCATYTGGRCTG – 3'          | 364 pb         |
| CHIKF             | 5' – ACCGGCGTCTACCCATTCATGT – 3'        | 325 pb         |
| CHIKR             | 5' – GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA – 3'       | 325 pb         |

Fonte: Elaborado pelo autor

Para sintetizar o cDNA nas amostras para detecção de CHIKV foi utilizado o método *two-step* com o kit comercial Superscript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen) realizando a técnica de acordo com as recomendações do fabricante. Com relação a sintetização do cDNA para a detecção do DENV e ZIKV o método *one-step* foi o elegido utilizando o kit comercial *OneStep* RT-PCR Kit (QIAGEN) seguindo igual forma as recomendações do fabricante, este consiste na transcrição e amplificação do material genético em uma única etapa realizada na mesma reação, sua vantagem com relação ao método *two-step* é pelo fato de minimizar a contaminação e o erro de pipetagem pois utiliza-se um único tubo.

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo os seguintes componentes: 4 µL do cDNA, 10 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,2 µL de cada par de oligonucleotídeos (cada par de oligonucleotídeos correspondente aos vírus DENV, ZIKV e CHIKV foram colocados separadamente na reação de PCR), 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase, 2,5 µL de tampão (Mg<sup>+</sup>) e água livre de DNase e RNase para completar o volume. A mistura foi amplificada em um termociclador – T 100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) programado para 1 ciclo de desnaturação de 95 °C por 5 min; 40 ciclos a 95 °C por 30



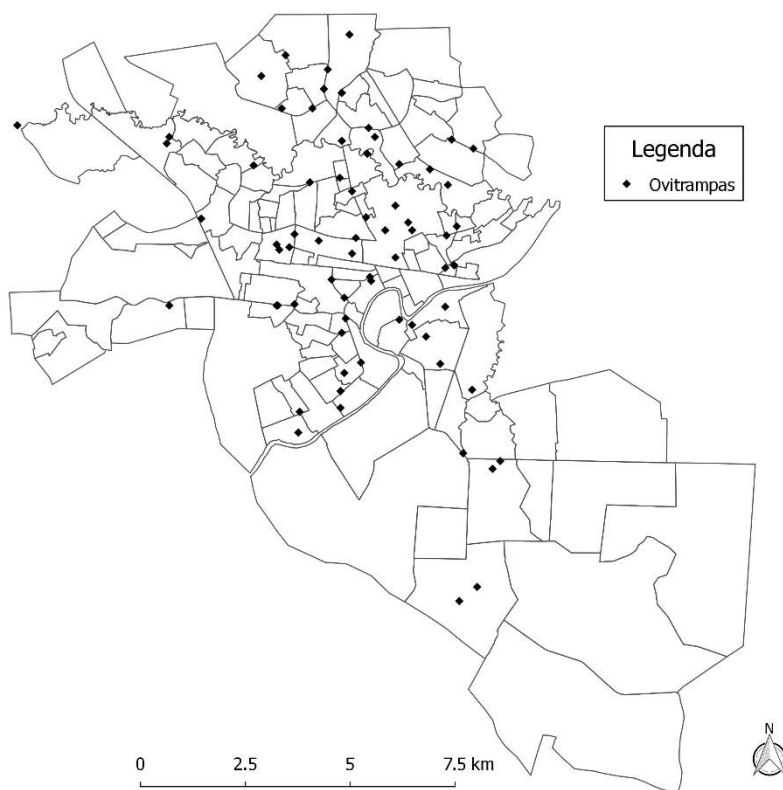
segundos; 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e 1 um ciclo final a 72 °C por 2 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% visualizado e fotografado em um fotodocumentador de luz-ultravioleta – Quantum – ST4 (VILBER LOURMAT).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Coleta e eclosão de ovos de *Aedes aegypti*

Dos 65 bairros pesquisados, 26 apresentaram ovitrampas com presença de ovos de *Aedes aegypti*, sendo coletado no total 2.966 ovos (Figura 15). Em dois pontos de coletas houve ovoposição porém, todos ovos eclodiram antes do período de 7 dias (intervalo definido para o recolhimento das armadilhas) (Figura 16).

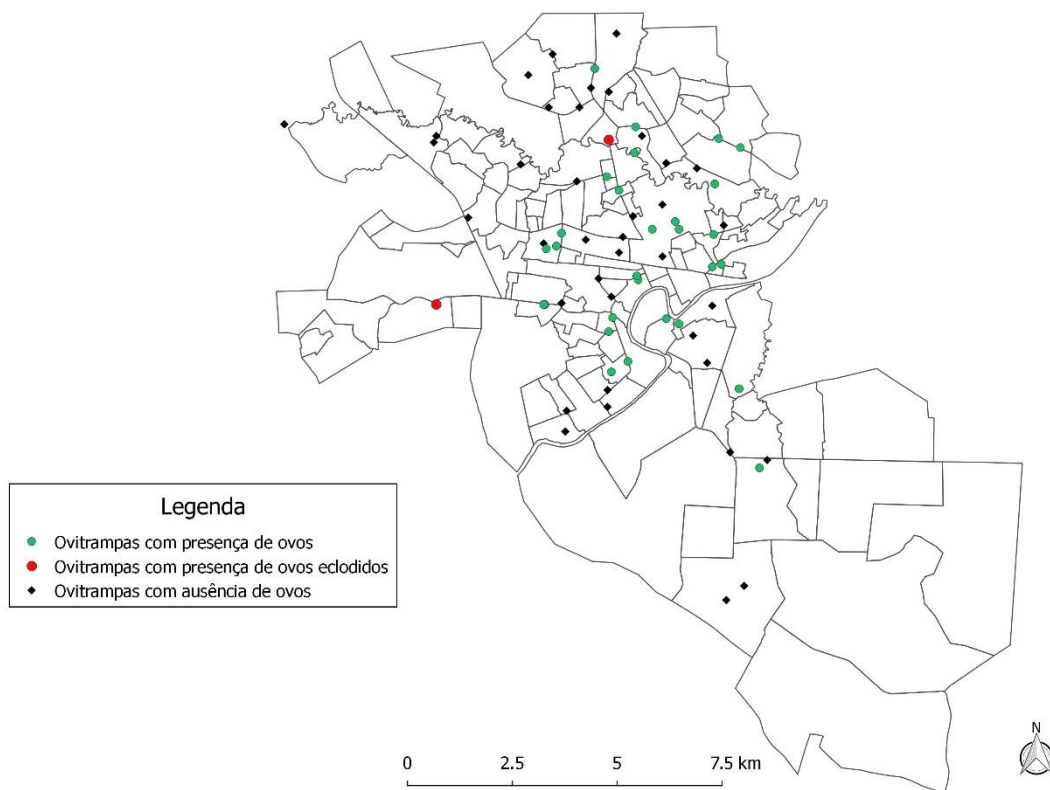


**Figura 15** - Distribuição dos locais de instalação das armadilhas ovitrampas na cidade de Rio Branco.

Fonte: Elaborado pelo autor

Das amostras coletadas, 1705 (57,4%) chegaram ao quarto estágio larval e foram separadas em 29 *pools* (870 larvas) para a realização da extração do RNA, sendo 26 *pools* de distintos bairros da cidade que apresentaram positividade para a presença de ovos e 3 *pools* (LBA, Eldorado e Bosque) com bairros repetidos (Figura 16). 12 *pools* (360 larvas) foram estocados como sobra de larvas dos supracitados

bairros e 475 larvas morreram já no quarto estágio e foram desprezadas. Os *pools* com larvas viáveis foram submetidos a congelamento em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 16** - Distribuição dos locais de coleta com presença de ovos de *Ae. aegypti* e larvas.

Fonte: Elaborado pelo autor

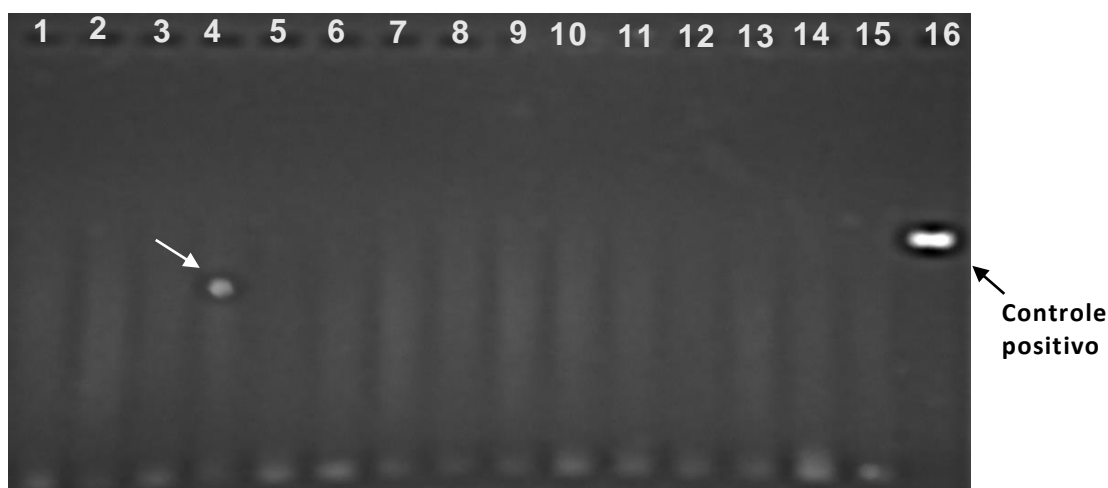
## 5.2 Avaliação dos Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo (Tabela 1), foram testados utilizando a técnica de RT-PCR convencional. O produto final amplificado foi obtido para cada par de oligonucleotídeos das reações.

## 5.3 RT-PCR método *one-step* para detecção DENV

Para detecção do DENV, foi utilizado um par de oligonucleotídeos D1 e D2 responsável por amplificar o gene *prM-C*, através do método *one step* produzindo fragmento de 511 pb.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, foi preparado dois géis para suportar a quantidade de amostras e facilitar a visualização através do transiluminador de luz-ultravioleta. No primeiro gel não foi observado presença de bandas compatíveis com a presença de DENV. O segundo gel apresentou um *pool* de larvas eclodidas a partir de ovos coletados no bairro Alto Alegre Região, Sul da cidade (Figura 20) que quando confrontado, apresentou peso molecular análogo ao controle positivo após avaliação em eletroforese, com pequena variação (Figura 17), considerado para fins de detecção como uma evidência aproximada da transmissão vertical para DENV, com posterior ratificação através de estudo do sequenciamento genético.



**Figura 17** - Produto RT-PCR em gel de agarose a 2% obtidos para DENV a partir de pools de larvas de *Ae. aegypti*. Coluna 1. Marcador de peso molecular; Coluna 4. Amostra com peso molecular análogo ao controle positivo do DENV; Colunas 2-3 e 5-14. Amostras negativas; Coluna 15. Controle negativo; Coluna 16. Controle positivo.

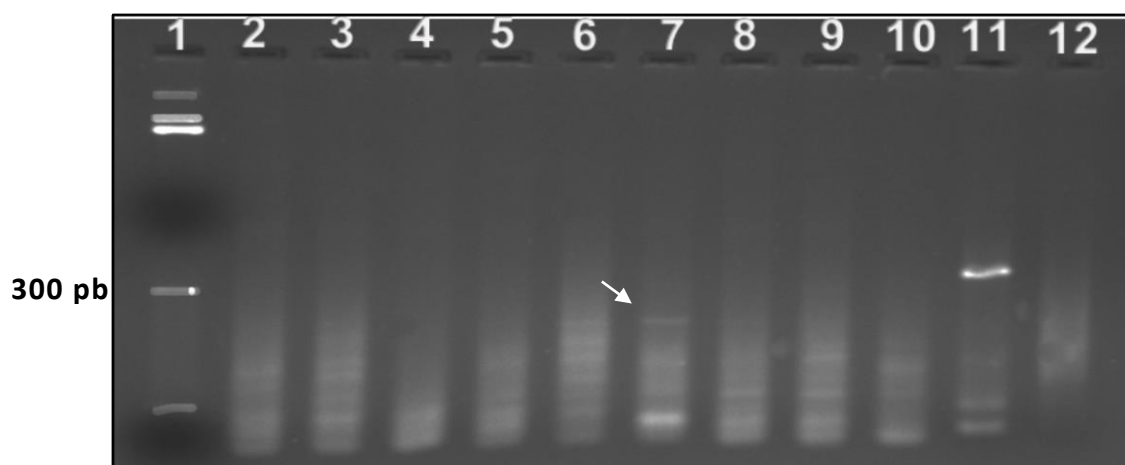
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 5.4 RT-PCR método *two-step* para detecção de CHIKV

Nessa reação foi utilizado um par de oligonucleotídeos CHIKF e CHIKR que amplificam o gene *E1* do vírus, produzindo amplicons de 330-pb. O uso dos *Primers* foi capaz de sugerir a presença de vírus Chikungunya, observando fragmentos amplificados nas amostras. Para minimizar a possibilidade de erros, a RT-PCR foi processada em 4 datas distintas com 9, 10, 5 e 8 amostras, respectivamente. Das 29 amostras analisadas, 6 (22,1%), apresentaram padrões análogos com o controle

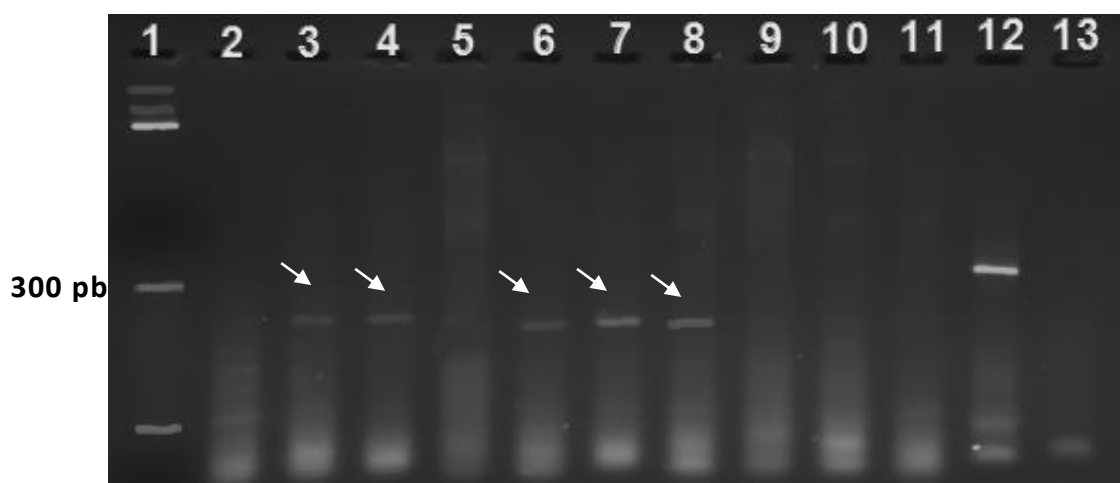
positivo para presença de CHIKV com pequena variação de similaridade, sugerindo a presença de vírus, sendo 1 no gel de 9 amostras (Figura 18) e 5 no gel de 10 amostras (Figura 19), nenhuma nos géis de 5 e 8 amostras sugeriram presença de CHIKV.

Os bairros que apresentaram amostras positivas para CHIKV foram, respectivamente, Centro do 2º Distrito, Capoeira, Bosque, Aviário, Loteamento Farhat II, Conjunto Tangará (Figura 20).



**Figura 18** - Produto da RT-PCR em gel de agarose a 2% obtidos para CHIKV. Coluna 1. Marcador de peso molecular; Coluna 7. Amostra com peso molecular análogo ao controle positivo do CHIKV; Colunas 2-6 e 8-10. Amostras negativas; Coluna 11. Controle positivo; Coluna 12. Controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor

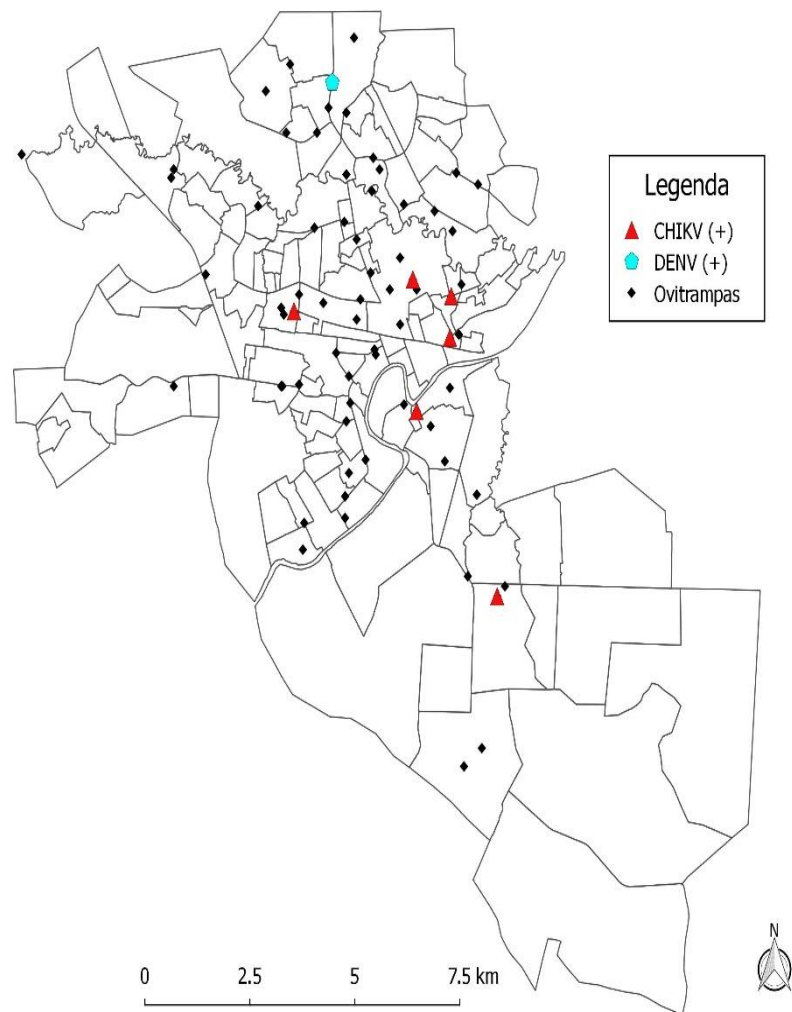


**Figura 19** - Produto da RT-PCR em gel de agarose a 2% obtidos para CHIKV. Coluna 1. Marcador de peso molecular. Colunas 3, 4, 6, 7, 8. Amostras com peso molecular análogo ao controle positivo do CHIKV. Colunas 2, 5, 9, 10, 11. Amostras negativas. Coluna 12. Controle positivo. Coluna 13. Controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor

## 5.5 RT-PCR método one-step para detecção de ZIKV

Com relação à detecção do ZIKV a técnica utilizada foi a *one-step*, com os oligonucleotídeos ZIKVENV-F e ZIKVENV-R na tentativa de amplificação do gene NS5. A análise foi dividida em dois apanhados de amostras sendo executado em diferentes dias. Em nenhuma das amostra foi detectado a presença do ZIKV.



**Figura 20** - Distribuição dos locais com resultado análogo ao controle positivo para presença de DENV e CHIKV em larvas de *Ae. aegypti* na cidade de Rio Branco.

Fonte: Elaborado pelo autor

## 6 DISCUSSÃO

O DENV, CHIKV e ZIKV são arbovírus causadores de doenças infecciosas que estão no grupo das emergentes e reemergentes e são considerados importantes desafios para a saúde pública (HONORIO et al., 2015). Apresentam como principal vetor o mosquito *Ae. aegypti*, sendo o meio de transmissão eleito, o do tipo horizontal, onde uma fêmea sensível se contamina ao longo do repasto sanguíneo no hospedeiro em fase virêmica e, após um determinado período, torna-se apta a transmitir o arbovírus em episódio conhecido como hematofagia. No entanto, alguns arbovírus também podem ser transmitidos verticalmente por seus vetores (fêmeas infectadas), que transmitem o vírus à sua progênie. A transmissão vertical em mosquitos vetores já foi constatada em diversos estudos utilizando arbovírus de grande importância médica (BOLLING et al., 2015).

Acredita-se que a transmissão vertical apresenta importante papel na sobrevivência do vírus e esteja associada com sua permanência durante o lapso temporal onde há um decréscimo na população de adultos, ou quando há diminuição ou ausência de casos de infecção viral em humanos (ROSEN et al., 1983). Nesse estudo foi analisado a capacidade de transmissão vertical natural de *Ae. aegypti* de DENV, CHIKV E ZIKV na cidade de Rio Branco, estado do Acre.

Foi possível observar com este estudo que a frequência de ovitrampas com presença de ovos de *Ae. aegypti* se mostrou bem distribuída porém com uma incidência maior nos bairros mais povoados. Com relação às médias relativas aos períodos de desenvolvimento das fases de ovo e larva, estiveram dentro do intervalo de tempo padrão observado para *Ae. aegypti* e, estão de acordo com os resultados obtidos por Beserra et al. (2006).

Estudos de verificação das taxas de transmissão vertical natural do DENV em populações de *Ae. aegypti* do sul da Índia sugerem que é frequente a detecção de DENV em mosquitos e em larvas coletados no campo (THENMOZHI et al., 2000). Embora tal situação seja descrita em vários trabalhos, a transmissão vertical natural foi observada nesta pesquisa em pequena escala 1:28 representando 3,6% das amostras analisadas. Este número indica 27,5%, 21% e 20,1% do índice encontrado em trabalhos como os de Vilela (2007) e Urdaneta et al. (2005), que obtiveram 13,2%

e 17,9% de “pools” de *Ae. aegypti* positivos respectivamente, para a detecção do genoma de DENV.

Estudo Le Goff et al. (2011) detectou na cidade de Santa Cruz (Bolívia) que a transmissão vertical do DENV pode ser encontrada em vetores no pico de um surto, bem como vários meses antes que uma epidemia ocorra na população humana, o índice deste tipo de transmissão ficou em 1% no período epidêmico se aproximando do resultado apresentado na análise deste estudo.

A positividade encontrada através da transmissão vertical nem sempre apresenta índices elevados e, muitos estudos também demonstraram sua ausência como o trabalho realizado da Cidade de Belo Horizonte (Brasil) por Gonçalves (2010). Apoiar-se ainda, com outros estudos, como o realizado no estado de Roraima (Brasil), que analisou a ocorrência de vírus dengue em larvas de *Ae. aegypti* e sua dinâmica de infestação, não se obtendo resultado positivo para o vírus em nenhum dos *pools* de larvas estudados, ou ainda com pesquisas de campo, como a realizado por Chow et al. (1998) que não detectou o vírus da dengue em 53 *pools* de larvas (de 1 a 10 indivíduos) em Cingapura, além destes, trabalho executado por Pinheiro et al. (2005), realizado na cidade de Manaus, não detectou o vírus dengue em 1.142 larvas, ambos com coletas em visitas domiciliares .

Com os dados adquiridos, fica admitido a transmissão vertical de DENV na população de *Ae. aegypti*, já verificada por Freier e Rosen (1988) e Evangelista (2003).

Embora esta pesquisa tenha detectado bandas análogas compatíveis com DENV, faz-se necessário análise através do sequenciamento genético dos fragmentos amplificados, no sentido de interpretar a mínima diferença de posição do controle positivo com o resultado encontrado nas amostras e determinar a sequência de nucleotídeos (As, Ts, Cs, e Gs).

Das 29 amostras analisadas para transmissão vertical nesta investigação, o resultado mais expressivo quanto à positividade foi à detecção de CHIKV através do método *two-step* em seis (20,7%) amostras do total estudado. Este resultado apoia o obtido por Agarwal et al. (2014) que, em ensaios de laboratórios com mosquitos previamente infectados, avaliou a transmissão vertical nas larvas destes vetores, no total de 30 *pools* de larvas 8 foram considerados positivos (26,6%).

Estudo revelou ainda presença do CHIKV em mosquitos adultos *Ae. aegypti* que emergiram de larvas na natureza no Norte da Índia, o resultado foi confirmada usando técnicas moleculares (SHINGH et al., 2016). Demonstrando a importância



deste tipo de difusão do vírus. Os resultados alcançados com CHIKV fortalecem a tese da transmissão vertical e ainda que este caminho pode desempenhar um papel decisivo para a manutenção do CHIKV no *Ae. aegypti* na natureza, particularmente durante o período interepidêmico.

Semelhante ao encontrado no DENV quanto a proximidade da banda após a síntese do cDNA, de igual modo as amostras de CHIKV apresentaram após a utilização dos primers específicos, bandas consistentes, porém com pequeno desvio na altura do controle positivo. Também de igual modo, sugere-se nesta situação o sequenciamento genômico para filogenia e a caracterização genética do vírus, por meio da ordem sequencial da região codificadora da poliproteína estrutural, com posterior análise da estrutura da proteína por meio da modelagem.

Dentre as hipóteses para esta pequena variação na altura das bandas após a síntese do cDNA na leitura por eletroforese está o tamanho e conformação do fragmento. O tamanho dos fragmentos de DNA é o fundamental fator que influencia a migração em gel de agarose. Seria dessa forma o fator crucial e alvo do diagnóstico. Uma molécula de DNA migra na matriz de agarose com mobilidade inversamente proporcional ao log<sub>10</sub> de sua massa molecular, que, por sua vez, é função do tamanho e da forma da molécula. Assim, o tamanho do fragmento do DNA em pares de base, ou seja, sua sequência linear, é o fator que, em princípio, pode influenciar a migração no gel. Entretanto, nem sempre o DNA encontra-se linear descondensado e tais fatores podem alterar a migração do fragmento no gel, pois interferem na passagem da molécula de DNA pelos poros (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Com relação ao ZIKV, não foi detectado nos *pools* de larvas analisados a presença do vírus, que implicou na ausência de transmissão vertical após a realização da técnica RT-PCR. Tal lacuna, entretanto, não sugere dizer que esse tipo de transmissão inexistia, tão somente que nas amostras examinadas não foi encontrado a presença do vírus, diferindo, por exemplo, de estudos como o realizado por Quiroga et al. (2018) no México, que identificou por RT-qPCR a transmissão vertical ao encontrar o ZIKV na saliva de *Ae. aegypti* coletados na natureza, tal achado corrobora com a pesquisa realizada por Ferreira-de-Brito (2016) na cidade do Rio de Janeiro (Brasil), onde foi constatada a presença de *pools* de mosquitos machos em regiões endêmicas da cidade, com positividade confirmada para ZIKV através da técnica RT-PCR.

Ainda ensaios realizados em laboratórios onde fêmeas de *Ae. aegypti* foram infectadas e conseguiram transmitir a sua progênie comprovam a possibilidade da transmissão vertical (LI et al., 2017). Comprovando que este tipo de difusão do vírus, trata-se de objeto que merece mais investigação luz da sua importância para a dinâmica de transmissão do ZIKV.

Esse tipo de transmissão trata-se de uma forma de manutenção da circulação dos vírus Chikungunya, Dengue e Zika na natureza, em vetores como *Ae. aegypti*, nos períodos entre as epidemias robustecendo a necessidade de pesquisas que procurem medidas de controle e prevenção tanto da população de *Ae. aegypti*.

## 7 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi confirmado a ocorrência dos vírus DENV e CHIKV, 3,6% e 20,7% nas amostras analisadas respectivamente. Não foi detectada a presença do ZIKV.

Foram instalados 69 ovitrampas em 65 bairros da cidade de Rio Branco, destes 26 com presença de ovos de *Ae. aegypti* e 7 apresentaram larvas com análises compatíveis com DENV e CHIKV a distribuição dos casos se deu em regiões urbanas e populosas.

Ficou comprovada a transmissão vertical do DENV e CHIKV na cidade de Rio Branco, evidenciando a necessidade de estudos mais detalhados sobre o tema, bem como um monitoramento mais eficaz desse tipo de difusão dos vírus no meio, principalmente em períodos interepidêmicos.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; et al. Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- ANGEL, B.; JOSHI, V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. **Jornal Vector Borne**, v. 45, n.1, p. 56–59, 2008.
- ARAUJO, L. M.; et al. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253-255, 2016.
- BARATA, E. A. M. F.; et al. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista da Saúde Pública**, v. 35, n.3, p. 237-242, 2001.
- BARRETO, M. L. et al. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p.53-72, 2008.
- BASARAB, M.; et al. Vírus da Zika. **The BMJ**, v. 352, n. 1049, p. 1-6, 2016.
- BEERNTSEN, B. T.; et al. Genetics of mosquito vector competence. **Microbiology Mol Biol Rev.** n. 64, v1, p. 115–137, 2000.
- BESERRA, E. B.; et al. Biologia e exigências térmicas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, n. 35, v.6, p. 853-860, 2006.
- BHATT, S.; et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p.504, 2013.
- BOLLING, B. G.; et al. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. **Viruses**, v.7, n. 9, p. 4911-28, 2015.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes Nacionais para a prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. 1ª ed. Brasília, 2009. 160p.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Combate ao Aedes**. 2017. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/index.php/combate-ao-aedes/52926-ministerio-da-saude-e-fiocruz-debatem-aedes-aegypti-no-sesc>> Acesso em: 10 Out. 2017.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica 53 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n.3, p. 1-7, 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35 de 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n.29, 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue instrução para pessoal de combate ao vetor: Manual de Normas Técnicas**. 3. ed. Brasília, 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico - adulto e criança**. 4. ed. Brasília, 2013. 80p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico - adulto e criança**. 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Febre de Chikungunya: manejo clínico**. 1. ed. Brasília, 2015. 28p.

\_\_\_\_\_. **O mosquito *Aedes aegypti*, que transmite dengue, zika e chikungunya** Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2016/02/pacote-de-acoes-combater-zika-virus-dengue-chikungunya-e-o-aedes/aedes.jpeg/view>>. Acesso em 13 novembro de 2017.

CASTRO, A. P. C. R.; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. S. Chikungunya: a visão do clínico de dor. **Revista dor**, v. 17, n. 4, p. 299-302, 2016.

CATÃO, R. C. **Dengue no Brasil: abordagem geográfica na escala nacional**. 2011. 169 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, São Paulo, 2011.

\_\_\_\_\_. **Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti***. 2016. Disponível em: <[https://stacks.cdc.gov/view/cdc/41424/cdc\\_41424\\_DS1.pdf?](https://stacks.cdc.gov/view/cdc/41424/cdc_41424_DS1.pdf?)> Acesso em 3 Mai. 2017

\_\_\_\_\_. **Distribuição do vírus Chikungunya no mundo no ano de 2016**. 2016. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html> >. Acesso: 15 junho 2018.

\_\_\_\_\_. **Zika Virus: Symptoms, Diagnosis, & Treatment**. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/symptoms/index.html>>. Acesso em: 10 Out. 2017.

CHOW, V. T. K.; et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 5, p. 578-586, 1998.

CIOTA, A. T.; et al. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 880–882, 2017.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. Sensory reception and behavior. 2. ed. New York: CABI Publishing, 2000.

CONSOLI, R. A. G. B; LOURENÇO, O. R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz: 1994.

CRUZ, L. C. T. A.; et al. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 18 - 25, 2015.

DANTAS, A. L. **Levantamento do Programa de Gestão Participativa com Ênfase no Meio Ambiente no Município de Rio Branco/AC**. 2010. 43 f. Monografia (Especialização) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Filosofia, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010.

DE CARVALHO, N. S.; et al. Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and Brazilian data. **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v. 20, n. 3, p. 282-289, 2016.

DONALISIO, M. F.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-285, 2015.

EVANGELISTA, K. S. **Estudo da transmissão vertical de *Dengue virus* em mosquitos do gênero *Aedes* no município de Belo Horizonte**. 2003. 69fl. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

FAYE, O.; et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n.1, p. 96-101, 2008.

FAYE, O.; et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika vírus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 311, 2013.

FERREIRA-DE-BRITO, A.; et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 655-658, 2016.

FIGUEIREDO, A. **Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue**. 2013. 115 fl. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, 2013.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica**: identificação, biologia e epidemiologia. v. 2. São Paulo: EDUSP, 2002. 864p.

FREIER, J. E.; ROSEN, L. Vertical transmission of Dengue viruses by *Aedes mediovittatus*. **Journal Tropical Medical Hyg**, v.39, n.2, p.218-22, 1988.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 84 p.

GONÇALVES, M. G. **O Estudo da Competência Vetorial das Populações de *Aedes aegypti* da Cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao Dengue vírus 2**. 2010. 78f. Dissertação (mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2010.

GUEDES, D. R.; et al. Patient-based dengue vírus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal Vector Borne**, v.47, n.2, p. 67-75, 2010.

HALSTEAD, S. B. Perspective Piece. Dengue: The Syndromic Basis to Pathogenesis Research. Inutility of the 2009 WHO Case Definition. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n.2, p. 212-221, 2013.

HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, 2009.

HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). **Biology of disease vectors**. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004.

HONORIO, N. A.; et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.

HULL, B.; et al. Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n.6, p. 1248-1250, 1984.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico 2010**. 2010. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/multidominio/genero/9662-censo-demografico-2010.html>> Acesso em: 15 Mar. 2017.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Dengue: vírus e vetor. Instituto Oswaldo Cruz (IOC), s. d. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>> Acesso em: 23 jan. 2018.

JOSHI, V.; MOUYRA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal Tropical Medicine**, v. 67, n.2, p. 158-61, 2002.

KINDHAUSER, M. K.; et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bull World Health Organ**, v. 94, n.1, p. 675-686, 2016.

KRAEMER, M.; et al. The Global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife Sciences**, v. 4, n.1, p. 01-18, 2015.

KUMAR, M. N. C. V.; et al. Molecular characterization of chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates. **The Indian Journal of Medical Research**, n.126, v. 6, p.534-40, 2007.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viroses. **Archives of Virology**, v. 152, n.4, p. 687–696, 2007.

LAM, S.K.; et al. Chikungunya infection—an emerging disease in Malaysia. South east Asian. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 32, n.1, p. 447–51, 2001.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. **Proc Biology Science**, v. 276, n. 1660, p. 1369-1378, 2009.

LANCIOTTI, R. S.; et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LE GOFF, G.; et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. **Parasite**, v. 18, n.3, p.277-280, 2011.

LEANDRO, D. C. **Transmissão transovariana do vírus dengue soropositivo 2 em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e suas implicações na biologia reprodutiva do mosquito**. 2015. 133 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas. Biologia Animal, 2015.

LEE, H. L.; ROHANI, A. Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 106 – 111, 2005.

LI, C.; et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika vírus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 4, 2017.

LLYAAS, M.; et al. Bioinformatics analysis of envelope glycoprotein E epitopes of dengue virus type 3. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 8, p. 3528–3533, 2011.



LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Artigo de Revisão. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOZOVEI, A. L.; MARCONDES, C. B. **Culicídeos (mosquitos)**. Entomologia médica e veterinária. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

LUPI, O.; CARNEIRO, C. G.; COELHO, I. C. B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 82, n. 4, p. 291-305, 2007.

MACIEL, R.; et al. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107 n.1, p. 828-9, 2012.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12s, p.S98, 2004.

MANIERO, V. C.; et al. Dengue, chikungunya e zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa. UNINGRANRIO**, v. 1, n. 1, p. 118-145, 2016.

MARTINS, V. E.; et al. Spatial distribution and breeding site characteristics of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Fortaleza, State of Ceara. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 73-77, 2010.

MILLER, B. R.; et al. First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley Province, Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n.2, p. 240–246, 2000.

MONTEIRO, J. D. **Epidemiologia molecular do vírus dengue e zika no estado do Rio Grande do Norte, no período Junho de 2014 a Maio de 2015**. 2016.118 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de pós-graduação em biologia parasitaria, Natal, Rio Grande do norte, 2016.

MULLER, V. D. M. **Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra o vírus da dengue e da febre amarela**. 2011. 86f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão, São Paulo, 2011.

MUSTAFA, M.S.; et al. Discovery of Fifth Serotype of Dengue Virus (DENV-5): A New Public Health Dilemma in Dengue Control. **Medical Journal, Armed Forces India**, v. 71, n.1, p. 67–70, 2015.

NASCI, R. S. Movement of Chikungunya virus into the Western Hemisphere. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.8, p. 1394-1395, 2014.

NEVES, D. P.; et al. **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NUNES, R. F. F.; et al. Characterization of Enzymatic profiles of *Aedes aegypti* strains from the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 285-292, 2016.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Zika Vírus: Microcefalia, Sintomas e Tratamentos**. 2017. Disponível em < <https://www.opas.org.br/zika-virus-microcefalia-sintomas-e-tratamentos/>> Acesso em: 22 Out. 2017.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas, by country or territory, 2013-2014: cumulative cases**. Epidemiological Week. 2014. Disponível em: <[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&Itemid=270&gid=31726&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=31726&lang=en)> Acesso em: 30 set.2017.

PESSANHA, J. E. M. Cocirculation of two DENV serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.1, p.103–105, 2011.

PINHEIRO, V. C.; et al. Detection of Dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, *Culicidae*) captured in Manaus, Amazonas. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.833-9, 2005.

PINTO JUNIOR, V. L.; et al. Virus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Medica Portuguesa**, V. 28, n.6, p. 760-765, 2015.

PLANTE, K. S.; et al. Extended Preclinical Safety, Efficacy and Stability Testing of a Live-attenuated Chikungunya Vaccine Candidate. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 01-19, 2015.

POWERS, A. M; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363-2377, 2007.

QUIROGA, E.D.; et al. Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.809, 2018.

RIGAU-PEREZ, J.G.; et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, n.2, p. 971-977, 1998.

ROSEN, L.; et al. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Am Journal Tropical Medicine**, v. 32, n.5, p. 1108-19, 1983.

ROUGERON, V.; et al. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, n. 3, p. 144- 152, 2015.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Seminars Pediatric Neurology**, v.19, n.3, p. 130-51, 2012.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, G. A. C.; et al. Dengue: Prevenção, Controle e Cuidados de Enfermagem - Revisão Integrativa da Literatura 2008-2013, **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 20, n. 1 p. 71-78, 2016.

SCHRAM, P. C. F. Zika virus e saúde pública. **Journal of Human Growth and Development**, v. 26, n. 1, p. 7-8, 2016.

SINGH, A. K. Vertical Transmission of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes from Northern India. **Defence Life Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 184-187, 2016.

SHINGH, R. K.; et al. Zika virus - emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives - a comprehensive review. **The Veterinary Quarterly**, v. 36, n.3, p. 150 – 175, 2016.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 6, p 163-175, 2008.

SILVA-JÚNIOR, E. F.; et al. The medicinal chemistry of Chikungunya vírus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 16, p. 4219 – 4244, 2017.

SIMMONS C. P.; et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**. v. 15, n. 366, p. 1423- 1432, 2012.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. S22-S35, 2007.

SOUSA, N. A. **Controle de ovos de *Aedes aegypti* com *Metarhizium anisopliae* IP 46 por diferentes técnicas**. 2013. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Dengue fever: a call for local, national, and international action. **Lancet**, v.372, n.9634, p.205, 2008.

THAGAMANI, S.; et al. Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1169–73, 2016.

THAVARA, U.; et al. Outbreak of Chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.40, n.5, p. 951– 962, 2009.

THENMOZHI, V.; et al. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in southern India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.94, n.5, p.507, 2000.

THIBERVILLE, S. D.; et al. Chikungunya Fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res.** n. 99, v.3, p. 345-370, 2013.

THONG, M. K. Dengue shock syndrome and acute respiratory distress syndrome. **Lancet**, v. 352, n. 9141, p. 1712, 1998.

URDANETA, L.; et al. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. **Infect. Genetics Selection Evolution**, v. 5, n.2, p. 177-184, 2005.

VALENTE, G. S. C.; et. al. Problematização como estratégia de educação em saúde no combate a Dengue: Um relato de experiência. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental**, v.4, n.4, p. 2987- 2994, 2012.

VASCONCELOS, P. F. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? [Editorial]. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015.

VERDEAL, J. C. R.; et al. Recomendações para o manejo de pacientes com formas graves de dengue. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 23, n. 2, p. 125-133, 2011.

VILELA, A. P. P. **Monitoramento do Dengue vírus circulante em larvas e mosquitos adultos de *aedes aegypti***. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

WADOOD, A.; et al. Epitopes based drug design for dengue virus envelope protein: A computational approach. **Computational Biology and Chemistry**, v. 71, n.1, p. 152–160, 2017.

WANG, W. K.; et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 8, p.1023-1030, 2006.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1-4, 2014.

WEGER, L. J.; et al. Vector competence of American mosquitoes for three strains of Zika virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.10, 2016.

WOODRING, J. L.; HIGGS, S.; BEATY, B. J. Biology of Disease Vectors. In MARQUARDT, W.C.; BEATY, B.J. **Natural cycles of vector-borne pathogens**. p. 51–72, 1996.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Distribuição da dengue no mundo no ano de 2016**. Disponível em: <<http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>> Acesso em: 12 de outubro de 2017.

\_\_\_\_\_. **Dengue and severe dengue**. Media centre, 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em 11 nov. 2017.

\_\_\_\_\_. **Doença do Zika Vírus**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/factsheet-zika-virus-portuguese.pdf>> Acesso em: 02 Out. 2017.

\_\_\_\_\_. Improving the built environment in urban areas to control *Aedes aegypti*-borne diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v.95, p. 607-608, 2017a.

WU, X.; et al. Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells. **Virology Journal**, v. 7, n. 270, p. 1-8, 2010.

ZANLUCA, C.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZARA, A. L. S. A.; et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.