

CAPÍTULO 14

1

Interação Patógeno-Vetor: Dengue.

Raquel Juliana Vionette do Amaral¹ e Marilvia Dansa-Petretski²

¹ Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos, Instituto de Bioquímica Médica. Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 21941-590.

² Setor de Bioquímica de Insetos, Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Copyright: © 2012 [Raquel Juliana Vionette do Amaral, Marilvia Dansa-Petretski]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais.

Os mais graves problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento têm uma origem multifatorial envolvendo diferentes aspectos da pobreza e precárias condições de vida das populações atingidas. Isto inclui condições de habitação, saneamento básico, educação ambiental e educação em saúde deficientes, processo de urbanização rápido e descontrolado, desmatamento acelerado, sistema de saúde deficitário e ineficiente, inexistência de instrumentos eficazes de controle das doenças e ausência de políticas de longo prazo regulares que sustentem mudanças significativas deste panorama.

Neste contexto, a dengue torna-se um dos grandes desafios a serem vencidos nas próximas décadas. Ela é considerada uma doença re-emergente, porque o seu vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, considerado erradicado até início dos anos 70, reapareceu e hoje está presente em todo o território nacional. O reaparecimento do vetor ocorreu a partir da suspensão dos programas de controle e o desmantelamento dos programas de vigilância em vários países, incluindo o Brasil. Neste mesmo período, um aumento na velocidade média dos transportes, a urbanização acentuada das grandes cidades, o desenvolvimento de descartáveis de longa duração e o fenômeno de resistência aos inseticidas, principalmente ao DDT, foram fatores determinantes para o reaparecimento do mosquito no país no início da década de 80, quando ele era considerado erradicado pelas autoridades de saúde. A partir daí, tivemos um quadro mais do que favorável ao seu ressurgimento da doença.

A dengue é uma doença tropical endêmica que atinge frequentemente populações que vivem em precárias condições, sendo, portanto, considerada uma doença negligenciada. É também considerada uma doença democrática, uma vez que atinge pessoas de qualquer classe social, raça ou sexo, no entanto, a doença é mais evidente em populações de baixa renda.

Durante o século XIX, a dengue foi considerada uma doença esporádica. Hoje, é vista como a mais relevante doença viral transmitida por mosquito no mundo.

Dengue: Características Gerais da Doença.

3

A Dengue é uma infecção viral sistêmica autolimitada causada pelo vírus dengue (DENV) que apresenta quatro sorotipos distintos denominados DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. O vírus é transmitido entre humanos por um artrópode e, por este motivo, é considerada uma arbovirose (**arthropod-borne virus**). O artrópode responsável pela transmissão é o mosquito do gênero *Aedes*. As duas principais espécies transmissoras são: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que podem ser encontradas em diferentes localidades, sendo o *Aedes aegypti* o vetor primário da dengue nas Américas. A transmissão ocorre essencialmente através do mosquito vetor, sendo predominante em áreas urbanas e peri-urbanas, onde a alta densidade populacional favorece a expansão da doença.

A doença pode se apresentar na sua forma menos grave, de evolução benigna, denominada Dengue Clássica (DF, do inglês, *Dengue Fever*) ou evoluir para formas graves, que podem levar à morte, como a Dengue Hemorrágica (DHF, do inglês *Dengue Hemorrhagic Fever*), e a Síndrome do Choque de Dengue (DSS, do inglês *Dengue Shock Syndrome*). Nos últimos anos surgiu uma nova denominação, chamada dengue com complicações, que é a denominação para uma forma grave da doença que pode levar à morte, mas que não apresenta quadro hemorrágico.

As infecções por DENV causam um grande espectro de condições patológicas que vão desde sintomas comuns a outras viroses – como febre, dor de cabeça e mal-estar, inclusive manifestações hemorrágicas devido ao aumento da permeabilidade vascular. A replicação do vírus se origina no local da picada do mosquito em células dendríticas, cuja migração através do sistema linfático resulta na indução de citocinas e do recrutamento de células do sistema imune mediado por quimiocinas. Estas incluem monócitos e macrófagos, que são células conhecidas como alvos primários da infecção por DENV. O vírus é capaz de disparar uma resposta inflamatória sistêmica, com uma diminuição progressiva nas funções das células T e um aumento da apoptose que tem sido correlacionada com a severidade da doença. Em um grande número de casos têm sido relatadas disfunções neuromusculares e cardíacas causadas pelo vírus, assim como comprometimento hepático.

Atualmente a Dengue é uma arbovirose de alto impacto epidemiológico, tanto em termos de morbidade quanto de mortalidade. É a arbovirose de maior incidência no mundo, sendo endêmica em todos continentes, exceto na Europa. A dengue é, portanto, um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e em vários países de regiões tropicais e subtropicais, cujas condições climáticas favorecem a proliferação do mosquito vetor (**Figura 1**).

Nos últimos 50 anos, a incidência de dengue aumentou 30 vezes. A Organização Mundial da Saúde estima que 2,5 bilhões de pessoas vivem em mais de 100 países endêmicos e áreas onde o vírus da dengue pode ser transmitido. Anualmente ocorrem aproximadamente 50 milhões de infecções, com 500.000 casos de dengue hemorrágica e 22.000 mortes, principalmente entre as crianças. Antes de 1970, apenas nove países tiveram casos da Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), e desde então o número aumentou mais de 4 vezes e continua progredindo.

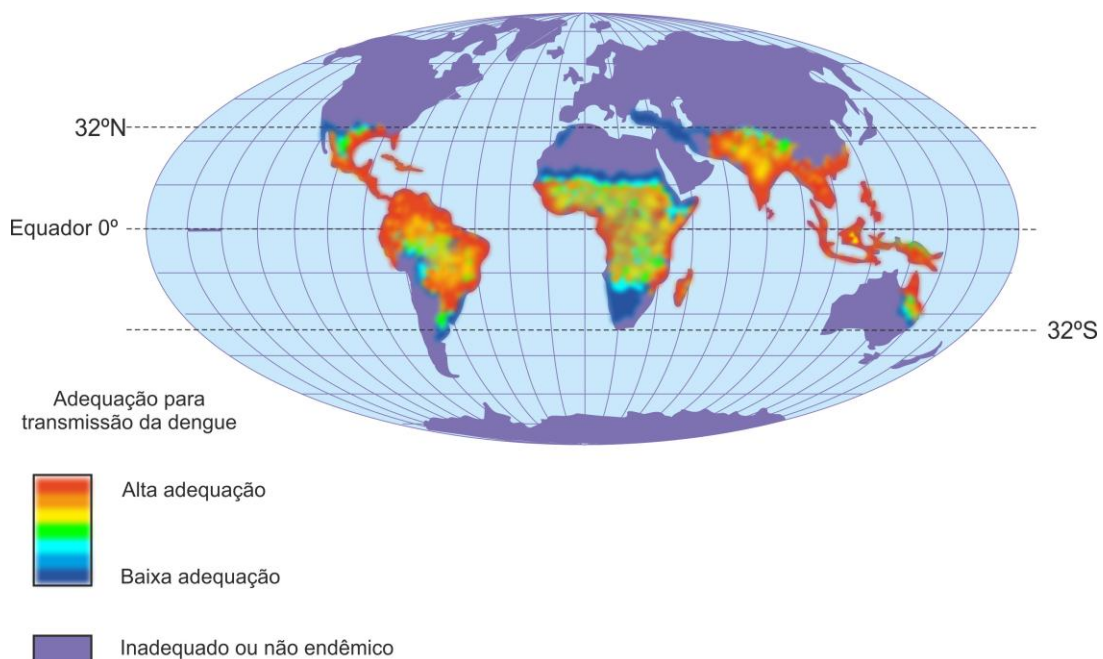


Figura 1. Risco Global de Dengue. Determinação das áreas de risco foi baseada em registros combinados da WHO, CDC, Gideon online, ProMED, Dengue Map. Eurosurveillance e literatura não publicada. Exclusão de risco foram feitos com base de um modelo biológico de adequação de temperatura e áreas de aridez excessiva definidas de acordo com a classificação dada por GlobCover. Adaptado de Simmons e cols., 2012.

O panorama já é considerado de pandemia e é resultado de um processo de retorno do vetor, após um longo período de interrupção da transmissão de dengue e febre amarela, em grande parte das Américas. Essa interrupção ocorreu após uma séria campanha de erradicação do *Aedes aegypti*, principalmente durante a década de 60 e princípio da década de 70. À descontinuação da campanha seguiram-se reinfestações do mosquito e logo surtos de dengue no Caribe, na América Central e na América do Sul. Desde então, a doença se propaga em epidemias cíclicas que ocorrem a cada 3 a 5 anos. A principal epidemia no Brasil ocorreu em 2002 quando foram notificados mais de um milhão de casos da doença. Um olhar histórico mostra uma tendência de expansão da dengue. Sua incidência não só aumentou nos últimos 50 anos, como ocorreu uma crescente expansão geográfica até novos países e, na última década, de áreas urbanas a rurais (**Figura 2**).

Entre os anos de 2001 a 2007, 98% dos casos de dengue nas Américas ocorreram no Brasil, que também tem a maior taxa de mortalidade da região.

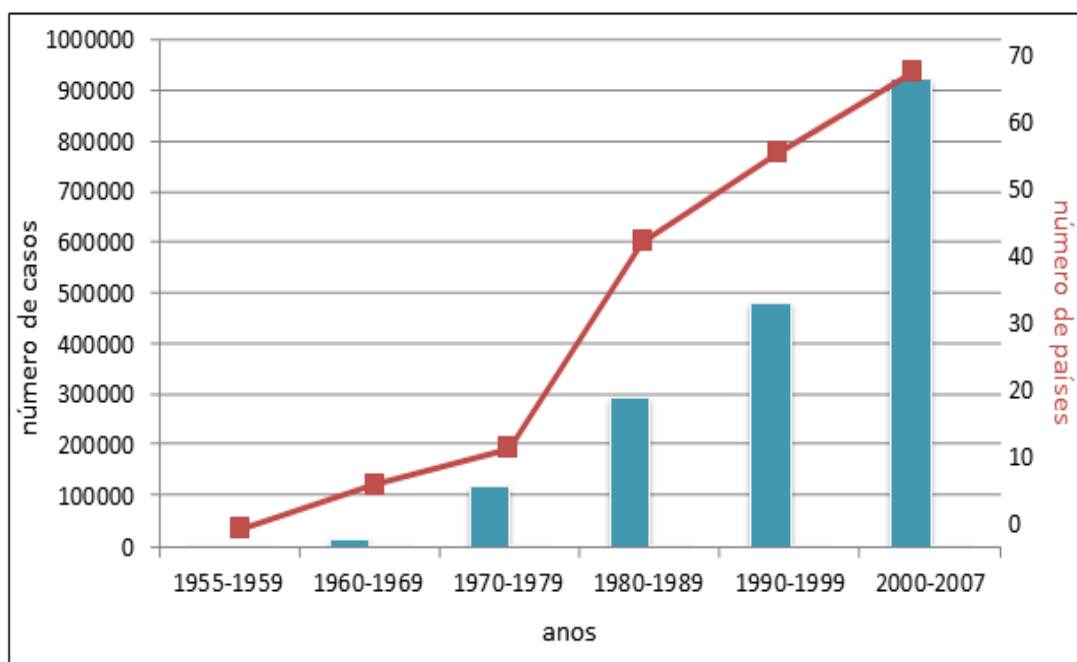


Figura 2. Evolução do número de casos de dengue no mundo. Série histórica de 52 anos (1955 – 2007) e o número de países atingidos pela dengue em todo o mundo (WHO, 2009).

Histórico e Situação Atual.

Os primeiros registros de sintomas de dengue foram publicados na Enciclopédia Chinesa durante os anos de 265 a 420 d.C.. Inicialmente a doença ficou conhecida pelos chineses como “água envenenada”, pois estes a relacionavam a insetos voadores associados à água. Em 1635, a doença apareceu nas Índias Francesas Ocidentais e em 1699, no Panamá. Dengue, ou doença muito similar, teve sua distribuição ampliada no século XVIII durante a primeira pandemia (Gubler, 1998).

6

Em 1903, Graham ganhou destaque ao caracterizar a Dengue como uma doença transmitida por mosquitos, e apontou o a espécie *Culex quinquefasciatus* como vetor. Entretanto, nos seus experimentos sobre transmissão, apontou a possibilidade de o *Aedes aegypti* – anteriormente denominado *Stegomyia fasciata* – ser o responsável pela enfermidade juntamente com o *Culex*. Bancrofti, em 1906, confirmou tratar-se de uma doença cujo vetor biológico era o mosquito *Aedes aegypti*. Em 1918, os trabalhos realizados por Cleland & Bradley (1918) contribuíram para uma melhor compreensão da doença, sua forma de transmissão e disseminação. Através de seus experimentos, os autores descartaram que o *Culex* poderia ser o agente transmissor da doença, apontando o *Aedes aegypti* como o vetor biológico, confirmando os trabalhos de Bancrofti. Além disso, o trabalho caracterizou o período intrínseco de incubação (período do desenvolvimento viral no hospedeiro vertebrado), a transmissão por inoculação subcutânea, apontou os sintomas clínicos e fez estudos acerca da imunidade dos pacientes acometidos.

No mundo foram registradas oito pandemias, com duração de três a sete anos, no período compreendido entre 1779 e 1916. Em 1964, após 20 anos sem registro da doença, um pequeno surto de DENV3 é diagnosticado no Taiti, ilha do Pacífico Sul, mas a doença não se dissemina para as outras ilhas próximas. Nos anos seguintes, epidemias de DENV2 ocorreram em várias ilhas do Pacífico e, em 1975, o DENV1 foi introduzido nesta região. Na Austrália, registros de dengue vêm sendo feitos desde 1800, com múltiplas epidemias ocorrendo até 1955. Em 1981, a virose reaparece neste local provocando severas epidemias em várias cidades (Howe, 1977).

Várias epidemias de dengue ocorreram também durante o século XX. No entanto, após a Segunda Guerra Mundial epidemias de Dengue Hemorrágica reapareceram no

sudeste da Ásia e subseqüentemente nas Ilhas do Pacífico e nas Américas. Nas Américas, a dengue tem sido relatada há mais de 200 anos (Gubler, 1988; Henchal & Putnak, 1990). Na década de 50, a Dengue Hemorrágica (FHD), foi descrita pela primeira vez na Tailândia e nas Filipinas e, após a década de 60, a dengue intensificou-se nas Américas. A partir de 1963, houve a circulação comprovada de DENV2 e DENV3 em vários países. O sorotipo 3 foi isolado primeiramente em Porto Rico, causando subseqüentemente epidemias na Jamaica e no leste do Caribe. Em 1977, o sorotipo 1 foi introduzido nas Américas, inicialmente pela Jamaica. A partir de 1980, foram notificadas epidemias em vários países, aumentando consideravelmente a magnitude do problema. O acontecimento epidemiológico mais relevante na história de dengue nas Américas é a epidemia de dengue hemorrágica e síndrome de choque do dengue que ocorreu em Cuba, em 1981. Nesta epidemia foram notificados 344.203 casos, com 116.143 hospitalizações. Dentre os 10.312 casos considerados graves, 158 resultaram em óbitos e, destes, 101 foram crianças (Donalísio, 1995).

A reinfestação do *Aedes aegypti* no Brasil ocorreu a partir de Roraima em 1981/1982. Em 1980, no Brasil, apenas 12 municípios estavam infectados pelo *Aedes aegypti* e, ao fim de 1998, esse número aumentou para aproximadamente 2.910. Em 2001, 3.587 municípios das 27 unidades federadas encontravam-se infestados com o mosquito e a transmissão da dengue já ocorria em 2.262 municípios de 24 Estados (Gonçalves Neto, 2004). Na região sudeste, o Rio de Janeiro foi o primeiro estado a ter notificações de casos, no ano de 1986, seguido de Minas Gerais e São Paulo.

O Estado do Rio de Janeiro foi o primeiro estado do país a registrar a circulação concomitante de três dos quatro sorotipos do vírus: DENV1, DENV2 e DENV3. Nos anos de 1986 e 1987 com a introdução do DENV1, foram notificados 93.910 casos da doença. Em 1990, a identificação do DENV2 em Nova Iguaçu, desencadeou nova epidemia de grandes proporções, com o surgimento dos primeiros casos de dengue hemorrágica. No período de 1990/91 foram notificados 105.576 casos, sendo 1.316 de dengue hemorrágica (462 confirmados) e 8 óbitos. Nos anos de 1995 e 1998, duas outras epidemias de menores proporções ocorreram, com o registro de 35.240 e 32.382 casos, respectivamente. Apesar da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) lançar o Plano de Intesificação do Combate a Dengue em 2001, o Estado do Rio de Janeiro foi alvo de mais uma grave epidemia no ano de 2002 (Lenzi & Coura, 2004).

O evento mais importante dos últimos anos foi a introdução do sorotipo 4 (DENV4) no Brasil. Em 2008, um trabalho publicado por Figueiredo e cols, mostrava três casos de DENV4 em pacientes sem histórico de viagens para fora de Manaus. As autoridades de saúde alegaram que os laboratórios brasileiros não foram capazes de reproduzir os resultados e que não existia nenhuma epidemia aparente de DENV4 no Brasil. Em 2010, o mesmo sorotipo foi identificado em Roraima, também sem aparente epidemia relacionada, com menos de 20 casos da doença notificados na região. Em março de 2011, DENV4 foi notificado em sete pacientes do município de Niterói, Rio de Janeiro (Nogueira & Eppinghaus, 2011). O mesmo sorotipo foi identificado ainda no Pará, em São Paulo e em três estados do nordeste: Pernambuco, Bahia e Piauí.

A Dengue se distribui em uma larga faixa abaixo e acima do Equador (35° N a 35° S). Em muitas regiões tropicais e subtropicais, ela é uma doença endêmica, ou seja, ocorre a cada ano, principalmente em períodos que favorecem a proliferação do mosquito, como épocas de chuvas, por exemplo. As epidemias ocorrem pela combinação de eventos como: aumento da população vetorial, pessoas sem imunidade ao vírus circulante e a oportunidade de contato entre as duas situações (CDC, 2011).

Até a metade da década de 1990, o sudeste Asiático se constituía na região do mundo mais atingida pela doença. A partir de então, os países da América Central e do Sul começaram a se destacar epidemiologicamente, por apresentarem mais da metade dos casos notificados de Dengue no mundo. Em 1998 ocorreu uma pandemia em que 1,2 milhão de casos de dengue clássica e dengue hemorrágica foram notificados, em 56 países. Os dados para 2001-2002 indicam uma situação de magnitude comparável. Em 2001, só as Américas informaram mais de 652.212 casos de dengue, dos quais 15.500 foram DHF, o que representou quase o dobro dos casos relatados para a mesma região em 1995.

Estima-se que, com as mudanças climáticas globais, países como a Austrália poderão ser endêmicos para Dengue. No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, em função da circulação dos três sorotipos do vírus, o número de casos de FHD e da sua taxa de mortalidade, vem aumentando. A reintrodução de DENV4 no país nos últimos anos indica novas epidemias, já que a população não apresenta imunidade contra este sorotipo.

Em 2011, mais de 500 mil casos de dengue foram notificados em todo Brasil. Em 2012, de janeiro a abril os números chegam a quase 300 mil casos, com a circulação principalmente de DENV1 e DENV4 (<http://portalsaude.saude.gov.br>).

O Vírus Dengue.

9

O vírus dengue (DENV) é um arbovírus, grupo onde se encontram diversos patógenos humanos, que foram assim chamados inicialmente por apresentarem parte do seu ciclo de vida em artrópodes. No entanto, arbovírus não são considerados verdadeiramente vírus de insetos, por não serem tipicamente patogênicos para estes hospedeiros. Pertence à família Flaviviridae onde se encontram três gêneros distintos: *Flavivirus* (gênero ao qual pertence o vírus dengue, o vírus da febre amarela e vírus causadores de uma série de encefalites transmitidas por artrópodes), *Pestivirus* (vírus de suínos e ruminantes) e *Hepacivirus* (vírus da hepatite C em Humanos).

DENV é um vírus pequeno, envelopado e com 50 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de uma única fita de RNA de sentido positivo e que mede aproximadamente 11 kb (**Figura 3**). O genoma é formado de 10.664 nucleotídeos organizados em uma única fase de leitura aberta (ORF - do inglês *Open Reading Frame*) que codifica uma única poliproteína de 3.386 aminoácidos flanqueadas por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR). A região 5' UTR (do inglês *untranslated regions*, região não traducional) possui 96 nucleotídeos e a região não poliadenilada 3'UTR possui 451. A poliproteína produzida a partir da ORF é posteriormente processada por proteases virais e celulares em dez proteínas: três proteínas estruturais distintas, envolvidas na formação da partícula viral: Capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E); e outras sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Kuhn e cols., 2002; Edigil e cols., 2006; Clydes & Harris, 2006).

Flavivirus

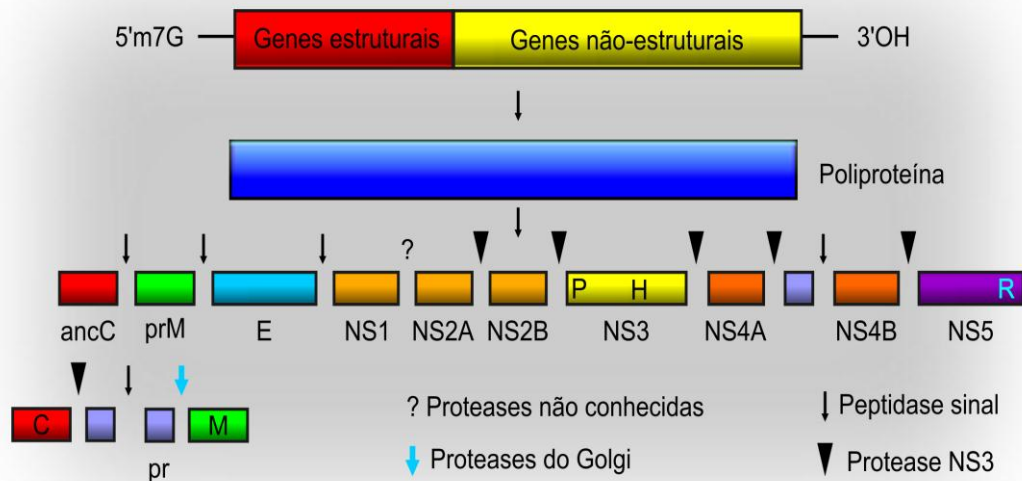


Figura 3. Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero Flavivirus. Tradução de uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases virais e celulares. As abreviações C, E, prM e NS indicadas na figura, representam os genes que codificam para proteínas do Capsídeo (C), Envelope viral (E) e pré-membrana (prM), relacionadas à montagem da partícula viral e finalmente, as proteínas não-estruturais (NS) que relacionam-se à replicação do vírus. Adaptado Van Regenmortel e cols., 2000.

As proteínas NS são responsáveis pela replicação do RNA viral e também auxiliam na montagem viral e na evasão da resposta imune do hospedeiro (Puig-BasAgoiti e cols., 2006). NS1 é uma glicoproteína necessária no processo de replicação do RNA viral. NS2A e NS2B são dois polipeptídeos hidrofóbicos, clivados por proteases virais. A NS3 é uma proteína multifuncional com atividades de uma serino-protease que tem NS2B como um co-fator. O domínio intermediário da NS3 é uma nuclease, necessária para a replicação do RNA e o domínio C-terminal tem atividade RNA trifosfatase. NS4A e NS4B são polipeptídeos hidrofóbicos que estão associados com a membrana (Nemésio e cols., 2012). NS5 tem a função de uma RNA polimerase RNA-dependente (Puig-BasAgoiti e cols., 2006).

A proteína C interage com o RNA genômico do vírus, para formar o nucleocapsídeo. A glicoproteína prM forma um heterodímero intracelular, estabilizando a proteína E. A proteína prM é clivada durante a liberação do vírus pela célula, deixando a pequena proteína estrutural M ancorada no envelope viral. A proteína E é a principal proteína do envelope protéico, é glicosilada e é a maior proteína estrutural exposta na superfície do envelope do vírion maduro. A proteína E é composta por 495 aminoácidos e apresenta uma massa molecular de 60 kDa. Esta proteína é essencial para ligação do vírus ao receptor de membrana da célula hospedeira, atua como hemaglutinina viral, induz uma resposta imune e media o ataque do vírus à superfície da célula hospedeira (Wei e cols., 2003; Heinz & Stiasny, 2012).

Assim como acontece com os Alphavirus e com vírus Influenza, os Flavivirus entram nas células hospedeiras por endocitose mediada por receptor. O ambiente acidofílico do endossoma é responsável por desencadear uma mudança conformacional nas glicoproteínas de fusão. Neste caso, a mudança ocorre na proteína (E) que é a responsável tanto pela ligação ao receptor quanto pelo processo de fusão com a membrana celular do endossomo e liberação dos componentes virais no citoplasma celular. A partícula viral passa pela via secretória onde ocorrem mudanças conformacionais em suas proteínas estruturais e a saída do vírus acontece por exocitose (Modis e cols., 2003).

O Inseto Vetor.

Os mosquitos são insetos classificados dentro da família Culicidae, subordem Nematocera e da ordem Diptera. Esta família possui acima de 3200 espécies descritas e tipicamente é subdividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. O *Aedes* é o principal gênero da subfamília Culicinae que compreende mais de 1200 espécies.

12

Os mosquitos são holometábolos - sofrem metamorfose completa. O estágio imaturo do *Aedes* requer sete dias para emergência do adulto em ambientes tropicais. A oviposição ocorre em ambiente úmido. Do ovo, eclode a larva que passa por quatro instares (ou sofre quatro ecdises) até alcançar o estágio de pupa, da qual emerge o mosquito adulto alado, como ilustrado na **figura 4**.

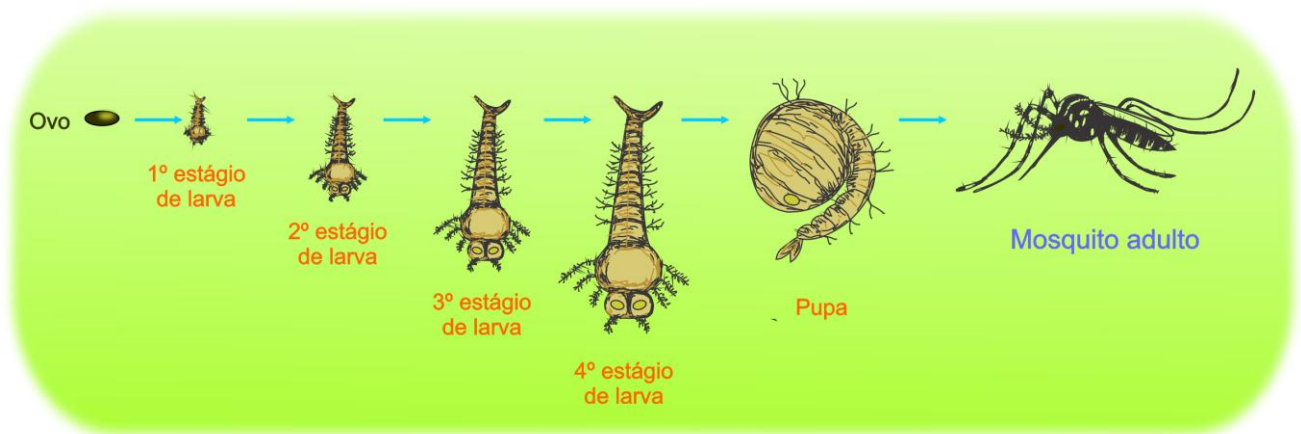


Figura 4. Ilustração das diferentes fases do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Adaptado Unicamp (2012)

(http://www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/ca/DENGUE/3dengue_unicamp.html)

O *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue devido à sua antropofilia, seus hábitos urbano-domésticos (domiciliares) e sua alta eficiência na transmissão do vírus (Gubler, 1998). É uma espécie de atividade diurna, alimenta-se dentro e fora das casas durante todo o tempo, especialmente em dias nublados. Ele foi identificado pela primeira

vez no Brasil durante o período colonial sendo combatido em nosso território, até ser considerado erradicado em 1955. No entanto, a não erradicação do mosquito nos países vizinhos propiciou seu reaparecimento a partir de Belém do Pará em 1967 (Consoli & Lourenço-de-Oliveira). A densidade e o grau domiciliar dos vetores do dengue influem na capacidade vetorial das populações do mosquito em diferentes regiões (Donalísio & Glasser, 2002).

A fêmea do mosquito adulto alimenta-se de sangue após 48 horas de sua emergência e a oviposição ocorre após dois a cinco dias após o repasto sanguíneo. Uma única fêmea pode colocar de 60-100 ovos na postura inicial. Muitas espécies de *Aedes* são vetores de arboviroses que infectam vários vertebrados, inclusive humanos. O *Aedes aegypti* é uma das espécies de maior relevância médica do mundo por ser o principal vetor do vírus da febre amarela urbana e o vetor primário do vírus dengue nas Américas. Este apresenta uma ampla distribuição geográfica, predominando nas áreas tropicais e subtropicais. Estima-se que a sobrevivência dos mosquitos é de 20 e 30 dias para machos e fêmeas de *Aedes* adultos, respectivamente.

Não há vacina disponível contra a dengue, tampouco medicamentos específicos para tratar a infecção. Dessa forma, a prevenção e controle da dengue e da FHD dependem do combate do *Aedes aegypti* em torno dos domicílios. Inseticidas em sprays para mosquitos adultos não são eficazes em ambientes abertos. O caminho mais eficaz para o seu controle tem sido o trabalho de prevenção e eliminação de possíveis criadouros nos domicílios.

É muito difícil controlar ou aniquilar mosquitos *Aedes aegypti*, porque eles se adaptam facilmente ao ambiente, o que os tornam altamente resistentes, ou com a habilidade de rapidamente recuperarem-se após os distúrbios resultantes de fenômenos naturais (por exemplo, secas) ou intervenções humanas (por exemplo, medidas de controle). Uma das adaptações é a capacidade da resistência dos ovos à dessecação (Gubler, 1998).

A Interação Vírus-Vetor.

14

DENV é um arbovírus com genoma de tamanho limitado. Por este motivo, ele depende de uma célula hospedeira para sua própria sobrevivência e replicação. No vetor, o vírus é obtido no repasto sanguíneo, se replica e propaga no interior do inseto até atingir a glândula salivar. Este processo requer a interação do vírus com os vários tecidos e seus respectivos processos fisiológicos de proteção contra patógenos que, ao serem burlados, permitem uma infecção persistente e duradoura no inseto. A composição destes tecidos é espécie e linhagem específica e estas características desempenham importante papel na competência vetorial. A interação biológica vírus-vetor é, portanto, resultado de um processo de coevolução contínua, que envolve o sistema imune do vetor e suas barreiras físicas e moleculares e os mecanismos virais de escape destas defesas. Este é um processo dinâmico, a longo prazo, que resulta na seleção de espécies ou populações de uma mesma espécie que funcionam, especificamente ou não, como vetores de um arbovírus. No caso da interação DENV-*Aedes*, temos um modelo que resulta de um processo eficiente, pois o mosquito não apresenta alterações fenotípicas que o levem à morte quando infectado pelo vírus. Entretanto, alguns trabalhos recentes mostram diferentes alterações fisiológicas nos insetos infectados, como aumento na atividade locomotora, aumento da taxa de picada e redução da fecundidade (Maciel-Freitas e cols., 2011; Lima-Camara e cols., 2011). Uma alteração molecular observada é a mudança do padrão de expressão de proteínas do intestino médio de *Aedes aegypti* que muda significativamente após a infecção por DENV2 ou chikungunya vírus (Tchankouo-Nguetcheu e cols., 2010). Os dados têm mostrado que arbovírus são capazes de subverter o comportamento e o metabolismo celular do inseto, e é possível supor que estas mudanças sejam, de alguma maneira, importantes para a dinâmica da transmissão de dengue.

A competência vetorial de um artrópode refere-se à permissividade deste à infecção, replicação e transmissão de patógenos específicos. Diferentes linhagens de *Aedes aegypti*, por exemplo, apresentam grandes diferenças com relação à competência vetorial para Flavivírus, incluindo DENV (Black IV e cols., 2002, Lourenço-de-Oliveira e cols., 2004). Para que a parceria dê certo é necessário que o patógeno seja capaz de atravessar diversas barreiras no hospedeiro invertebrado, possibilitando a entrada do agente patogênico, sua disseminação nos tecidos e, posteriormente, sua transmissão.

As Barreiras e o Ciclo de Transmissão no Vetor.

15

O ciclo de transmissão de DENV inicia-se quando fêmeas de *Aedes aegypti* picam um indivíduo que se encontra em fase virêmica da doença (fase aguda de infecção, em torno de 4 a 5 dias após a picada). Posteriormente, o vírus multiplica-se no epitélio intestinal do mosquito, atinge a hemocele e dissemina por diferentes tecidos. Após um período de incubação, em torno de 7 – 14 dias, o vírus chega às glândulas salivares e o inseto torna-se apto a transmitir o vírus dengue para um novo hospedeiro humano (McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000). A fêmea do mosquito *Aedes* também pode transmitir o vírus imediatamente de uma pessoa infectada para outro indivíduo, pela mudança do hospedeiro quando o repasto sanguíneo é interrompido – transmissão mecânica. Outro tipo de transmissão, que parece ter importância epidemiológica nos períodos interepidêmicos é a transmissão transovariana ou transmissão horizontal, na qual a fêmea passa DENV para os ovos e, conseqüentemente para sua progênie.

A transmissão do DENV depende da interação do vírus com o mosquito. Quando o mosquito se alimenta do sangue de um indivíduo virêmico, o vírus encontra no mosquito várias barreiras à infecção. A capacidade de ultrapassar essas barreiras imunofisiológicas define a competência vetorial da espécie (Black & Severson, 2005). Existem 6 barreiras potenciais que um arbovírus enfrenta para ser eficientemente transmitido por um artrópode (**Figura 5**). Inicialmente, o vírus deve ser capaz de penetrar e atacar as células epiteliais e, então, se replicar nelas até atingir um alto título viral nestas células. Fatores que bloqueiam um desses dois eventos constituem uma barreira de infecção no intestino (MIB). Posteriormente, o vírus deve ser capaz de ultrapassar a lâmina basal que envolve o epitélio intestinal e, assim, infectar e se replicar nos tecidos vizinhos. Fatores que bloqueiam estes eventos impedem a disseminação da infecção nos tecidos, atuando como uma barreira de escape do intestino (MEB). Por último, o arbovírus deve infectar e se replicar nas glândulas salivares antes de invadir o lúmen da glândula salivar para a transmissão final na próxima picada. Fatores que impedem esta etapa constituem a barreira de transmissão (TB). Cada uma dessas barreiras deve ser compreendida do ponto de vista bioquímico e molecular para que seja possível entender os mecanismos que levam à infecção, replicação e transmissão do vírus no mosquito vetor, e conseqüentemente, sua competência vetorial (Bennett e cols., 2002; Black e cols., 2002).



Figura 5. Barreiras que um arbovírus enfrenta para eficientemente infectar um artrópode tornando-o apto para transmiti-lo. MIB= barreira de infecção no intestino; MEB = Barreira de escape do intestino; TB = barreira de transmissão. Adaptado de Black et al., 2002.

Análises de QTL (Quantitative Trait Loci) mapearam nos três pares de cromossomo de *Ae. aegypti* regiões associadas à MIB e a MEB (Bosio et al 1998, 2000, Bennett et al., 2005). No entanto, apesar de alguns genes específicos poderem ser associados a estas regiões, como é o caso das tripsinas digestivas, até o momento não foi determinada a identidade molecular dos genes responsáveis pela competência vetorial de uma espécie, o que se deve provavelmente ao fato de ser uma característica multifatorial bastante complexa. Outra molécula proposta como marcadora da competência vetorial destes insetos é uma proteína de 67 kDa, descrita como um receptor putativo, cuja quantidade no epitélio intestinal parece estar relacionada à suscetibilidade do vetor ao DENV (Mercado-Curiel et al., 2008).

O Sistema Imune do Vetor.

A imunidade inata em artrópodes desempenha um papel importante para limitar a infecção por patógenos. Esta é a resposta do hospedeiro mais antiga evolutivamente e representa a primeira linha de defesa contra invasores. Apesar do sistema imune inato ser considerado incapaz de estabelecer memória imunológica, trabalhos recentes vêm mostrando características de resposta de memória através da diferenciação de hemócitos em mosquitos *Anopheles gambiae* (Rodrigues et al., 2010), bem como, a caracterização de proteínas que possuem domínios de imunoglobulinas desempenhando papel importante no combate a infecções bacterianas e infecções com *Plasmodium falciparum* (Garver & Dimopoulos, 2008).

Insetos possuem dois tipos de imunidade inata: a resposta humoral – relacionada com lectinas, a cascata da profenoloxidase (PPO) e na produção de moléculas efetoras tais como os peptídeos antimicrobianos; e a resposta celular: relacionada com a fagocitose, agregação de hemócitos e encapsulação dos patógenos. A resposta inata baseia-se no reconhecimento de Padrões de Moléculas Associadas a Patógenos (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*), presentes na superfície dos mesmos enquanto que, na superfície dos hemócitos há receptores transmembrana que reconhecem os PAMPs ativando as vias de imunidade (Barrilas-Mury & Kanost, 2005). As barreiras físicas também tem um papel importante na defesa. Elas são representadas em primeiro lugar pela cutícula externa do inseto que, na injúria, serve como porta de entrada para possíveis infecções. A matriz peritrófica, que envolve o bolo alimentar e o

separa do epitélio intestinal, também representa uma importante barreira física. Composta em grande parte por quitina e, no adulto sendo produzida em resposta à alimentação sanguínea, a matriz peritrófica é capaz de limitar a entrada de possíveis patógenos, já que o tubo digestivo é a rota mais comum de infecção no vetor (Devenport & Jacobs-Lorena, 2005).

O corpo gorduroso é o principal sítio imunológico de insetos, sendo o principal local de síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs). A hemolinfa, através dos hemócitos, participa em menor proporção na produção de AMPs e o epitélio intestinal que é capaz de produzir uma menor quantidade de AMPs e espécies reativas de oxigênio, sendo esses dois últimos considerados sítios secundários (Gillespie e cols., 1997).

As vias moleculares clássicas envolvidas na resposta de invertebrados a diversas classes de patógenos são a via TOLL e a via IMD. Essas foram bem descritas em *D. melanogaster* (Lemaitre, 1996 e Hedengren, 1999, Ferradon e cols., 2007) e tem sido relacionadas a resposta ao DENV em *A. aegypti* (Xi e cols., 2008; Sim & Dimopoulos, 2010). Essas vias envolvidas na sinalização da imunidade inata são extremamente conservadas entre os organismos (Kopp & Medzhitov, 1999). Além destas vias clássicas, a via JAK/STAT também está associada à imunidade de insetos em estudos com *D. melanogaster* (Agaisse & Perrimon, 2004) e *A. gambiae* (Barillas-Mury e cols, 1999).

A via TOLL foi descrita como sendo a principal via de defesa contra fungos e bactérias GRAM+ e vírus em *Drosophila* (Zambon e cols, 2005). Existem vários receptores do tipo TOLL, mas estes não conseguem reconhecer diretamente o patógeno. Para serem ativados necessitam da presença de um peptídeo endógeno – o peptídeo Spätzle. Após ativação da via TOLL, a proteína adaptadora MyD88 se liga, tanto no receptor TOLL quanto à uma proteína quinase – Pelle. Outra proteína adaptadora – Tube – interage com MyD88, juntamente com Pelle, e essa sinalização induz a ubiquitinação e posterior degradação de uma proteína inibidora, homóloga de I-kappa B – Cactus. Quando Cactus é degradado, o fator de Transcrição REL1, homólogo de NF-kappa-B p50 e p65, antes mantido no citoplasma, é translocado para o núcleo promovendo a transcrição de genes efetores da resposta imune. Em 2008, Xi e cols. mostraram uma forte participação dessa via na defesa contra a infecção viral de DENV em mosquitos *Aedes aegypti*. O trabalho mostra que o silenciamento de Cactus reduz em até 4 vezes a infecção pelo DENV. Por outro lado, o silenciamento de MyD88, a proteína adaptadora, aumenta tanto a infecção por DENV2 quanto por DENV4.

A via Imd (imunodeficiência) produz AMPs que controlam a infecção por bactérias gram negativas (Avadhanula e cols., 2009). A resposta é iniciada por PGN do tipo DAP, um componente importante da parede celular bacteriana. Estas moléculas são reconhecidas por uma proteína transmembrana chamada proteína de reconhecimento de peptídeoglicanos (PGRP-LC). Após o reconhecimento inicial, o sinal é propagado para o domínio citoplasmática de PGRP-LC, que ativa Imd, uma proteína contendo um domínio *death* (DD death domain). DD de Imd é mediador do recrutamento de outras proteínas contendo DD, entre elas Dredd. Dredd cliva Imd, o que aparentemente contribui para sua ativação. Esta proteína contribui ainda para clivagem do fator de transcrição Relish, uma proteína homóloga à NF- κ B de mamíferos. Relish contém um domínio homólogo a Rel (RHD) na sua extremidade amino-terminal, e uma região inibidora I κ B na extremidade carboxi-terminal. A região inibidora I κ B deve ser removida por clivagem proteolítica para liberar a região NF- κ B, que é então translocada para o núcleo e inicia a transcrição dos seus genes alvo, enquanto a extremidade carboxi-terminal permanece no citoplasma. A ativação de Relish requer a fosforilação a sua região amino terminal pelo complexo IKK. A fosforilação parece ser essencial para sua atividade na ativação da transcrição. Os genes alvos são produzidos por esta via após sua ativação também em resposta ao DENV. Sim & Dimoupolos (2010) mostraram que quando células de mosquitos são coinfetadas com DENV e *Escherichia coli*, uma bactéria gram negativa, estas últimas crescem melhor que em células não infectadas com dengue, sugerindo que o vírus promova como resposta a diminuição da produção de AMPs a partir da via Imd. A resposta à ativação desta via parece ser mediada pela produção de pelo menos um peptideo cecropina-simile que possui atividade anti-bacteriana, anti-DENV e anti-Chikungunya e é também capaz de matar *Leishmania* in vitro.

A resposta via JAK/STAT também tem sido mostrada em mosquitos infectados com DENV. Esta resposta é iniciada quando um ligante Upd, que é uma glicoproteína capaz de ativar essa via, se associa a um receptor transmembrana Domeless (DOME). Este sofre uma mudança conformacional que leva a auto-fosforilação de quinases associadas do tipo JAK (Janus kinase) (Hop). Hop ativada fosforila DOME resultando no aparecimento de um sítio de acoplamento para STAT citoplasmática. Este recrutamento de STAT produz sua fosforilação e dimerização que leva o dímero a se translocar para o núcleo onde irá funcionar como fator de transcrição, na regulação da expressão de genes alvo. A via JAK/STAT é ativada no mosquito *Aedes aegypti* após a infecção por DENV2. O silenciamento específico de PIAS, modulador negativo desta via, diminui a infecção por

DENV. Entretanto, a resposta anti-dengue mediada por JAK/STAT parece ser independente da resposta mediada pela via Toll, já que nenhum dos genes de resposta imune co-regulados por DENV-2 e a via Toll são regulados pela depleção de PIAS (Souza-Neto e cols., 2009).

Oliveira et al. (2011) mostraram que espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados pelo epitélio intestinal de *Aedes aegypti* controlam o crescimento da microbiota intestinal. A ingestão de sangue ativa eventos que controlam negativamente o nível de ROS no intestino. Este controle pode ter um papel importante na modulação do sistema imune do inseto e em consequência da competência vetorial desta espécie ao vírus dengue e outros patógenos.

A Via do RNA de Interferência (RNAi).

RNAi é o fenômeno no qual duplas fitas de RNA (dsRNA) são degradadas em pequenas moléculas (siRNA), dando início ao silenciamento de genes de sequências homólogas. É uma via altamente conservada, encontrada em uma larga variedade de organismos eucariotos. Sua principal característica é o uso de RNAs de 21 - 23 nucleotídeos que confere alta especificidade para sequência alvo (Napoli e cols., 1990). O mesmo processo já foi descrito como parte de um fenômeno de “co-supressão” em plantas ou “quelling” na levedura *Neurospora crassa*. O mesmo fenômeno foi descoberto em animais, primeiramente no nematóide *Caenorhabditis elegans*, em resposta à introdução de dsRNA com o resultado de silenciamento de uma sequência específica de um gene homólogo (Fire e cols., 1998). Neste modelo a terminologia RNA de interferência (RNAi), como hoje é conhecido o processo, foi primeiro utilizada. RNAi é hoje o nome genérico que se dá a processos de silenciamento gênico por degradação de RNA de uma sequência específica presente no citoplasma de células eucarióticas induzidos pela presença de genes aberrantes, como dsRNA, transgenes ou transposons (Haasnoot e cols., 2003). Este mecanismo hoje é considerado como parte da resposta imune intracelular (Steinert & Levashina, 2011).

Estudos com *Drosophila* mostraram claramente que o RNAi é um mecanismo antiviral, presumivelmente acionado por dupla fita de RNA (dsRNA) formada em células eucarióticas infectadas por vírus, durante sua replicação e leva à degradação do genoma viral. Alguns trabalhos mostram que a infecção por Flavivirus e Alphavirus pode ser

modulada pela via do RNAi em *Aedes aegypti* (Keene e cols., 2004; Cirimotich e cols., 2009; Sanchez Vargas e cols., 2009) e em *Drosophila* com vírus das famílias Dicistroviridae, Nodaviridae e Togaviridae (Zambon e cols., 2006; Sabin e cols., 2009; Mueller e cols., 2010; Wang e cols., 2010). Mutantes de *Drosophila* para os genes chaves da via, *dcr2* e *Ago2*, mostraram-se altamente susceptíveis a infecção com vírus de RNA (van Rij e cols., 2006; Galiana-Arnoux, 2006).

Este mecanismo de silenciamento gênico mediado por RNA tem sido largamente utilizado como ferramenta para o estudo da função de genes em várias espécies de insetos. Em células de mosquito, este fenômeno ocorre em resposta à infecção viral, uma vez que essas células detectam a presença de dsRNA, formada transitoriamente durante a replicação do vírus de RNA. Visto que a dsRNA não é produzida normalmente por células eucarióticas, a presença desta dispara uma série de eventos que culminam na destruição do RNA viral, sendo este considerado por vários autores, o principal mecanismo anti-viral em mosquitos (Sanchez-Vargas e cols., 2004, Blair, 2011). Além do seu papel na proteção contra proliferação de vírus, a via do RNAi tem ainda um papel crucial em processo celulares como: a regulação de genes, proteção contra elementos de transposição e modificação da estrutura da cromatina (Almeida & Allshire, 2005).

O processo se inicia após a detecção da dsRNA. Esta será, então clivada em pequenos RNAs (siRNAs – *small interference RNA*), em um tamanho de 21-25 nucleotídeos por uma enzima RNAase III-simile, chamada DICER. Os fragmentos de dsRNAs são incorporados ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC – do inglês *RNA Induced Silencing Complex*) que possui atividade helicase. A fita antisense do siRNA guia o RISC para o RNA alvo complementar e o componente nuclease do complexo cliva o RNA alvo da sequência específica (Hannon, 2002; Haasnoot e cols., 2003). Além disso, os siRNA podem funcionar como moldes para a síntese de mais dsRNA a partir da fita simples (ssRNA – do inglês *single strand RNA*) numa reação catalisada por uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do hospedeiro, que gera mais dsRNA a partir de ssRNA (Vaistij e cols., 2002; Lipardi & Peterson, 2010). Este sistema permite, por feedback positivo, amplificar o sinal inicial, estimulando a via do RNAi.

A DICER é uma enzima constituída por um domínio N-terminal DEXH-box RNA helicase, um domínio de função desconhecida (DUF283), um domínio PAZ, dois domínios ribonuclease (RIIIa e RIIIb) e um domínio ligado a dsRNA. Em *Drosophilla* há duas Dicers:

dicer1 e *dicer2* - codificadas por *dcr1* e *dcr2* respectivamente. O gene *dcr1* desempenha o papel da biogênese de miRNA, uma via alternativa que leva regulação da expressão gênica. A *dcr2* está envolvida com a produção de siRNA, via que leva a destruição de RNA mensageiro alvo. A função da Dicer não é somente clivar a dsRNA mas também liberar as moléculas de siRNA para o complexo RISC. RISC é um complexo de multiproteínas de 200 - 500 kDa e está diretamente ligada à clivagem do mRNA alvo (Bernstein e cols., 2001). Este é formado principalmente por proteínas da família argonauta (AGO) que são essenciais para o complexo RISC (Bohmert e cols., 1998). A família AGO é definida pela presença de duas regiões conservadas, um domínio PAZ e um domínio PIWI; o domínio PAZ interage com 2 pb dos siRNA ou miRNA; e o domínio PIWI é o responsável pelo silenciamento do RNAm alvo através de sua atividade RNase (Ronemus e cols., 2006). O domínio PAZ é constituído de 100 aminoácidos e o domínio PIWI de 300 aminoácidos na região N- e C-terminal, respectivamente (Cerutti e cols., 1999).

Na infecção por vírus de RNA, a replicação viral leva à formação de uma dupla fita de RNA que é reconhecida e clivada por DICER, formando si-RNAs que iniciam o processo que leva à destruição das cópias do RNA viral, impedindo assim a infecção. Este mecanismo de silenciamento mediado por RNA é um sistema universal em organismos multicelulares e permite que a expressão de RNA seja especificamente regulada a nível pós-transcricional, modulando assim, entre outros processos, a infecção por vírus de RNA, em diferentes modelos. Em contrapartida, muitos vírus têm evoluído para codificar proteínas supressoras de silenciamento (RSS), que podem bloquear a resposta de defesa e evadir do sistema imune do hospedeiro (Bortolamiol e cols., 2008). Embora numerosas RSS tenham sido identificadas, poucas informações estão disponíveis sobre a base molecular de seu modo de ação. Vírus que codificam RSS podem interferir com a produção de siRNA e/ou sequestrar estas moléculas (Li e cols., 2006).

As proteínas de contra-defesa viral com atividade supressora de silenciamento foram originalmente descobertas em membros de vírus de planta. RSS foram encontradas em outros vírus de plantas de RNA de orientação positiva que pertencem aos gêneros *Tombusvirus*, *Sobemovirus*, *Potexvirus* (Voinnet e cols., 1999; 2000), *Pecluvirus* (Dunoyer e cols., 2002) e *Polerovirus* (Pfeffer e cols., 2002) e também em um vírus do gênero *Nodavirus* que infecta inseto (Li e cols., 2002). Vários supressores de silenciamento mediado por RNA tem sido descritos e alguns deles são sintetizados por vírus que infectam animais como a proteína vp35 do vírus Ebola (Haasnoot e cols., 2007), a

proteína B2 do Flock house vírus (FHV) que infecta *Drosophila* (Lingel e cols., 2005), a proteína Tat do vírus HIV-1 (Bennasser & Jeang, 2006; Qian e cols., 2009), proteína NS1 do vírus influenza (de Vries e cols., 2008) e a proteína NSs do La Crosse vírus que infecta tanto insetos quanto hospedeiros humanos (Soldam e cols., 2005), entre outras.

Os mecanismos de supressão de RNAi conhecidos, descrevem sempre a inibição de um dos passos da via de RNAi. A base molecular para atividade supressora foi somente elucidada para algumas poucas proteínas supressoras, como a P19 que é codificada por vírus que atacam tomateiro. Esta, se liga diretamente ao siRNA impedindo sua ligação ao RISC, sua propagação ou amplificação pela RDRp (Rawlings e cols., 2011). Outros SSPs, incluindo a P21 de Closterovirus e HC-Pro de Potyvirus podem também se ligar a siRNA (Bortolamiol e cols., 2008). Além disso, a proteína 2B interage com uma proteína componente da via de silenciamento, presente nos vírus do mosaico, da família Cucumovirus e no FHV família Nodaviridae, do gênero *Alphanodavirus* (Li e cols., 2002). Recombinantes de proteínas 2B de FHV quando inoculados em cultura de células de *Aedes aegypti* inibem a via do RNAi e o título viral aumenta. Quando administrado em mosquitos *Aedes aegypti* aumenta também o título viral e observam-se mudanças fisiológicas e comportamentais, como diminuição do tempo de vida e oviposição (Cirimotich e cols., 2008).

A primeira evidência de que uma rota funcional similar a do RNAi existia em *Aedes aegypti*, foi obtida por Olson e cols (1996) a partir de estudos para gerar células que fossem resistentes a DENV2. Foi observado que um Sindbis vírus (família Togaviridae, gênero *Alphavirus*, complexo WEEV) recombinante que apresenta uma região codificante para o gene prM do DENV2 em seu genoma, tanto na orientação “sense” como na “anti-sense”, torna as células resistentes a um desafio com DENV-2, mas não com DENV-3. Os mesmos resultados foram observados quando fêmeas adultas de *Aedes aegypti* foram co-injetadas com 10^3 pfu/mL de Sindbis vírus recombinante e DENV-2. Em outro trabalho do mesmo grupo, Sanchez-Vargas e cols (2004) mostram que Sindbis vírus pode silenciar genes endógenos como o da “Early trypsin” (*TrypEarl*) em *Ae. aegypti*, se o seu genoma possuir uma região que codifica esta proteína. Os resultados indicam que a expressão da sequência de RNA da *TrypEarl* pelo Sindbis vírus recombinante leva ao silenciamento do gene da *TrypEarl* e a degradação do seu mRNA no intestino médio de mosquitos, com o aparecimento de siRNAs (small interferenceRNAs, 21-25nt) a marca registrada do processo de RNAi. Estes resultados mostram que o fenômeno de RNAi esta presente em mosquitos e provavelmente atua como um mecanismo de defesa antiviral. Como em vírus

que infectam plantas, e possível que vírus animais tenham também desenvolvido contra-defesas, através da supressão de RNAi, quer seja por expressão de proteínas supressoras, quer seja por algum mecanismo celular de supressão ou escape. Assim, é possível que a competência vetorial de *Ae aegypti* ao vírus dengue também esteja relacionado à sua atividade antiviral mediada por RNAi e, em contrapartida, a sua capacidade de burlar este mecanismo.

Sanchez e colaboradores (2009) mostraram que a infecção por DENV é modulada pela via do RNAi e, portanto, este é o principal determinante da transmissão de DENV pelo vetor *Aedes aegypti*. Eles mostraram que a infecção oral de mosquitos e células de *Ae. Aegypti* por DENV2 gera dsRNA e produz siRNA específicos para DENV2. Além disso, que o silenciamento de *dcr2*, *r2d2* ou *ago2*, genes que codificam importantes sensores e proteínas efetoras da via do RNAi, causa o aumento da replicação viral no vetor e diminui o período de incubação extrínseco requerido para a transmissão viral. A associação do mecanismo de RNAi com competência vetorial em populações naturais de *Aedes aegypti* tem sido mostrado recentemente (Carvalho-Leandro e col., 2012). Este trabalho apresenta a relação entre variações naturais de competência vetorial para DENV e a expressão diferencial de transcritos, entre eles *dcr2*. Foi observado que a expressão de *dcr2* varia entre as populações naturais de *Aedes aegypti* e que é significativamente menor em amostras de mosquitos de campo infectados com DENV2 quando comparada ao controle, sugerindo que este mecanismo pode ser essencial na infecção viral.

O monitoramento da expressão de *dcr2* e outros genes da via do RNAi em populações naturais de *Aedes aegypti* pode ser uma importante ferramenta de mapeamento de populações quanto a sua suscetibilidade a DENV, de potencial valor preditivo que merece ser melhor investigada (Amaral, 2008). Além disso, a regulação negativa destes transcritos após a infecção com DENV pode indicar ainda uma manipulação viral de defesas do mosquito (Silva, 2009). Recentemente foi identificado o supressor de RNAi produzido pelo DENV e *west nile virus* (Schnettler e cols, 2012). O trabalho mostra que uma molécula de RNA subgenômico (sfRNA) suprime eficientemente as vias de RNAi induzidas tanto por siRNA como por miRNA, em células de mamíferos e em células de insetos. O mecanismo do supressor é inibir a atividade de clivagem da dsRNA promovida por DICER.

Considerações Finais.

25

O controle e prevenção de doenças causadas por arbovírus requer uma série de medidas, entre elas o controle das populações do vetor, o monitoramento da sua resistência a inseticidas e o desenvolvimento de uma vacina eficaz. No caso da dengue, as ferramentas de combate à doença quando disponíveis não tem apresentado resultados satisfatórios até o momento. Não há ainda uma vacina disponível no mercado, embora várias estejam em teste. As atividades de prevenção da dengue no Brasil contam com o monitoramento contínuo dos Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti* nos municípios, como forma de se identificar áreas de maior densidade vetorial. Além disso, temos um sistema bastante confiável de monitoramento da resistência a inseticidas. A situação epidemiológica dos sorotipos circulantes também é realizada, sendo esta uma informação importante para que medidas de controle e alerta sejam adequadas. Entretanto, não se observa redução do número de casos de uma maneira consistente, mas um decréscimo no número de casos como resultado da característica cíclica da doença. Assim, é urgente o desenvolvimento de novas ferramentas e o ajuste de velhas metodologias para a realidade atual.

Uma das estratégias mais recentes no controle do vetor é conhecida como RIDL (release of insects carrying a dominant lethal), baseada na produção de mosquitos que carregam um gene letal dominante que suprime a população do vetor. Um *Aedes aegypti* transgênico chamado OX3604C foi construído para produzir uma fêmea que não voa (Wise de Valdez, 2010), com um potencial de eliminação da população do vetor em 10-20 semanas. Em 2010, a Wellcome Trust anunciou que o governo da Malásia aprovou a liberação de mosquitos machos estéreis de *Aedes aegypti* para controlar a dengue. A Oxitec, uma empresa britânica de biotecnologia, desenvolveu estes mosquitos transgênicos e conduziu um teste inicial nas Ilhas Cayman em 2009/2010. Outra importante estratégia é a introdução de *Wolbachia* em mosquitos *Aedes aegypti*. Esta estratégia diminui a longevidade do inseto e interfere com a habilidade do mosquito de transmitir dengue (Moreira e cols, 2009). Testes tem sido realizados na Austrália e Vietnam com bastante sucesso.

Outra opção é a utilização de mosquitos transgênicos cuja alteração gênica interrompa o ciclo de vida do vetor ou a sua interação com o vírus. Neste aspecto, o estudo da interação inseto-vírus tem fornecido conhecimentos sobre o ciclo de

transmissão da doença e o potencial de utilização de mosquitos geneticamente modificados refratários ao vírus dengue. Hipoteticamente isto pode ser feito utilizando-se genes relacionados à competência vetorial da espécie, de forma a conferir refratariedade do mosquito ao vírus, interrompendo assim o ciclo de transmissão e, em consequência, controlando a doença. Entretanto, há muito ainda a ser estudado com respeito à Biologia do vetor, e à interação deste com o DENV de forma a entender a soma de fatores que determinam a competência vetorial de uma espécie.

Um resumo das etapas de interação do vírus dengue com os diversos tecidos do mosquito pode ser visto na **figura 6**.

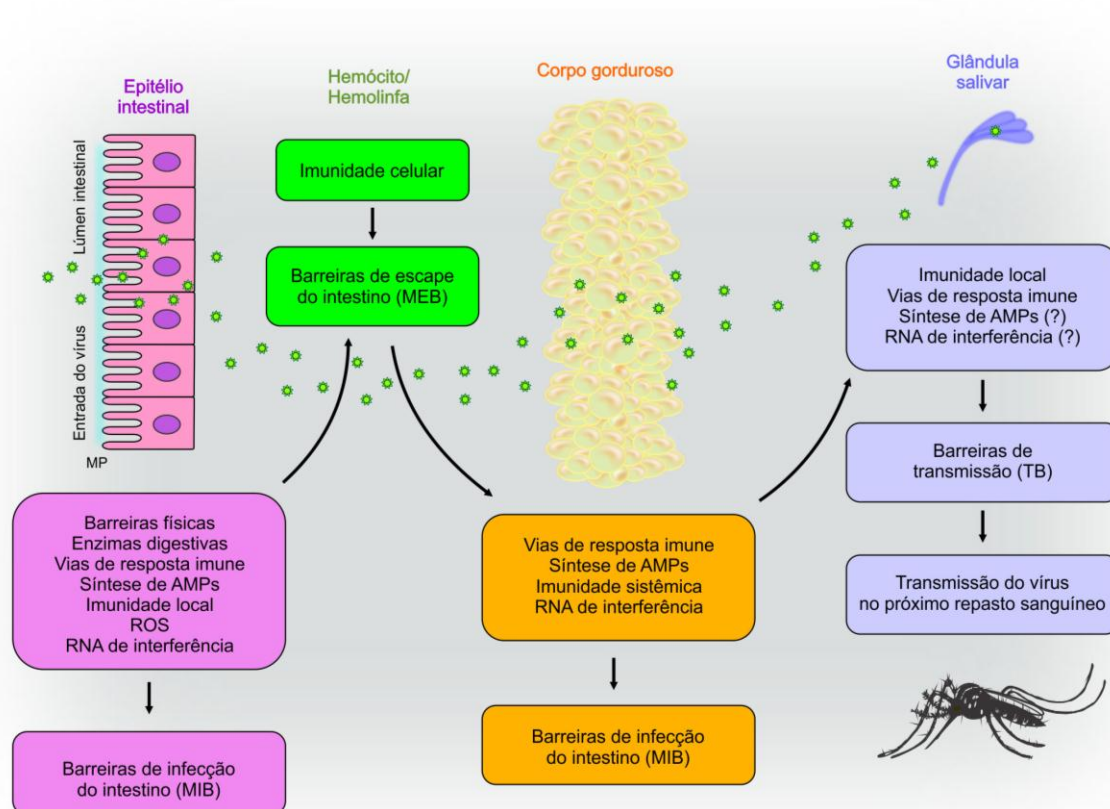


Figura 6. Resumo das etapas da interação entre o vírus dengue e o mosquito *Aedes aegypti*. MP – matriz peritrófica; AMP – peptídeos antimicrobianos.

Referências Bibliográficas.

Agaisse, H. & Perrimon, N., 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews*, 198: 72–82.

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

Avadhanula, V., Weasner, B.P., Hardy, G.G., Kumar, J.P., Hardy, R.W., 2009. A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the IMD pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathog.*, 5: e1000582.

Barillas-Mury, C., Han, Y.S., Seeley, D., Kafatos, F.C., 1999. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.*, 18(4):959-67.

Barrilas-Mury, C., Paskewitz, S., Kanost, M.R., 2005. Immune Response of Vectors, in: Beaty, B.J. and Marquardt, W.C.(Eds.), *The Biology of Disease Vectors*. University Press, Colorado, p 363.

Bennasser, Y., Jeang, K.T., 2006. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology*, 3: 95.

Bennett, K.E., Olson, K.E., Muñoz, M.L., Fernandez-Salas, I., Farfan-Ale, J.A., Higgs, S., Black, W.C. 4th, Beaty, B.J., 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg.*, 67(1):85-92.

Bennett, K.E., Flick, D., Fleming, K.H., Jochim, R., Beaty, B.J., Black, W.C. 4th., 2005. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, 170(1):185-94.

Bezerra, E.B., Castro Jr., F.P., Santos, J.W., Santos, T.S., Fernandes, C.R.M., 2006. Biology And Thermal Exigency Of *Aedes Aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) From Four Bioclimatic Localities Of Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35 (6): 853-860.

McBride, W.J.H., Bielefeldt-Ohmann, H., 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and Infection*, 2: 1041–1050.

Black, W.C. 4th., Bennett, K.E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C.V., Fernández-Salas, I., Muñoz, M.L., Farfán-Alé, J.A., Olson, K.E., Beaty, B.J., 2002. Flavivirus Susceptibility In *Aedes Aegypti*. *Arch. Med. Res.*, 33 (4): 379– 388.

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

Bosio, C.F., Fulton, R.E., Salasek, M.L., Beaty, B.J., Black, W.C. 4th., 2000. Quantitative Trait Loci That Control Vector Competence For Dengue-2 Virus In The Mosquito *Aedes Aegypti*. *Genetics*, 156: 687–698.

Brackney, D.E., Foy, B.D., Olson, K.E., 2008. The Effects of Midgut Serine Proteases on Dengue Virus Type 2 Infectivity of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.*; 79(2): 267–274.

Cirimotich, C.M., Scott, J.C., Phillips, A.T., Geiss, B.J., Olson, K.E., 2009. Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.*, 9:49.

Claro, L.B.L., Tomassini, H.C.B., Rosa, M.L.G., 2004. Prevenção e Controle do Dengue: Uma Revisão de Estudos Sobre Conhecimentos, Crenças e Práticas da população. *Caderno De Saúde Pública*, 20 (6):1447-1457.

Clyde, K., Harris, E., 2006. RNA Secondary Structure In The Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and is Required For Viral Replication. *Journal of Virology*, 80 (5): 2170-2182.

Consoli, R.A.G.B., Lourenço-de-Oliveira, R., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p.

de Vries, W., Haasnoot, J., Fouchier, R., de Haan, P., Berkhout, B., 2009. Differential RNA silencing suppression activity of NS1 proteins from different influenza A virus strains. *J. Gen. Virol.*, 90: 1916–1922.

Devenport, M., Jacobs-Lorena M., 2005. The peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. in: Beaty, B.J. and Marquardt, W.C. (Eds.), *The Biology of Disease Vectors*. University Press, Colorado, p 415-448.

Donalísio, M.R., Glasser, C.M., 2002. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. *Rev. Brasileira de Epidemiologia*, 5 (3): 259-269.

Edigil, D., Polacek, C., Harris, E., 2006. Dengue Virus A Novel Strategy For Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *Journal of Virology*, 80 (6): 2976-2986.

Ferrandon, D., Imler, J.-L., Hetru, C., Jules, A., Hoffmann, J.A., 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 7: 862-874.

Figueiredo, R.M.P., Naveca, F.G., Bastos, M.S., Melo, M.N., Viana, S.S., Mourão, M.P.G., Costa, C.A., Farias, I.P., 2008. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 14(4): 667-669.

Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E.E., Mello, C.C., 1998. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806-811.

Garver, L.S., Xi, Z., Dimopoulos, G., 2008. Immunoglobulin superfamily members play an important role in the mosquito immune system. *Dev Comp Immunol.*, ;32(5): 519-31.

Kopp, E.B., Medzhitov, R., 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* , 11:13–18.

Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological Mediators of Insect Immunity. *Annu. Rev. Entomol.*, 42:611–43.

Gorrochotegui-Escalante, N., Lozano-Fuentes, S., Bennett, K.E., Molina-Cruz, A., Beaty, B.J., Black, W.C. 4th., 2005. Association mapping of segregating sites in the early trypsin gene and susceptibility to dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35(7):771-88.

Gubler, D.J., 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 480 -496.

Haasnoot, J., de Vries, W., Geutjes, E.J., Prins, M., de Haan, P., Berkhout, B., 2007. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog.*, 3(6):e86.

Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature*, 418(6894):244-51.

Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., Hultmark, D., 1999. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell*, 4(5):827-37.

Heinz, F.X., Stiasny, K., 2012. Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology*. in press.

Heinz, F.X., Stiasny, K., 2012. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*, 19;30(29):4301-6.

Keene, K.M., Foy, B.D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B.J., Blair, C.D., Olson, K.E., 2004. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; *Togaviridae*) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(49):17240-5.

Kettle, D.S., 1995. *Medical and Veterinary Entomology*, 2nd Edn. Wallingford: Cab International.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6):973-83.

31

Lenzi, M.F.E., Coura, L.C., 2004. Prevenção Da Dengue: A Informação Em Foco. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 37(4):343-350.

Lima-Camara, T.N., Bruno, R.V., Luz, P.M., Castro, M.G., Lourenço-de-Oliveira, R., Sorgine, M.H., Peixoto, A.A., 2011. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One*, 6(3):e17690.

Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., Sattler, M., 2005. The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep.*, 6(12):1149-55.

Lourenço-de-Oliveira, R., Vazeille, M., de Filippis, A.M., Failloux, A.B., 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 98(1):43-54.

Maciel-de-Freitas, R., Koella, J.C., Lourenço-de-Oliveira, R., 2011. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 105(8):452-8.

Matheson, R., 1932. The Utilization of Aquatic Plants as Aids In Mosquito Control. *Rep. Smithson. Instn*: 413-30.

Mercado-Curiel, R.F., Black, W.C. 4th, Muñoz, M. de L., 2008. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol.*, 15;8:118.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C., 2004. Structure of The Dengue Virus Envelope Protein After Membrane Fusion. *Nature*, 427: 313-315.

Molina-Cruz, A., Gupta, L., Richardson, J., Bennett, K., Black, W.C. 4th, Barillas-Mury, C., 2005. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.*, 72(5):631-7.

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L.E., Johnson, K.N., Kay, B.H., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya and *Plasmodium*. *Cell* 139: 1268-1278.

Mueller, S., Gausson, V., Vodovar, N., Deddouche, S., Troxler, L., Perot, J., Pfeffer, S., Hoffmann, J.A., Saleh, M.C., Imler, J.L., 2010. RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*. *PNAS*, 107 | no. 45

Munstermann, L.E., Conn, J.E., 1997. Systematics Of Mosquito Disease Vectors (Diptera, Culicidae): Impact Of Molecular Biology And Cladistic Analysis. *Ann. Rev. Entomol.*, 42, 351-369.

Nemésio, H., Palomares-Jerez, F., Villalaín, J., 2012. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: Membranotropic regions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818 : 2818–2830.

Nogueira, R.M., Eppinghaus, A.L., 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 106(3):255-6.

Oliveira, J.H.M., Gonçalves, R.L.S., Lara, F.A., Dias, F.A., Gandara, A.C.P., Menna-Barreto, R.F.S., Edwards, M.C., Laurindo, F.R.M., Silva-Neto, M.A.C., M.H.F., Oliveira, P.L., 2011. Blood Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows Proliferation of Intestinal Microbiota. *PLoS Pathog.* 7(3): e1001320.

Olson, K.E., Higgs, S., Gaines, P.J., Powers, A.M., Davis, B.S., Kamrud, K., Carlson, J.O., Blair, C.D., Beaty B.J., 1996. Genetically Engineered Resistance to Dengue-2 Virus Transmission in Mosquitoes. *Science*, 272 (5263): 884-6

Ostera, G.R., Gostin, L.O., 2011. Biosafety Concerns Involving Genetically Modified Mosquitoes to Combat Malaria and Dengue in Developing Countries. *JAMA*, 305, No. 9.

Puig-Basagoiti F., Tilgner, M., Forshey, BM., Phillpott, SM., Espina, NG., Wentworth DE., Goebel, SJ., Masters, PS., Falgout, B., Ren, P., Ferguson, DM., Shi, P-Y., 2006. Triaryl Pyrazoline Compound Inhibits Flavivirus RNA Replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4 (50): 1320-29.

Qian, S., Zhong, X., Yu, L., Ding, B., de Haan, P., Boris-Lawrie, K., 2009. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 106(2):605–610.

Rawlings, R.A., Krishnan, V., Walter, N.G., 2011. Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple-turnover *J Mol Biol*, 408(2): 262–276.

Rodrigues, J., Brayner, F.A., Alves L.C., Dixit R., Barillas-Mury, C., 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science*, 329(5997):1353-5.

Sabin, L.R., Zhou, R., Gruber, J.J., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., Lau, C.K., Thompson, C.B., Cherry, S., 2009. *Ars2* regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in *Drosophila*. *Cell*; 138: 340-351.

Sanchez-Vargas, I., Travanty, E.A., Keene, K.M., Franz, A.W.E., Beaty, B.J., Blair, C.D., Olson, K.E., 2004. RNA Interference, Arthropode-Borne Viruses, and Mosquitoes. *Virus Research*, 102: 65-74.

Sanchez-Vargas, I., Scott, J.C., Poole-Smith, B.K., Franz, A.W., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog.*, 5(2):e1000299.

Schnettler, E., Sterken, M.G., Leung, J.Y., Metz, S.W., Geertsema, C., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., Kohl, A., Khromykh, A.A., Pijlman, G.P., 2012. Non-coding flavivirus RNA displays RNAi suppressor activity in insect and mammalian cells. *J Virol.* 86(24): 13486-500.

Silva, B.A., 2009. Expressão de genes da via do RNAi em populações naturais de *Aedes aegypti* em resposta à infecção viral por DENV2. Monografia de conclusão do curso de bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 58p.

Simmons, C.P., Farrar, J.J., van VinhChau, N., Wills, B., 2012. Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 366:1423-32.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, J.E., Joshua-Tor, L., 2004. Crystal Structure of Argonaute And Its Implications For RISC Slicer Activity. *Science*, 305(5689):1409-1410.

Souza-Neto, J.A., Sim, S., Dimopoulos, G., 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(42):17841-6.

Tchankouo-Nguetcheu, S., Khun, H., Pincet, L., Roux, P., Bahut, M., Huerre, M., Guette, C., Choumet, V., 2010. Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PLoS One*, 5(10). pii: e13149.

van Rij, R.P., Saleh, M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.*, 20(21):2985-95.

Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C., 2000. A Viral Movement Protein Prevents Spread Of The Gene Silencing Signal In *Nicotiana Benthamiana*. *Cell*, 103: 157-167.

Voinnet, O., Pinto, Y.M., Baulcombe, D.C., 1999. Suppression Of Gene Silencing: A General Strategy Used By Diverse DNA and RNA Viruses Of Plants. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 14147-14152.

Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., Ding, S.W., 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*; 312: 452-454

Wei, H.Y., Jiang, L.F., Fang, D.Y., Guo, H.Y., 2003. Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. *J Gen Virol.*, 84(Pt 11):3095-8.

Wise de Valdez, M.R., Nimmo, D., Betz, J., Gong, H.F., James, A.A., 2011. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(12):4772-5.

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

Zambon, R.A., Nandakumar, M., Vakharia, V.N., Wu, L.P., 2005. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 102: 7257–7262.

Zambon, R.A., Vakharia, V.N., Wu, L.P., 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol.*, 8: 880-889