

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS INDUZIDAS POR *WOLBACHIA*: UMA NOVA  
ABORDAGEM PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA DENGUE**

MÁRCIA APARECIDA OLIVEIRA ARAÚJO

Belo Horizonte

2019

MÁRCIA APARECIDA OLIVEIRA ARAÚJO

**ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS INDUZIDAS POR *WOLBACHIA*: UMA NOVA  
ABORDAGEM PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA DENGUE**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de especialista em microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Co-orientadora: Mestre Poliana de Oliveira Figueiredo

Belo Horizonte

2019

Dedico este trabalho ao meu melhor amigo de todas as horas, Aquele que é a razão da minha vida, Jesus.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, com todo meu coração, a todas as pessoas que me ajudaram neste sonho. Primeiramente agradeço ao Senhor da minha vida por caminhar comigo todos os dias. Agradeço pelo Seu amor, Sua força, Sua orientação e Sua graça sobre mim.

À minha querida orientadora, professora Giliane, por me aceitar como sua aluna, por acreditar em mim, me incentivar e por toda compreensão! Obrigada por me acolher com tanto carinho!

À minha querida co-orientadora Poliana, por me ensinar tanto! Agradeço pelo carinho, pela imensa dedicação, paciência, compreensão, incentivo e força! Vocês são muito especiais!

Aos meus professores do curso de Especialização em Microbiologia Aplicada pelo conhecimento e incentivo e também aos amigos que fiz. Em especial, minha amiga Thaís, um presente maravilhoso que eu recebi! Vou levar vocês pra sempre no meu coração!

Aos meus queridos pais, Maria Célia e José Raimundo e meu irmão, Márcio, por me incentivarem e sonharem comigo.

Ao meu esposo, Elder, por tanto amor e compreensão que deixaram os meus dias mais leves e cheios de paz.

Em especial agradeço também aqueles que me acolheram com tanto carinho aqui em Belo Horizonte! Ao meu querido cunhado Erick, por sua ajuda incondicional, às minhas amigas Drielle e Kátia.

Aos meus amigos de trabalho por compreenderem minha ausência e me ajudarem a realizar este sonho, em especial, minha amiga Aline! Você faz parte dessa história!

Com o coração transbordando de alegria, deixo aqui meu muitíssimo obrigada a cada um de vocês!

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos. “*

**- Fernando Teixeira de Andrade**

## RESUMO

A dengue é a arbovirose de maior incidência mundial ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais do planeta sendo considerada um problema de saúde pública. Cerca de 128 países estão em situação de risco para a doença, registrando anualmente 390 milhões de novos casos. A urbanização não planejada, globalização, mudanças climáticas e no ambiente natural contribuíram para a dispersão global da dengue observada nos últimos anos. O vírus da dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e são conhecidos quatro sorotipos geneticamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Todos eles são transmitidos ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. Atualmente, as medidas de prevenção e controle da dengue baseiam-se, principalmente, na redução das populações do inseto vetor através do controle físico e químico. Contudo, o cenário epidemiológico atual reforça a necessidade de novas metodologias promissoras e sustentáveis, tal como o controle biológico da dengue. Dessa forma, esse trabalho de conclusão de curso, visou realizar uma compilação bibliográfica sobre o controle biológico da dengue através da utilização de uma bactéria encontrada naturalmente em diversos insetos, a *Wolbachia*, para controle das populações de mosquitos *Aedes aegypti*. Estudos experimentais comprovaram a capacidade da *Wolbachia* em bloquear a transmissão do DENV por meio de alterações fenotípicas induzidas ao seu hospedeiro. O fato da *Wolbachia* ser transmitida verticalmente para a sua prole, confere um caráter autossustentável ao método, dispensando a necessidade de constantes intervenções ou manipulações nos insetos vetores. Neste contexto, os novos avanços tecnológicos disponíveis, quando associados aos métodos de controle existentes, são capazes de potencializar o alcance e a efetividade das ações de controle e prevenção da dengue.

Palavras-chave: *Wolbachia*, controle biológico, dengue, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

Dengue is, among the arboviruses, the one with the highest incidence worldwide occurring mainly in tropical and subtropical regions of the planet being considered a public health problem. About 128 countries are at risk for the disease, registering an annual average of 390 million new cases. Unplanned urbanization, globalization, climate change and in the natural environment have contributed to the global spread of dengue observed in recent years. DENV belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus* and four serotypes have been described: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. All of them are transmitted to humans by the bite of mosquitoes of the genus *Aedes*. Currently, dengue prevention and control measures are mainly based on the reduction of insect vector populations through physical and chemical control. However, the current epidemiological scenario reinforces the need for promising new and sustainable methodologies, such as biological control of dengue. In this way, this work of course completion, aimed to perform a bibliographical compilation on the biological control of dengue through the use of a bacterium found naturally in several insects, *Wolbachia*, to control the populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. Experimental studies have demonstrated *Wolbachia* ability to block DENV transmission through phenotypic changes induced by its host. The fact that *Wolbachia* is transmitted vertically to its offspring confers a self-sustaining character to the method, dispensing with the need for constant interventions or manipulations in the vector insects. In this context, the new technological advances available when associated with existing control methods are capable of enhancing the reach and effectiveness of dengue control and prevention actions.

**Keywords:** *Wolbachia*, biological control, dengue, *Aedes aegypti*.

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO .....	13
2.0 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
3.0 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.0 REVISÃO DE LITERATURA .....	177
4.1 Histórico da dengue e situação epidemiológica atual .....	17
4.2 Os <i>Flavivirus</i> .....	21
4.3 Dengue vírus .....	21
4.4 Ciclo de multiplicação do DENV .....	24
4.5 Patogênese da dengue .....	26
4.6 Dengue: aspectos clínicos e laboratoriais .....	27
4.7 Ciclo de manutenção do DENV .....	28
4.8 Vetores da dengue .....	30
4.9. Medidas de controle da dengue.....	33
4.9.1 Histórico de controle do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil .....	33
4.9.2 Controle físico da dengue .....	35
4.9.3 Controle químico da dengue.....	36
4.9.4 Controle biológico da dengue.....	39
4.10 Interação <i>Wolbachia</i> -hospedeiro.....	42
4.11 Bloqueio de patógenos induzido por <i>Wolbachia</i> .....	48
4.12 Utilização da <i>Wolbachia</i> no controle e transmissão da dengue .....	49
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
REFERÊNCIAS .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Histórico da reintrodução do DENV no Brasil.....	18
Figura 2: Países em risco para a transmissão da dengue .....	19
Figura 3: Monitoramento viral do DENV em 2018 no estado de Minas Gerais .....	20
Figura 4: Representação esquemática da partícula viral do DENV.....	22
Figura 5: Representação esquemática da organização do genoma do DENV.....	22
Figura 6: Árvore filogenética dos quatro sorotipos do DENV .....	23
Figura 7: Ciclo de multiplicação do DENV.....	25
Figura 8: Crio-microscopia eletrônica do DENV-1.....	26
Figura 9: Representação do ciclo silvestre e ciclo urbano do DENV.....	29
Figura 10: Ciclo da infecção pelo DENV em humanos.....	30
Figura 11: Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .....	31
Figura 12: Distribuição global de <i>Aedes aegypti</i> . .....	32
Figura 13 Distribuição global de <i>Aedes albopictus</i> .....	32
Figura 14: Micrografia eletrônica de transmissão de <i>Wolbachia</i> no interior da célula de um inseto.....	41
Figura 15: Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia</i> em diferentes hospedeiros .....	43
Figura 16: Representação esquemática do mecanismo de partenogênese induzida por <i>Wolbachia</i> .....	44
Figura 17: Representação esquemática do mecanismo de incompatibilidade unidirecional .....	45
Figura 18: Representação esquemática do mecanismo de incompatibilidade bidirecional .....	46
Figura 19: Representação esquemática do mecanismo genético de IC .....	47
Figura 20: Casos de dengue registrados na cidade de Townsville, Austrália .....	51
Figura 21: Estratégia do programa Eliminar a dengue: desafio Brasil.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos prováveis de dengue por mês de início de sintomas, 2010 a 2018, Minas Gerais.....	20
Tabela 2: Produtos recomendados pela OMS para controle das formas larvais de <i>Aedes aegypti</i> .....	37
Tabela 3: Produtos recomendados pela OMS para controle das formas adultas de <i>Aedes aegypti</i> .....	37
Tabela 4: Produtos larvicidas recomendados pela OMS para aplicação em água potável.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE - Agentes de Controle de Endemias  
ACS - Agentes Comunitários de Saúde  
ADE - antibody-dependent enhancement  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
*Bti- Bacillus thuringiensis israelensis,*  
CDC - Centers for Disease Control and Prevention  
CHIKV *Chikungunya virus*  
CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa  
CSIRO - Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Comunidade das Nações  
DENV - *Dengue virus*  
DENV-1 -*Dengue virus 1*  
DENV-2 - *Dengue virus 2*  
DENV-3 -*Dengue virus 3*  
DENV-4 -*Dengue virus 4*  
DC-SIGN - Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (integrina específica de células dendríticas)  
FHD - Febre hemorrágica da dengue  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis  
IC - Incompatibilidade citoplasmática  
ICTV -International Committee on Taxonomy of Viruses  
Fc - Fragmento cristalizável  
IFN- $\alpha$  - Interferon alfa  
INF-  $\beta$ - Interferon beta  
IFN- $\gamma$  - Interferon gama  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 - Interleucina 8  
IL-10 - Interleucina 10  
IPCS - Programa Nacional de Segurança Química  
Kb - Kilobases  
mRNA - RNA mensageiro  
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAYV - *Mayaro virus*

Mb - Megabases

MS - Ministério da Saúde

NCBI - National Center for Biotechnology Information

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

ORF - Open Reading Frame

PACS - Programa de Agentes Comunitários da Saúde

PEAa - Plano de Erradicação do *Aedes Aegypti*

PNCD - Programa Nacional de Controle da Dengue

PSF - Programa Saúde da Família

rRNA - RNA ribossômico

RNA - Ácido Ribonucléico

RER – Retículo endoplasmático rugoso

SCIELO - Scientific Eletronic Library Online

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WHOPES - World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme

## 1.0 INTRODUÇÃO

As arboviroses são consideradas atualmente um grave problema de saúde pública (FERGUSON, 2018; GUZMAN *et al.*, 2016; WHO, 2018). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças transmitidas por insetos vetores correspondem a cerca de 17% de todas as doenças infecciosas e são responsáveis por quase um milhão de mortes anualmente, gerando um grande impacto socioeconômico (WHO, 2017).

A epidemiologia das arboviroses é determinada pela dinâmica de um conjunto de fatores que envolvem características do hospedeiro, do agente viral, dos insetos vetores e também do ambiente no qual estes vírus estão inseridos (GUZZETTA *et al.*, 2018). A re-emergência de arboviroses observada nos últimos anos, deve-se a vários fatores, dentre os quais podem ser citados o crescimento populacional urbano descontrolado, ampliação do comércio internacional, modificação do ambiente natural pela atividade humana e alterações climáticas globais (LIANG *et al.*, 2015 e GOULD *et al.*, 2017).

A dengue é a arbovirose de maior incidência em todo o mundo com prevalência em regiões de clima tropical e subtropical em áreas urbanas e semi-urbanas (GUZMAN *et al.*, 2016; WHO, 2018). É transmitida aos seres humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, que também podem transmitir vírus causadores da chikungunya, zika e febre amarela (WHO, 2018). A co-circulação das arboviroses no território brasileiro gera dificuldades quanto ao diagnóstico clínico pela semelhança de sintomas entre elas podendo ainda contribuir para o aumento da gravidade ou futuras complicações nos casos de co-infecção (CAMARA, 2016).

No Brasil, o clima tropical predominante com grandes áreas de floresta favorece o desenvolvimento de vetores competentes para diversas arboviroses (LOPES *et al.*, 2014). Atualmente as principais medidas de controle da dengue se baseiam na eliminação do inseto vetor. No entanto, a situação epidemiológica do Brasil sugere que as medidas preventivas atuais como campanhas de educação em saúde, vigilância epidemiológica, entomológica, e ações de controle multisetoriais não são totalmente eficazes reforçando a necessidade de novas estratégias sustentáveis, seguras e eficientes (RODRIGUES; BEDRIKOW, 2016). Outro fator preocupante é o

uso de inseticidas para eliminação de mosquitos, o que representa um risco à saúde humana, animal e ambiental (BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016).

Desse modo, o presente trabalho visa fazer um apanhado literário sobre a utilização de *Wolbachia* como agente de controle biológico do *Aedes aegypti*. Uma técnica segura, inovadora e autossustentável sem o uso de substâncias químicas que impactam a saúde humana, animal e do meio ambiente.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão bibliográfica sobre o controle biológico da dengue através da utilização da bactéria *Wolbachia* em *Aedes aegypti*.

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho, de caráter descritivo, foi desenvolvido a partir de uma pesquisa exploratória realizada nas bases de dados: *PubMed*, *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS/BIREME). Outras literaturas de referência mundial também foram consultadas como a Organização Mundial da Saúde (OMS), o *Centers for Disease Control e Prevention* (CDC), *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) e também o Portal Nacional do Ministério da Saúde.

As palavras chave utilizadas para a busca de artigos foram: *Wolbachia*, *biological control dengue*, *Aedes aegypti control*, *arboviruses*, *dengue*, *dengue in Brazil*.

A revisão foi desenvolvida de forma criteriosa a fim de selecionar informações atuais assim como trabalhos antigos, mas que são referência na produção científica sobre o tema abordado como os autores Luciano Moreira (FIOCRUZ), Scott L. O'Neill (Universidade da Austrália) e Duane J. Gubler (Universidade do Havaí).

## 4.0 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Histórico da dengue e situação epidemiológica atual

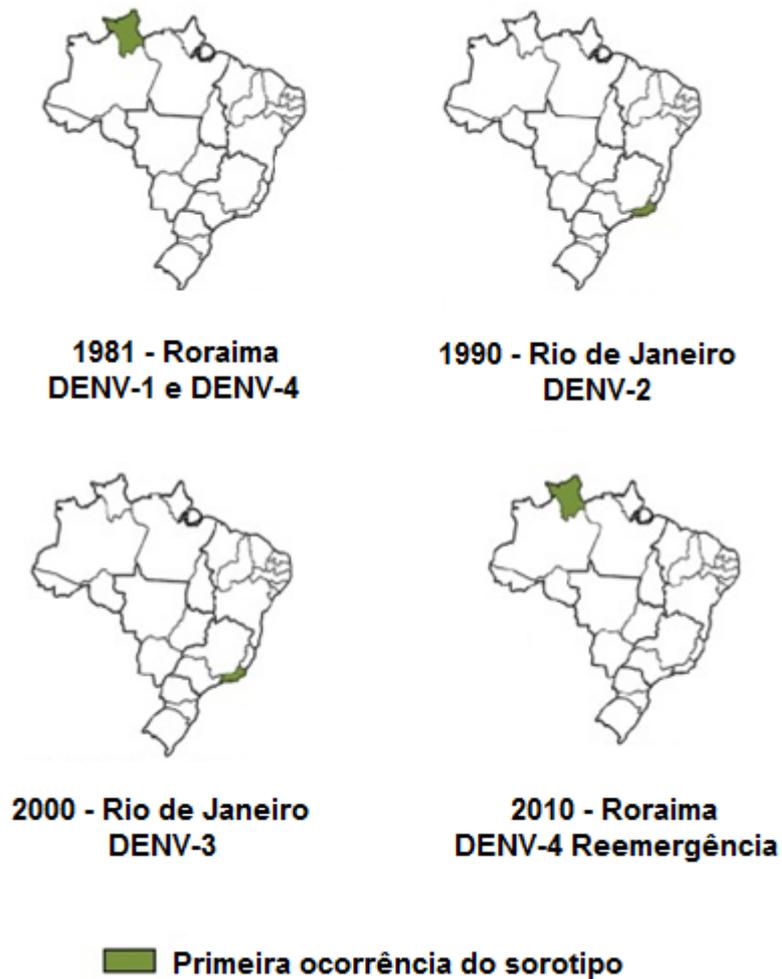
O primeiro registro de doença sintomática similar a dengue aconteceu durante a Dinastia Chinesa Jin (265-420 d.C.). Acreditava-se que a doença era transmitida por insetos voadores que estavam associados à água, sendo inicialmente chamada de “veneno da água”. Prováveis casos de dengue foram registrados também nas Antilhas Francesas e no Panamá nos anos de 1635 e 1699, respectivamente e as primeiras grandes epidemias notificadas ocorreram entre os anos de 1779 a 1780 na Ásia, África e América do Norte. Em 1780, o médico Benjamin Rush realizou a primeira descrição detalhada da doença quando um grande surto acometia a cidade de Filadélfia (GUBLER, 1998).

Os primeiros relatos de dengue no Brasil ocorreram no século XIX nas cidades do Rio de Janeiro, São Paulo e Salvador no ano de 1846. No ano de 1955 o mosquito *Aedes aegypti* foi erradicado do território brasileiro como resultado do programa de combate à febre amarela desenvolvido pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). Porém, a descontinuação dos programas de controle levou à reintrodução do vetor novamente no país em 1967 no estado da Bahia (BRAGA e VALLE, 2007). A partir de então, a primeira epidemia de dengue com comprovações clínicas e laboratoriais se deu na cidade de Boa Vista, Roraima, entre os anos de 1981 e 1982, chegando a 7000 casos estimados da doença e com a circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (Figura 1) (OSANAI *et al.*, 1983). Novos surtos foram descritos e em 1986 o DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, tornando-se um problema de saúde pública (SCHATZMAYR *et al.*, 1986).

Posteriormente, a circulação de um novo sorotipo viral, o DENV-2, também no Rio de Janeiro em 1990, estava associado ao aumento da gravidade da dengue, sendo relatados os primeiros casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) no Brasil. Outros estados também foram atingidos e vários surtos pelo DENV-1 e DENV-2 foram registrados na década de 1990 (SCHATZMAYR *et al.*, 1986; NOGUEIRA *et al.*, 1990).

O DENV-3, introduzido no estado do Rio de Janeiro no ano 2000, foi responsável por um dos maiores surtos do país em 2001, chegando a 288.245 casos notificados e 91 mortes. Entre os anos de 2007-2008, a re-emergência do DENV-2 foi responsável por casos graves em crianças além de altos índices de morbidade e

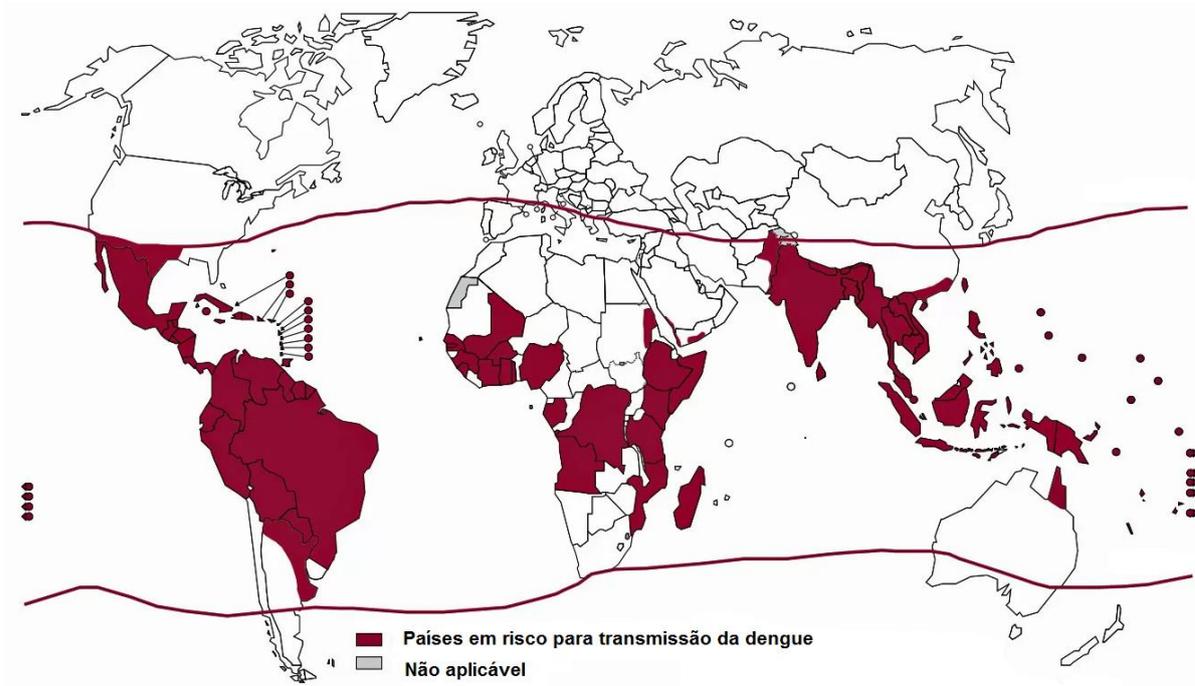
mortalidade. Em 2010 vários surtos atingiram cerca de 21 estados brasileiros com circulação dos quatro sorotipos virais. Ainda no mesmo ano, o DENV-4 foi isolado em Roraima, disseminando-se para outros estados como Amazonas, Rio de Janeiro, Pará, Amapá e São Paulo (NOGUEIRA *et al.*, 2001; FARES *et al.*, 2015).



**Figura 1: Histórico da reintrodução do DENV no Brasil.** Os estados marcados demonstram onde o sorotipo foi detectado pela primeira vez (Adaptado de FARES, *et al.*, 2015).

Atualmente, a dengue é considerada um problema mundial de saúde pública. Estima-se que a cada ano ocorram 390 milhões de infecções pelo DENV e cerca de 128 países estão em situação de risco para a transmissão da doença (Figura 2). O ano de 2016 foi marcado pela ocorrência de grandes surtos em várias regiões do

planeta. Cerca de 2,38 milhões de casos foram registrados entre as Américas, sendo o Brasil com o maior número, aproximadamente 1,5 milhões (WHO, 2018).



**Figura 2: Países em risco para a transmissão da dengue.** A linha vermelha delimita a região tropical da Terra. Preenchidos em vermelho estão os locais classificados como em risco para transmissão do DENV (WHO, 2014).

Dados publicados pelo Ministério da Saúde referente à 34ª semana epidemiológica de 2018, registraram, no Brasil, 218 casos confirmados de dengue grave, 2.431 casos com sinais de alarme e 100 óbitos. Quanto ao sorotipo viral predominante no período em questão, observa-se a maior ocorrência do DENV-2 (52,4%), seguido do DENV-1 (23,9%), DENV-4 (0,4%) e DENV-3 (0,1%) respectivamente (SVS, 2018).

Em Minas Gerais, o primeiro caso descrito de dengue foi notificado em 1987 (SERUFO *et al.*, 1993). Até o ano de 2010, somente os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 circulavam no estado. Posteriormente, em 2011, o DENV-4 foi introduzido sendo associado a ocorrência de grandes surtos nos anos seguintes (AMÂNCIO, *et al.*, 2014). A cocirculação dos quatro sorotipos virais, influencia diretamente a distribuição e epidemiologia da doença (FARES *et al.*, 2015).

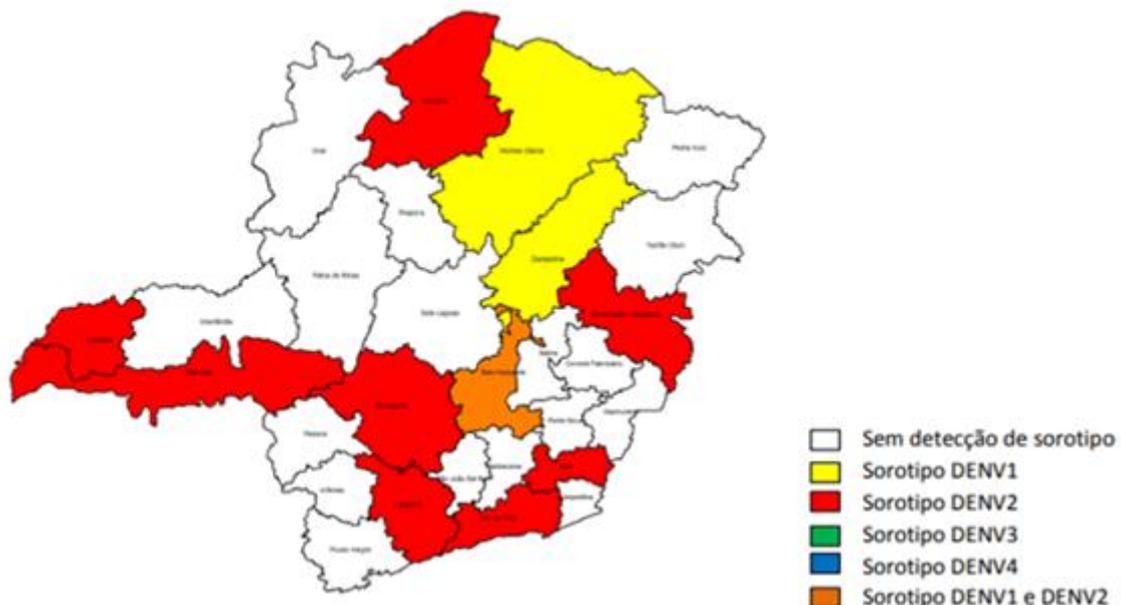
Nos anos de 2010, 2013 e 2016, o estado de Minas Gerais viveu três grandes epidemias (Tabela 1). De acordo a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais,

em 2018, observa-se um quadro epidemiológico semelhante aos períodos não epidêmicos anteriores, sendo registrados até novembro de 2018, cerca de 26.155 casos prováveis de dengue, 8 óbitos confirmados cujos sorotipos virais identificados foram o DENV-2 seguido de DENV-1 (Figura 3) (SES/MG, 2018).

**Tabela 1: Casos prováveis de dengue por mês de início de sintomas, 2010 a 2018, Minas Gerais.**

Mês	Ano de início dos sintomas								
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Janeiro	14.470	3.795	2.341	35.522	5.007	7.050	57.617	4.670	2079
Fevereiro	29.487	5.624	2.598	62.560	8.573	9.306	137.474	4.297	2288
Março	55.292	7.346	3.885	146.917	11.286	27.773	156.923	5.202	4620
Abril	62.392	8.659	4.752	123.956	15.334	59.857	120.895	3.677	7375
Mai	38.796	6.914	3.848	31.307	9.809	51.062	36.046	2.846	4239
Junho	6.398	1.690	2.525	7.230	3.495	14.083	4.698	1.444	1570
Julho	1.683	656	1.220	1.653	1.115	3.281	990	585	808
Agosto	611	419	650	673	551	1.214	597	486	573
Setembro	492	399	532	577	652	956	619	520	859
Outubro	419	504	659	745	641	1.288	714	641	1335
Novembro	811	880	1.162	1.056	874	3.789	1.154	676	409
Dezembro	1.651	1.364	6.356	2.523	1.098	14.334	1.323	889	
<b>Total</b>	<b>212.502</b>	<b>38.250</b>	<b>30.528</b>	<b>414.719</b>	<b>58.435</b>	<b>193.993</b>	<b>519.050</b>	<b>25.933</b>	<b>26.155</b>

(SES/MG: Boletim epidemiológico do monitoramento dos casos de dengue, chikungunya e zika, 2018).



**Figura 3: Monitoramento viral do DENV em 2018 no estado de Minas Gerais.** (SES/MG: Boletim epidemiológico do monitoramento dos casos de dengue, chikungunya e zika, 2018).

## 4.2 Os *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* compreende três gêneros, sendo eles os *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O termo *Flaviviridae* deriva da expressão latina “*flavus*” e significa “amarelo,”fazendo alusão a icterícia observada nas infecções pelo vírus da febre amarela, protótipo do gênero *Flavivirus* e da Família *Flaviviridae*. São considerados importantes patógenos que podem causar doenças graves em humanos e animais (HUANG *et al.*, 2014).

Os vírus da família *Flaviviridae* são esféricos com tamanho variando de 40 a 60 nm (nanômetros). Possuem capsídeo de morfologia icosaédrica circundado por um envelope lipídico. O genoma de Ácido Ribonucléico (RNA) de fita simples e senso positivo codifica proteínas estruturais e não estruturais que participam de importantes etapas do ciclo de multiplicação viral (LINDENBACH *et al.*, 2007).

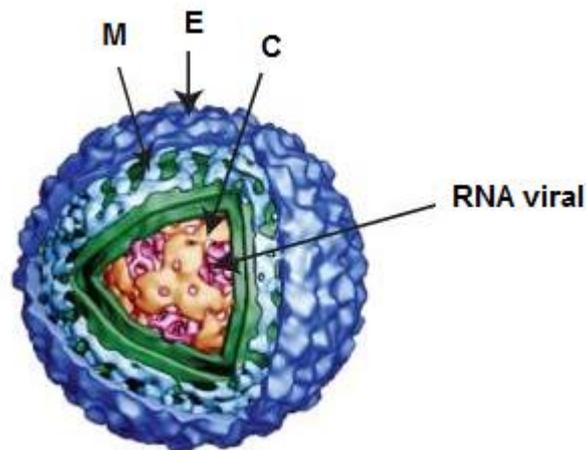
O genero *Flavivirus* engloba mais de 70 espécies diferentes de vírus que estão amplamente distribuídos na natureza (LINDENBACH *et al.*, 2007). Entre os membros de maior importância médica destacam-se o DENV, o vírus da encefalite Japonesa, o vírus da encefalite do Oeste do Nilo e o vírus da febre amarela (PETTERSSON e PALACIOS, 2014).

Os membros do gênero *Flavivirus* são subdivididos em grupos distintos de acordo com características comuns entre as espécies como, interação parasita-hospedeiro, preferência vetorial, características biológicas e moleculares (PETTERSSON; PALACIOS, 2014). A maioria dos integrantes deste gênero infectam artropódes e são transmitidos ao homem ou animal por meio de vetores hematófagos como mosquitos ou carrapatos. Os artropódes adquirem o vírus ao se alimentarem do sangue de um indivíduo infectado e o transmitem em um repasto sanguíneo subsequente (ICTV, 2017).

## 4.3 Dengue vírus

O DENV apresenta capsídeo de morfologia icosaédrica recoberto por um envelope lipídico no qual estão associadas importantes proteínas de superfície (Figura 4). Possuem RNA de fita simples e senso positivo com cerca de 50 nm de diâmetro. O genoma de aproximadamente 11 kilobases (kb) apresenta apenas uma única janela

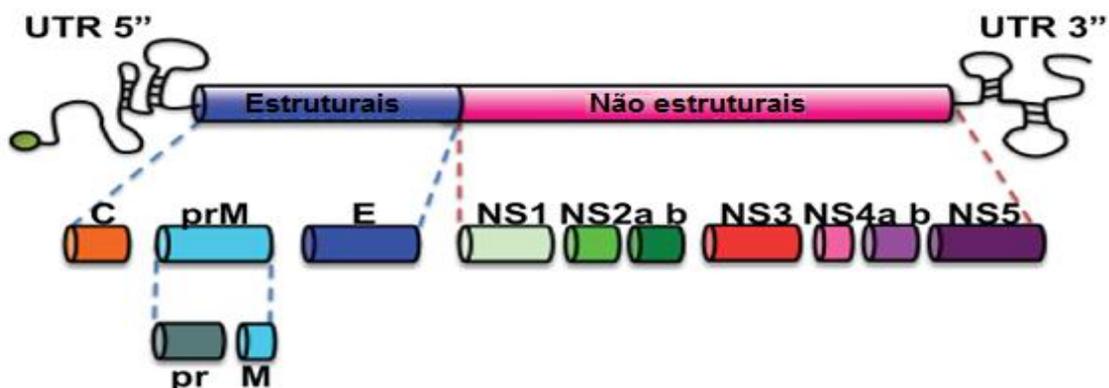
aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) flanqueado por regiões 5' e 3' não traduzidas (ICTV, 2017; LINDEBACH *et al.*, 2007).



**Figura 4: Representação esquemática da partícula viral do DENV.**

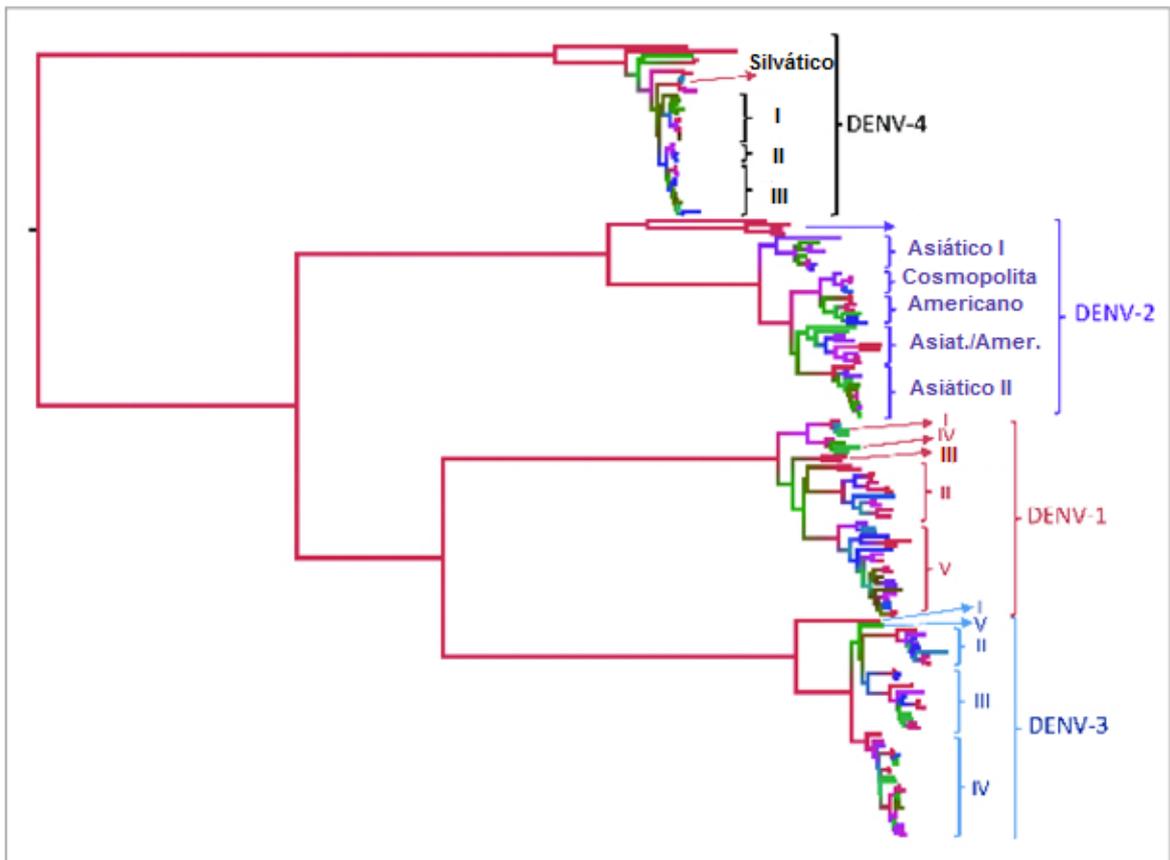
Em destaque o RNA genômico viral e as proteínas estruturais que compõem a membrana (M), envelope (E) e capsídeo (C). (Adaptado de ANGEL e DELL VALLE, 2015).

O genoma viral codifica três proteínas estruturais: Capsídeo (C), Envelope (E) e proteína precursora de membrana (prM) que dará origem à proteína M durante a maturação viral e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figuras 5). Estas proteínas fazem parte do complexo de replicação viral, e desempenham papéis importantes na replicação, montagem e liberação de novos vírus (ICTV, 2017; KLEMA *et al.*, 2015; LINDENBACH *et al.*, 2007).



**Figura 5: Representação esquemática da organização do genoma do DENV.** O genoma possui uma única ORF que codifica proteínas estruturais e não estruturais. (Adaptado de ANGEL e DELL VALLE, 2015)

São conhecidos quatro sorotipos distintos do DENV, sendo eles DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 que diferem entre si pelo padrão antigênico (LINDENBACH *et al.*, 2007). Cada sorotipo do DENV é subdividido em genótipos com base nas diferenças da sua sequência nucleotídica (Figura 6) (WAMAN, 2016). A partir de análises filogenéticas foram descritos cinco genótipos para o DENV-1 (I, II, III, IV e V) (SANTOS, *et al.*, 2011) seis genótipos para o DENV-2 (Asiático I, Asiático II, Cosmopolita, Americano, Asiático/Americano e Silvático) (WAMAN, *et al.*, 2016), cinco genótipos para o DENV-3 (I, II, III, IV e V) (MENDONÇA *et al.*, 2018) e quatro genótipos para o DENV-4 (I, II, III e IV) (Figura 6) (SITTIVICHARNPYO *et al.*, 2017).



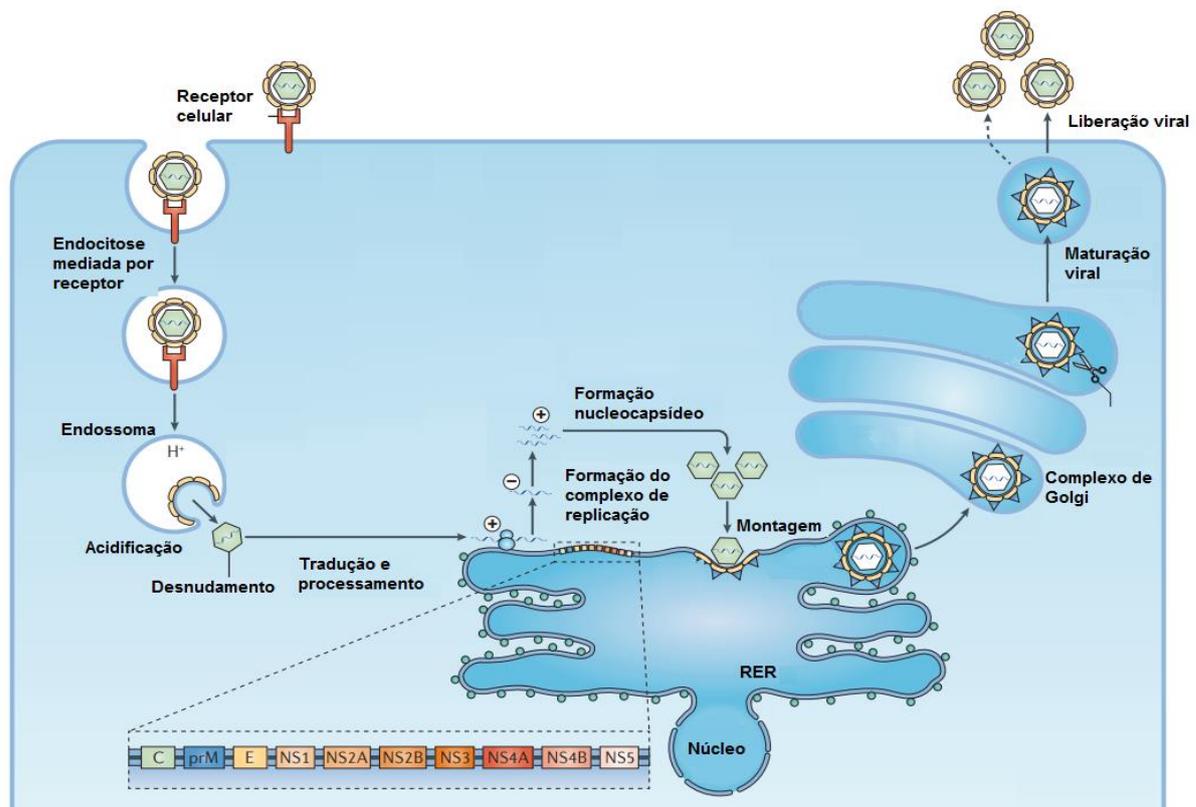
**Figura 6: Árvore filogenética dos quatro sorotipos do DENV** (Adaptado e modificado de CIRO *et al.*, 2014)

A variabilidade genética intra-sorotipo pode contribuir para o potencial de transmissão viral, expressão de diferentes fatores de virulência e a ocorrência de manifestações graves da dengue associada às condições imunológicas do hospedeiro (FIGUEIREDO, 2012).

#### 4.4 Ciclo de multiplicação do DENV

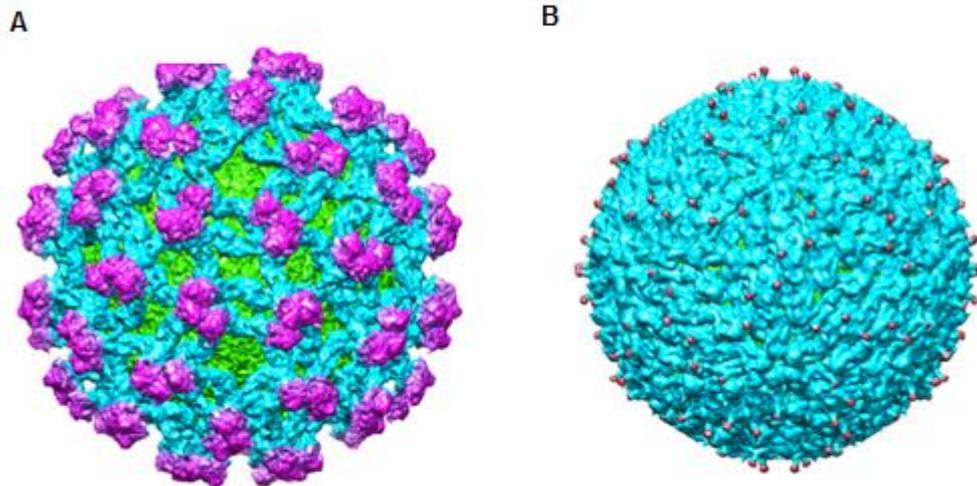
Os primeiros alvos celulares do DENV são as células de Langherans localizadas no sítio de inoculação viral, cujo receptor mais conhecido é o DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin) (GUABIRABA e RYFFEL, 2014; REYES-DEL VALLE *et al.*, 2014).

O ciclo de multiplicação do DENV acontece no citoplasma das células hospedeiras e se inicia a partir da ligação específica da proteína E do envelope aos receptores celulares (Figura 7). A partícula viral é internalizada em um processo de endocitose mediada por receptor permanecendo no interior do endossoma. A acidificação do endossoma promove mudanças conformacionais na proteína E que, por sua vez, permite a fusão do envelope viral à membrana do endossoma e consequente liberação do nucleocapsídeo. No citoplasma celular, o capsídeo é liberado e o RNA viral, atuando como RNA mensageiro (mRNA), é prontamente traduzido pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (RER), dando origem a uma única poliproteína que será clivada posteriormente por ação de enzimas virais e do hospedeiro dando origem a proteínas estruturais e não estruturais. As novas partículas virais brotam para o interior da membrana do RER e adquirem, seu envelope lipídico sendo então encaminhadas ao complexo de Golgi pela via secretória, onde sofrem maturação tornando-se infecciosas. A maturação do DENV é caracterizada pela clivagem da proteína prM levando a dissociação dos peptídeos pr e M (LINDENBACH *et al.*, 2007; DIAMOND e PIERSON, 2015; BIK e GAMARNIK, 2015



**Figura 7: Ciclo de multiplicação do DENV.** O DENV liga-se aos receptores da superfície celular e são internalizados por endocitose mediada por receptor. A acidificação do endossoma promove alteração estrutural da proteína E facilitando a fusão da membrana viral à membrana da vesícula. Em seguida, ocorre o desnudamento e liberação do RNA viral no citoplasma sendo traduzido e processado pelo RER em uma única poliproteína que será clivada posteriormente por proteases virais. A replicação do genoma ocorre a partir da formação do complexo de replicação, que consiste na organização de proteínas virais na membrana do RER que irão atuar na replicação e montagem de novos vírus. As partículas virais recém montadas, seguem pela via secretória até o complexo de Golgi onde a clivagem da proteína prM resulta em partículas maduras e infecciosas que serão liberadas da célula por exocitose (Adaptado de SCREATON *et al.*, 2015).

Em vírus imaturos, a glicoproteína E é encontrada associada à prM formando heterodímeros e apresentam formato de espículas que recobrem toda a superfície viral. Em partículas virais maduras a proteína do envelope existe na forma de dímeros juntamente com a proteína M conferindo ao DENV um aspecto liso (Figura 8) (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2013).



**Figura 8: Crio-microscopia eletrônica do DENV-1.** (A) Em vírus imaturos, a prM se organiza em forma de espículas que recobrem toda a superfície viral. (B) em vírus maduros, a proteína M se associa à proteína de envelope conferindo um aspecto liso à partícula viral (Adaptado de KOSTYUCHENKO *et al.*, 2013).

#### 4.5 Patogênese da dengue

A patogênese da dengue é determinada por um conjunto de fatores que envolvem características genéticas virais e do hospedeiro, produção de fatores de virulência e a resposta imunológica do organismo contribuindo, juntamente, para o aumento da gravidade da doença (YACOUB *et al.*, 2013).

As células de Langherans ativadas no sitio de inoculação viral migram para gânglios linfáticos e induzem uma grande resposta imunológica associada a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e interferon beta (INF- $\beta$ ). Células fagocitárias como monócitos e macrófagos tornam-se alvo da infecção podendo facilitar a disseminação viral para demais células localizadas no baço, fígado e medula óssea. A produção de anticorpos leva a ativação do sistema complemento e de células T e B amplificando a resposta imune contra o DENV (BÄCK e LUNDKVIST, 2013).

Infecções primárias pelo DENV vírus induzem formação de anticorpos neutralizantes que conferem imunidade duradoura e especifica contra o sorotipo adquirido. Quando há uma nova infecção por um sorotipo diferente, os anticorpos produzidos em resposta à primeira infecção são incapazes de neutralizar a partícula

viral e acabam favorecendo a ligação deste aos receptores *Fc* (fragmento cristalizável) de células permissivas. Este mecanismo é conhecido por intensificação da infecção dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement* - ADE) (ANGEL; VALLE, 2013).

Citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-10 (IL-10) e outros fatores produzidos durante a infecção por células T ativas, monócitos, mastócitos e macrófagos estão envolvidas no processo de injúria endotelial e degradação do glicocálix levando a alterações de permeabilidade capilar e consequente extravasamento de plasma, podendo contribuir para as manifestações graves da doença (ROTHMAN, 2011). Níveis elevados de citocinas circulantes correlacionam-se com o número de células infectadas pelo DENV (MALADIGE *et al.*, 2013).

#### **4.6 Dengue: aspectos clínicos e laboratoriais**

O espectro clínico da dengue é variável podendo ocorrer formas assintomáticas a manifestações graves da doença. Em 2009, a OMS propôs uma nova classificação para os casos de dengue a fim de otimizar o diagnóstico e manejo clínico dos pacientes (OMS, 2009). O novo protocolo que é utilizado pelo Brasil desde 2014, divide-se em três grandes grupos sendo: Dengue, Dengue com sinais de alarme e Dengue grave (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A evolução clínica da doença consiste em três fases distintas: febril, crítica e de recuperação. A fase febril dura em média de 2 a 7 dias e é caracterizada principalmente pela ocorrência de febre alta de início súbito associada à cefaleia, dores articulares e musculares, náusea, vômito, exantema e dor retroorbital. Nesta fase, as alterações laboratoriais são inespecíficas e podem incluir leucopenia, trombocitopenia, hiponatremia e alterações de transaminases (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

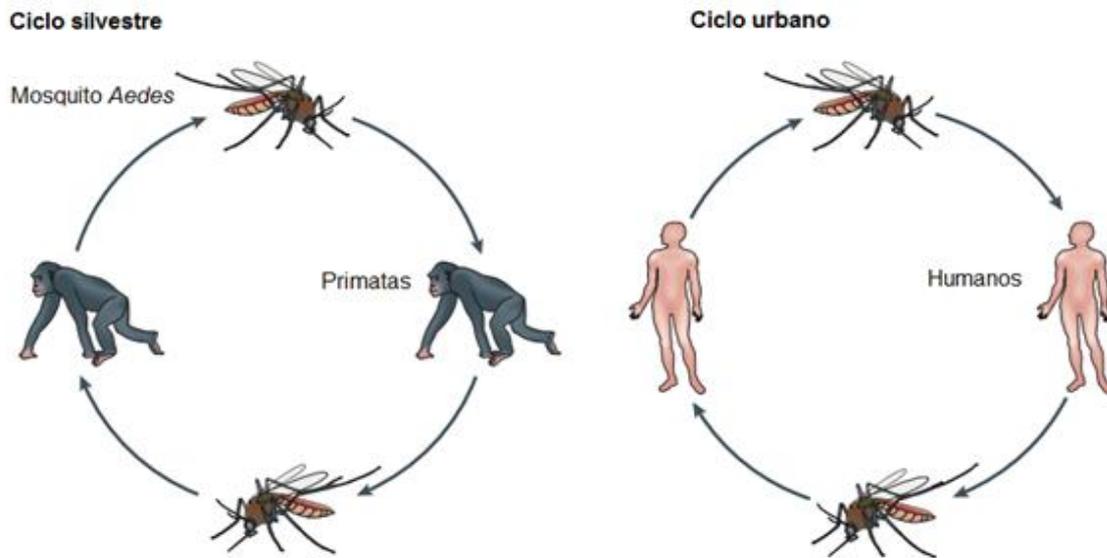
Alguns pacientes podem evoluir da fase febril para a fase crítica que se inicia com o declínio da febre geralmente entre o 3<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia após o início da infecção. Nesta fase, alguns pacientes podem apresentar sinais de alarme indicando piora do quadro clínico e provável evolução para as formas graves da doença. A ocorrência de sangramento de mucosas, dor abdominal intensa, edema e vômito persistente são alguns exemplos de sinais de alarme devendo receber intervenção médica imediata.

Alterações laboratoriais importantes são observadas como redução do número de plaquetas, leucopenia progressiva e elevação do hematócrito. O aumento da permeabilidade capilar resulta em extravasamento de plasma podendo evoluir para choque hipovolêmico, choque prolongado, hemorragia intensa e complicações neurológicas (CDC, 2018).

A fase de recuperação é caracterizada pela melhora dos sintomas, restabelecimento do quadro hemodinâmico, normalização do débito urinário e reabsorção do líquido extravasado. Alguns pacientes podem desenvolver erupções cutâneas nesta fase podendo ocorrer prurido generalizado. Os achados laboratoriais demonstram aumento gradual da contagem total de leucócitos e posteriormente, de plaquetas e o hematócrito se estabiliza (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

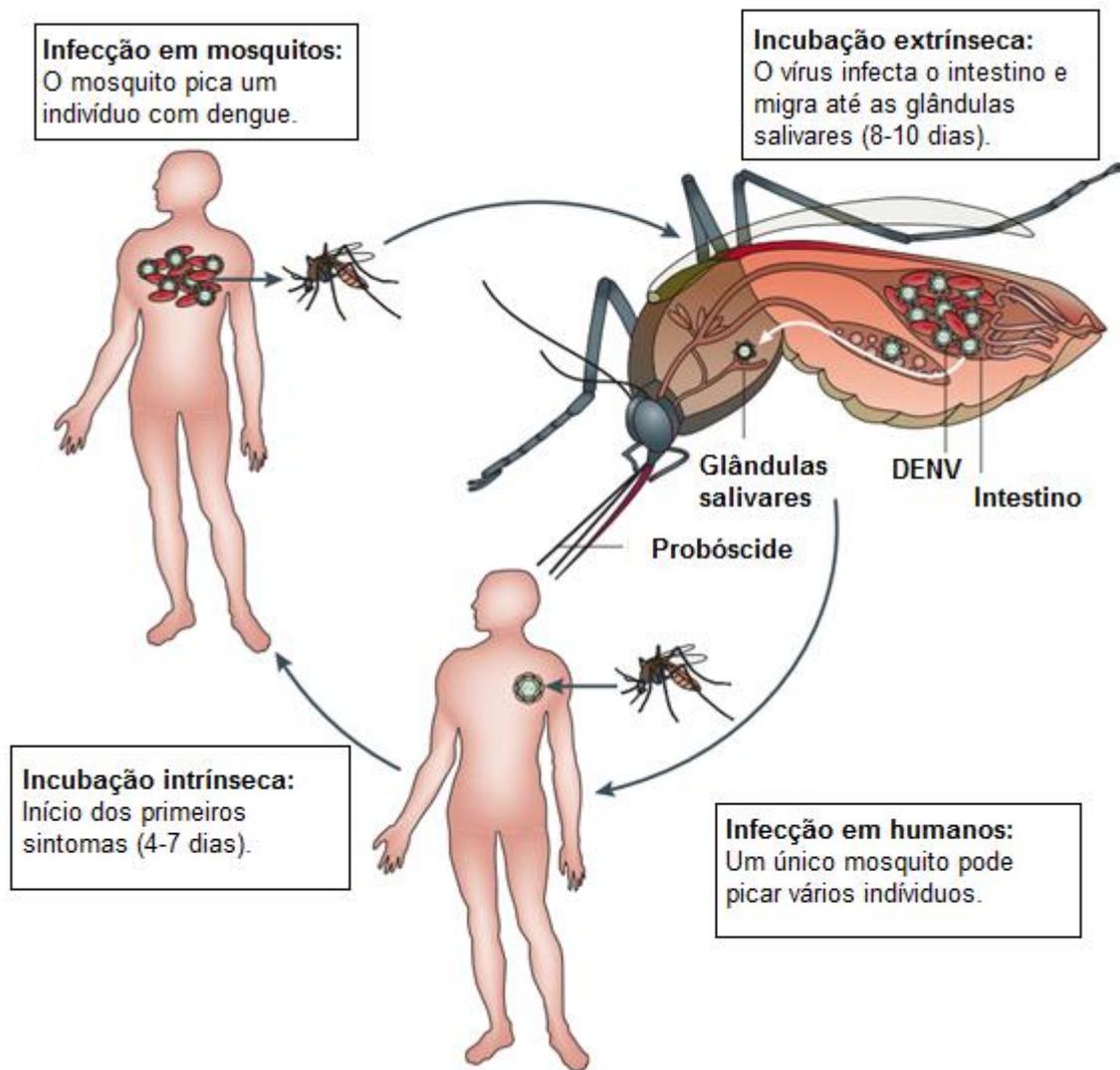
#### **4.7 Ciclo de manutenção do DENV**

O DENV se mantém na natureza por meio de dois mecanismos distintos de transmissão, sendo o ciclo silvestre e o ciclo urbano. O ciclo silvestre envolve hospedeiros primatas e vetores silvestres, o mosquito *Aedes albopictus*, e sua ocorrência tem sido relatada nas regiões da África Ocidental e Malásia. No ciclo urbano o DENV circula entre hospedeiros humanos e o mosquito *Aedes aegypti*, sendo considerado o vetor primário da dengue (Figura 9) (VASILAKS *et al.*, 2011).



**Figura 9: Representação do ciclo silvestre e ciclo urbano do DENV.** O principal vetor da dengue em ambientes silvestres é o mosquito *Aedes albopictus*, já em ambientes urbanos, destaca-se o *Aedes aegypti* (Adaptado de WHITEHEARD *et al.*, 2007).

No ciclo urbano, as fêmeas de *Aedes aegypti* adquirem o DENV durante o repasto sanguíneo de indivíduos infectados. Uma vez no interior do mosquito, os vírus chegam até as células do intestino onde se multiplicam e disseminam-se para demais tecidos chegando às glândulas salivares durante o período de incubação extrínseco que acontece normalmente de 8 a 10 dias. A partir de então este, torna-se apto para transmitir o vírus a outros indivíduos em um repasto sanguíneo subsequente. Este processo pode sofrer influência de fatores ambientais como temperatura, fatores genéticos associados ao vírus e susceptibilidade do inseto vetor, reconhecida como competência vetorial. Uma vez infectado, o mosquito é capaz de transmitir o vírus por toda vida e a todos os indivíduos dos quais ele se alimentar. O período entre a infecção pelo DENV e o aparecimento dos primeiros sintomas é chamado de período de incubação intrínseco e apresenta duração média de 4 a 7 dias (Figura 10) (GUZMAN *et al.*, 2016).



**Figura 10: Ciclo da infecção pelo DENV em humanos.** O mosquito adquire o vírus ao se alimentar do sangue de um indivíduo infectado. Durante o período de incubação extrínseco (8 a 10 dias), o vírus se multiplica nos tecidos do inseto, chegando até as glândulas salivares. Após este período, o mosquito pode transmitir o DENV ao realizar um novo repasto sanguíneo. Uma vez no interior do hospedeiro, o DENV se multiplica e, após o período de incubação intrínseco, (4 a 7 dias), há o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas da dengue (Adaptado de GUZMAN *et al.*, 2016).

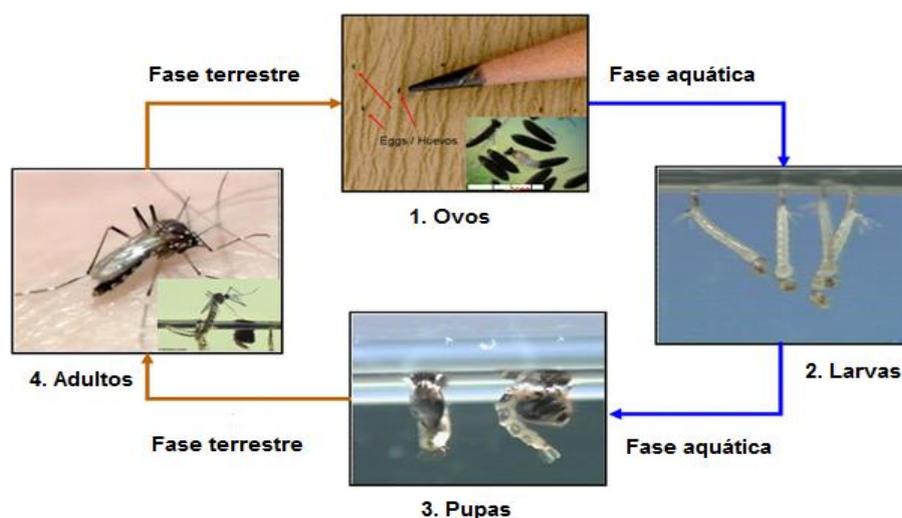
#### 4.8 Vetores da dengue

O DENV apresenta classicamente dois vetores principais, o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O principal vetor da dengue em ambientes urbanos é o mosquito *Aedes aegypti*, uma espécie nativa do continente africano. Relatado pela primeira vez no Egito, disseminou-se rapidamente para diversas regiões do planeta chegando ao

Brasil durante o período colonial através do tráfico de escravos (CHRISTOPHERS, 1960).

O *Aedes aegypti* é considerado o vetor primário da dengue e também de outras importantes arboviroses como chikungunya, zika e febre amarela. Apresenta hábitos preferencialmente diurnos e está essencialmente adaptado ao ambiente urbano e doméstico, onde deposita seus ovos em criadouros naturais e artificiais contendo água limpa. Os mosquitos adultos alimentam-se de compostos ricos em açúcar como o néctar de plantas, porém apenas as fêmeas são hematófagas sendo necessária a ingestão de sangue humano ou animal para o desenvolvimento de seus ovos. Estes, por sua vez, são resistentes à dessecação mantendo-se viáveis por longos períodos em ambientes secos (CDC, 2018). O mosquito fêmea é capaz de realizar múltiplos repastos durante um único ciclo gonadotrófico potencializando sua capacidade de infecção e transmissão do DENV, bem como de outras arboviroses (ZARA, *et al.*, 2016). Variações de temperatura, umidade e alterações climáticas podem afetar o ciclo biológico do *Aedes aegypti* interferindo diretamente na distribuição do vetor (VIANA e IGNOTT, 2013).

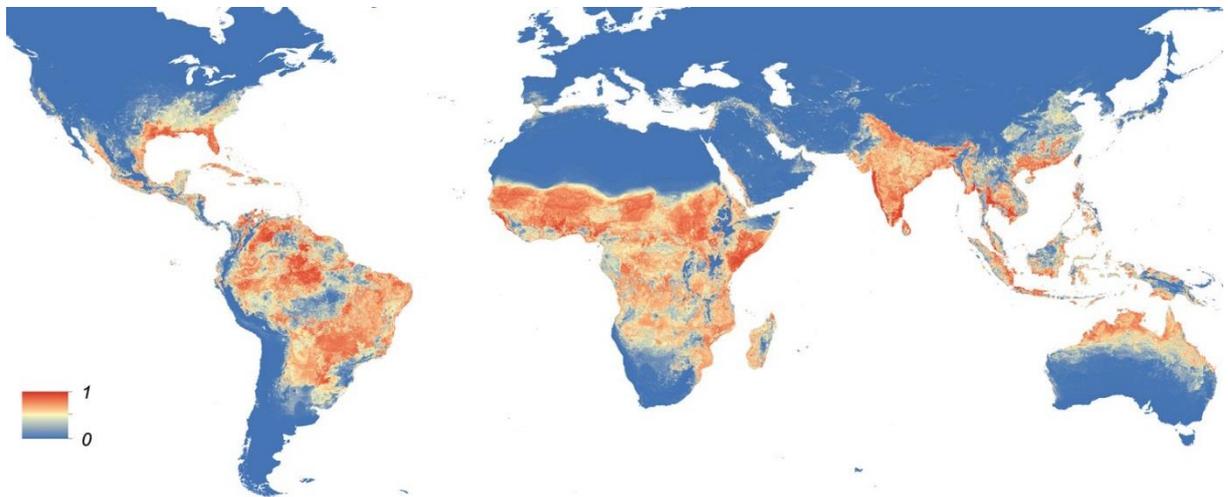
O ciclo de vida do *Aedes aegypti* compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e mosquito adulto podendo variar de acordo com a temperatura, disponibilidade de nutrientes e quantidade de larvas em um mesmo criadouro (Figura 11) (FIOCRUZ, 2016).



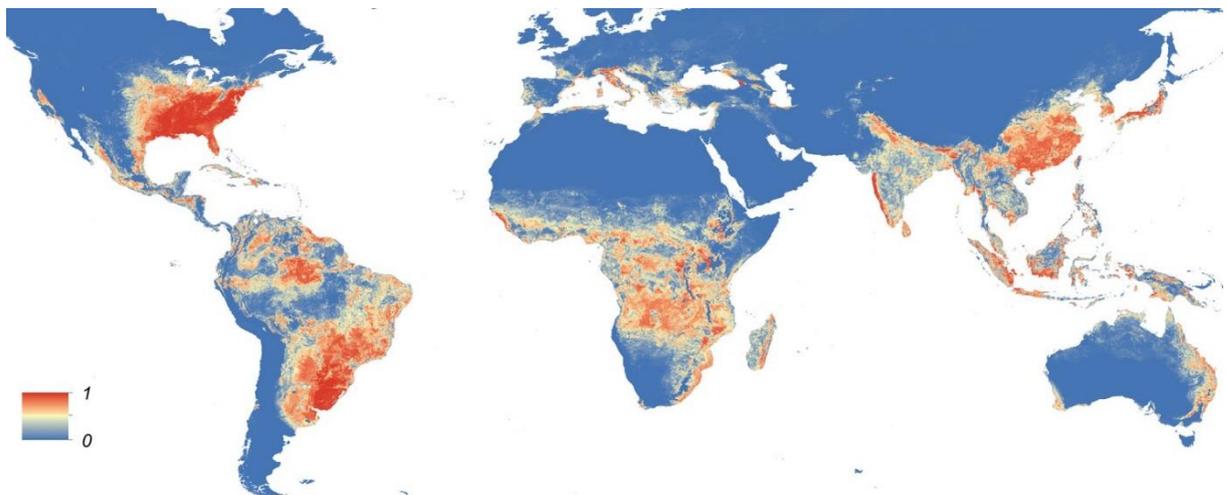
**Figura 11: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.** Observa-se diferentes formas de vida durante o ciclo biológico do vetor sendo: ovos, larvas, pupas e inseto adulto (CDC,2012).

Atualmente, o *Aedes aegypti* está distribuído por todo o planeta sendo encontrado principalmente em regiões tropicais e sub-tropicais (Figura 12) FLORES e O'NEILL, 2018).

Considerado o vetor secundário da dengue, o *Aedes albopictus* originou-se no continente asiático de onde se disseminou para regiões temperadas, tropicais e sub-tropicais do planeta através das atividades de comércio de pneus usados (FORATIINI, 1986). É encontrado com maior frequência em ambientes silvestres como áreas de floresta, mas também em regiões urbanas, peri-urbanas e rurais (Figura 13) (BONIZZONI *et al.*, 2013).



**Figura 12: Distribuição global de *Aedes aegypti*.** A probabilidade de ocorrência é representada por 0 (azul): ausente e 1 (vermelho): presente (KRAEMER *et al.*, 2015).



**Figura 13 Distribuição global de *Aedes albopictus*.** A probabilidade de ocorrência é representada por 0 (azul): ausente e 1 (vermelho): presente (KRAEMER *et al.*, 2015).

Apresentam a capacidade de se adaptarem a condições críticas de temperaturas como durante o inverno, por exemplo, por meio de um mecanismo de resistência conhecido como diapausa fotoperiódica. Este mecanismo consiste em um período de dormência em que há redução das atividades metabólicas, interrupção do ciclo celular e aumento da expressão de genes relacionados à sobrevivência em situações de estresse (DENLINGER e ARMBRUSTER, 2014).

No inseto vetor o vírus deve ser capaz de se ligar a receptores específicos de células permissivas, evadir da resposta imune e romper barreiras tissulares localizadas no intestino médio e glândulas salivares para então disseminar-se gerando uma infecção sistêmica. Dessa forma, uma infecção produtiva requer a co-evolução do vírus e do inseto vetor permitindo a infecção, replicação e transmissão viral (FRANZ *et al.*, 2015).

Diversos fatores podem influenciar a capacidade de transmissão de patógenos entre insetos vetores entre eles fatores ambientais, genéticos e imunológicos (TABACHNICK, 2013). *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* se diferem quanto a competência vetorial em função de aspectos biológicos e evolutivos de cada espécie que, por sua vez, interferem na dinâmica de transmissão e propagação da dengue. Em mosquitos *Aedes aegypti* a capacidade vetorial é afetada principalmente pelas altas temperaturas que influenciam diretamente na interação vírus-vetor (CARRINGTON *et al.*, 2013).

## **4.9. Medidas de controle da dengue**

### **4.9.1 Histórico de controle do *Aedes aegypti* no Brasil**

Durante a década de 1950 intensas campanhas sanitárias foram realizadas pelo governo brasileiro juntamente com a fundação Rockefeller para eliminar o vírus da febre amarela que resultou na erradicação do *Aedes aegypti* no país em 1955 (SEVERO, 1955). Em 1967, foi confirmada a reintrodução do mosquito na cidade de Belém, capital do Pará, e posteriormente, encontrado em outros 23 municípios do mesmo estado. Mais uma vez, programas de controle vetorial foram implementados e no ano de 1973 o *Aedes aegypti* foi mais uma vez considerado erradicado do país. Falhas nos programas de vigilância sanitária associada a urbanização descontrolada, gerada pelo período de industrialização que acontecia no Brasil, levaram à nova

reinfestação do vetor que foi relatado na cidade de Salvador, capital da Bahia. A partir de então, o *Aedes aegypti* disseminou-se por todos os estados brasileiros culminado com a reemergência da dengue em 1981 na cidade de Boa Vista em Roraima (BRAGA e VALLE, 2007). No 1986 a ocorrência de uma nova espécie, o *Aedes albopictus*, foi descrita pela primeira vez em território brasileiro no município de Itaguaí, Rio de Janeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Diante do cenário epidemiológico que se instalou no país, o Ministério da Saúde (MS) propôs, a partir do ano de 1996, o Plano de Erradicação do *Aedes Aegypti* (PEAa) que chamou a atenção para a participação dos governos Federal, Estadual e Municipal para a implementação de ações sistemáticas e efetivas no combate de insetos vetores. Apesar de todo investimento e das ações implementadas em saneamento, vigilância epidemiológica e educação social em saúde, o PEAa não alcançou os objetivos esperados, pois os números de casos de dengue continuavam crescendo, agravando ainda mais o cenário brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Em 2001 um novo plano de ação foi elaborado com o objetivo de concentrar as medidas preventivas da dengue nos municípios de maior infestação por *Aedes aegypti* e, conseqüentemente, maior transmissão da doença. Esta nova estratégia elaborada pelo Ministério da Saúde (MS) ficou conhecida como Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Com a introdução e rápida disseminação do DENV-3 e a iminência de novos surtos, o MS elaborou em 2002 o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Este novo modelo promoveu mudanças nas ações empregadas anteriormente e implementou novas medidas de caráter multisetorial como o envolvimento e mobilização da comunidade, ações de vigilância epidemiológica e entomológica, estruturação de modelos de atenção básica à saúde por meio do Programa Saúde da Família (PSF) e do Programa de Agentes Comunitários da Saúde (PACS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Atualmente as principais medidas de controle da dengue baseiam-se na redução da densidade populacional de mosquitos *Aedes* em seus criadouros naturais ou artificiais a fim de reduzir a transmissão da doença e a ocorrência de novos surtos. O controle da transmissão abrange principalmente formas aquáticas dos vetores como larvas e pupas, e também o mosquito adulto (WHO, 2012).

A OMS estabeleceu diretrizes para o manejo integrado de vetores com a finalidade de melhorar eficiência e sustentabilidade das ações de controle. A

abordagem do programa compreende cinco pontos principais: 1) mobilização social, 2) envolvimento dos setores da saúde com outros setores sociais, 3) integração de diferentes métodos de controle físico, químico ou biológico, 4) elaboração de estratégias baseadas na epidemiologia e ecologia vetorial local fundamentadas por pesquisas operacionais e 5) aplicação de recursos humanos, estruturais e financeiros para a manutenção de estratégias nacionais e locais de prevenção (WHO, 2009).

A escolha do melhor método de controle seja físico, químico ou biológico ou ainda a combinação destes, deve basear-se nas características epidemiológicas locais atuais, os aspectos biológicos dos insetos vetores, a área de alcance desejada, os recursos e o tempo disponíveis e o contexto social no qual as medidas serão implantadas (WHO, 2009).

Diante do desenvolvimento de mecanismos de resistência de vetores associado aos danos ambientais e à saúde pública pela utilização de inseticidas químicos, tem se buscado novas estratégias para o controle da dengue (WHO, 2018).

#### **4.9.2 Controle físico da dengue**

O controle físico consiste em identificar e eliminar recipientes que podem acumular água parada servindo como criadouro para o mosquito *Aedes*. Trata-se de medidas práticas que podem impedir o desenvolvimento dos insetos vetores no ambiente domiciliar minimizando o contato deste com os seres humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

As medidas empregadas incluem a limpeza de calhas e vasos de plantas, proteção ou reciclagem de pneus velhos, utilização de telas em janelas e esvaziamento ou destinação correta de recipientes que acumulam água parada. Estas ações devem ser executadas pelo próprio morador ou proprietário em parceria com os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Controle de Endemias (ACE). Medidas de larga escala também podem ser implementadas pela gestão municipal para potencializar as ações de controle e compreendem a coleta de resíduos sólidos, principalmente em áreas endêmicas, processamento e destinação adequada de resíduos pneumáticos e a vedação de depósitos de água (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Concomitantemente a estas medidas são desenvolvidos programas de educação em saúde que incentivam a participação da comunidade e promovem

mudança comportamental impactando positivamente sobre as ações de controle de vetores. As ações de mobilização social promovem a redução da transmissibilidade da doença nos períodos de epidemia reduzindo conseqüentemente a utilização dos serviços de saúde e a redução dos casos de infecções secundárias por DENV e as formas graves da dengue. Atualmente, sabe-se que as estratégias de educação em saúde geram frutos que vão além de prevenção e controle da dengue, mas formam comunidades mais preparadas para responder em casos de surtos, impedem a saturação dos serviços de saúde e ainda contribuem com a manutenção da qualidade ambiental. A identificação e eliminação de criadouros do *Aedes* possui caráter preventivo e devem ser executadas regularmente durante todo o ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

#### **4.9.3 Controle químico da dengue**

A utilização de inseticidas para o controle de vetores segue protocolos predefinidos pela OMS em concordância com *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES) – um programa que regulamenta o uso de substâncias químicas no combate a insetos, bem como, os princípios ativos a serem utilizados e a dose recomendada para as diferentes propostas de tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Este método deve ser executado de modo complementar às ações de controle físico e vigilância em saúde. Sua utilização deve ser limitada aos locais em que a eliminação dos criadouros mecanicamente não é aplicável (WHO, 2018).

O controle químico abrange diferentes formas de vida do vetor. Os compostos chamados larvicidas agem sobre a forma larvária do *Aedes* enquanto os adulticidas são empregados no controle das formas adultas do inseto (Tabelas 2 e 3) (CDC, 2018).

Tabela 2: Produtos recomendados pela OMS para controle das formas larvais de *Aedes aegypti*.

<b>Produtos contra larvas</b>		
<b>Princípio ativo</b>	<b>Ação</b>	<b>Classe</b>
Clorpirifos	Neurotóxico	Organofosforado
Fention	Neurotóxico	Organofosforado
Pirimifós-mentil	Neurotóxico	Organofosforado
Temephos	Neurotóxico	Organofosforado
Spinosad	Neurotóxico	Espirosina
Diflubenzuron	Regulador do desenvolvimento	Inibidor de síntese de quitina
Novaluron	Regulador do desenvolvimento	Inibidor de síntese de quitina
Piriproxifen	Regulador do desenvolvimento	Inibidor de síntese de quitina

(Adaptado de VALLE *et al.*, 2015)

Tabela 3: Produtos recomendados pela OMS para controle das formas adultas de *Aedes aegypti*.

<b>Produtos contra adultos</b>		
<b>Princípio ativo</b>	<b>Ação</b>	<b>Classe</b>
Malathion	Neurotóxico	Organofosforado
Deltametrina	Neurotóxico	Piretroide
Lambda-clalotrina	Neurotóxico	Piretroide
Permetrina	Neurotóxico	Piretroide
Transcifenotrina	Neurotóxico	Piretroide

(Adaptado de VALLE *et al.*, 2015)

A aplicação dos larvicidas deve atender aos padrões do Programa Nacional de Segurança Química (IPCS), sobretudo para o uso em água de consumo humano (Tabela 4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A aplicação de compostos químicos adulticidas é realizada de duas formas distintas sendo aplicação residual ou a

aplicação espacial, conhecida popularmente como “fumacê”. A primeira consiste na pulverização focal de inseticidas em paredes e demais superfícies, geralmente por equipamentos costais, enquanto a segunda metodologia é caracterizada pela dispersão de inseticidas no ambiente na forma de aerossóis por equipamentos acoplados a veículos. O controle das formas adultas deve ser realizado em situações emergenciais como surtos e epidemias, por exemplo (WHO, 2018).

**Tabela 4: Produtos larvicidas recomendados pela OMS para aplicação em água potável.**

<b>Larvicidas recomendados pela OMS para uso em água potável</b>			
<b>Produto</b>	<b>Grupo</b>	<b>Formulação (1)</b>	<b>Dose (mg/l)</b>
Diflubenzuron	Benzoilureas	DT, GR, PM	0,02-0,25
Novaluron	Benzoilureas	CE	0,005
Piriproxifen	Análogo de hormônio juvenil	GR	0,01-0,05
Espinosade	Espinosinas	DT	0,1-0,5
Tamefós	Organofosforado	GR	1

(Adaptado de WHO, 2012)

Entre os princípios ativos recomendados pelo WHOPES e utilizados pelo Brasil, estão quatro classes de compostos químicos que apresentam efeito neurotóxico sendo os organofosforados, carbamatos, espinosinas e piretroides que apresentam variados mecanismos de ação (VALLE *et al.*, 2015). A exposição a estas substâncias pode desencadear quadros leves ou graves de intoxicação variando de acordo com a dose e o tempo de exposição cujo risco maior está associado à atividade ocupacional (BOCHNER, 2015).

Estudos evidenciam a resistência vetorial frente às principais classes de inseticidas empregados atualmente, o que representa um sério problema no controle da dengue e de outras doenças transmitidas por vetores (GRAY *et al.*, 2018). Tal fato, deve-se ao uso indiscriminado de inseticidas que implica na seleção de vetores resistentes e com maior capacidade de adaptação e sobrevivência tornando o tratamento ineficiente. Uma alternativa seria a rotatividade de inseticidas quando há

constatação de populações resistentes de *Aedes* através de monitoramento por bioensaios realizados em laboratório (CDC, 2018).

Além da possibilidade de seleção de vetores mais resistentes, outro ponto crítico quanto ao uso de inseticidas químicos é o impacto sobre a saúde humana, animal e o ambiente local (ARAÚJO *et al.*, 2015).

#### **4.9.4 Controle biológico da dengue**

##### **4.9.4.1 Controle através de vacina**

Diversos estudos estão sendo conduzidos na busca de vacinas que garantam proteção imunológica duradoura para os diferentes sorotipos do DENV (LIU *et al.*, 2016). A primeira vacina autorizada mundialmente é a Dengvaxia® (CYD TDV) comercializada pela Sanofi Pasteur. Trata-se de uma vacina composta por vírus atenuados, quiméricos e recombinantes, cuja estrutura básica utilizada é o vírus vacinal da febre amarela (TORRESI; EBERT; PELLEGRINI, 2017).

Estudos comprovaram que a vacina Dengvaxia não fornece proteção homogênea contra os quatro sorotipos do DENV (SABCHAREON *et al.*, 2012). A eficácia global clinicamente comprovada para a vacina é de 60,3% apresentando maior ou menor percentual em função da idade (FLASCHE *et al.*, 2016).

A eficiência da vacina também foi comparada entre um grupo de indivíduos que já tiveram dengue com aqueles que nunca foram expostos ao DENV. A análise dos resultados demonstrou que a eficiência da imunização após a vacinação foi maior em indivíduos que já tiveram dengue (83,7%) quando comparados a indivíduos soronegativos (43,2%) (VILLAR *et al.*, 2015).

Ensaio adicionais foram realizados para comprovar a relação risco-benefício vacinal, que foi realizado através de monitoramento dos indivíduos submetidos às fases teste da vacina. Observou-se efeito imunoprotetor, a longo prazo, em pessoas que já foram expostas ao DENV, porém houve aumento do risco de complicações da doença e aumento do número de casos de dengue grave e hospitalização em indivíduos soronegativos logo após a administração da primeira dose (FERGUSON *et al.*, 2016).

Baseando-se nisso, recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou uma nota informativa sobre as recomendações quanto a

administração da Dengvaxia ® no Brasil. Recomenda-se que a vacina Dengvaxia ® siga o esquema primário proposto de 3 doses em intervalos de 6 meses em indivíduos entre 9 e 45 anos de idade que residem em áreas endêmicas. Além disso, recomenda-se também que a vacina não seja administrada em pacientes que não foram previamente expostos ao DENV, uma vez que o risco de manifestações graves da dengue é maior do que o esperado em indivíduos que nunca foram expostos ao DENV (ANVISA, 2017). Atualmente, novas vacinas estão em fase de teste, a DENVax, desenvolvida pelo CDC, nos Estados Unidos e a Inviragen desenvolvida pelo National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Entre os desafios para o desenvolvimento de uma vacinal ideal, estão a indução de imunidade duradoura, ausência de um modelo animal adequado, e a escassez de estudos epidemiológicos sobretudo em regiões endêmicas (PROMPETCHARA *et al.*, 2019).

#### **4.9.4.2 Controle através de predadores e patógenos**

Entre os agentes aplicados ao controle biológico são utilizados peixes larvófagos que se alimentam das larvas e pupas do *Aedes*, cuja principal espécie utilizada é a *Poecilia reticulata* devido a facilidade de adaptação aos diferentes ambientes aquáticos (WHO, 2009). Esta espécie pode ser encontrada em habitats variados, desde pequenos corpos d'água até lagos e córregos de regiões montanhosas e elevada altitude. São nativos da América do Sul, incluindo o Brasil, Guiana, Venezuela, Trindade e Tobago (ROSSO *et al.*, 2017).

Outro organismo frequentemente utilizado é a bactéria entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis israelenses* (*Bti*) encontrado naturalmente no solo (LOBO, *et al.*, 2018; VALLE *et al.*, 2015).

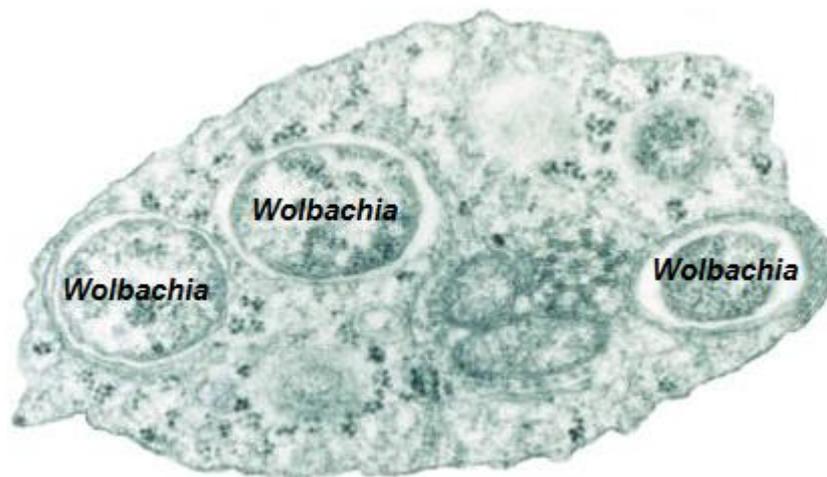
Trata de um bastonete Gram positivo, formador de esporos. Uma característica marcante desta espécie é a produção de cristais protéicos durante a fase de esporulação. No interior destes cristais são encontradas toxinas que levam a morte de uma variedade de insetos quando ingeridas (PALMA *et al.*, 2014).

#### **4.9.4.3 Controle através de endossimbiontes: *Wolbachia pipientis***

Uma nova proposta para o controle biológico vem sendo estudada nos últimos anos. Trata-se da utilização da *Wolbachia*, uma bactéria endossimbionte intracelular

não patogênica para humanos, que apresenta a capacidade de interferir na transmissão viral do *Aedes aegypti* além de influenciar no ciclo de vida do mosquito (DORIGATTI *et al.*, 2018; FLORES e O'NEILL, 2018; KING *et al.*, 2018; TATUENE *et al.*, 2017).

O gênero *Wolbachia* foi descrito pela primeira vez em 1924 a partir da sua observação em tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* (Figura 14). Foi inicialmente caracterizada como um micro-organismo intracelular “semelhante” a *Rickettsia* (*Rickettsia-like*), sendo inofensivo ao seu hospedeiro com o qual estabelece uma relação de simbiose (HERTIG e WOLBACH, 1924). Posteriormente, em 1936, Herting caracterizou formalmente a *Rickettsia-like* descrita como sendo micro-organismos procariotos, gram negativo e pleomórficos, chamando-os de *Wolbachia pipientis* (HERTIG, 1936).



**Figura 14: Micrografia eletrônica de transmissão de *Wolbachia* no interior da célula de um inseto** (Adaptado de imagem cortesia de Scott O'Neill, 2004)

Bactérias do gênero *Wolbachia* pertencem à ordem *Rickettsiales* e família *Rickettsiaceae*, um grupo de micro-organismos cujas espécies estabelecem relações de parasitismo, mutualismo ou comensalismo com seu hospedeiro (WERREN *et al.*, 1994). Apresentam genoma relativamente pequeno como adaptação ao ambiente intracelular, com aproximadamente 1,08 a 1,7 megabases (Mb) cuja característica marcante é a ocorrência de várias sequências móveis e repetitivas conferindo variabilidade genética (WERREN *et al.*, 2008).

Membros do gênero *Wolbachia* foram classificadas em supergrupos taxonômicos baseando-se na similaridade da sequência do RNA ribossômico (rRNA) 16S (O'NEILL *et al.*, 1992). Atualmente são conhecidos dezesseis supergrupos (A, B, C, D, E, H, I, J, K, L, M, N, O, P e Q) que infectam diferentes hospedeiros (PASCAR, 2018). Os supergrupos A e B constam com o maior número de cepas que estão presentes em grande parte dos artrópodes, enquanto os grupos C e D infectam nematóides (GERTH *et al.*, 2014). Cepas de *Wolbachia* pertencentes ao supergrupo G foram isoladas em aranhas e são consideradas linhagens recombinantes não sendo mais enquadradas nessa classificação (WANG *et al.*, 2016). Por fim, os supergrupos E-Q infectam uma ampla gama de hospedeiros entre que incluem artrópodes, nematoides, além de coqueiros, cupins e outros organismos (GLOWSKA *et al.*, 2015).

A *Wolbachia* é encontrada naturalmente no interior de 60% dos artrópodes incluindo algumas espécies de mosquitos como *Culex pipitiens* e *Aedes albopictus* (DORIGATTI *et al.*, 2018). Esta bactéria se desenvolve no citoplasma da célula hospedeira valendo-se de seus recursos celulares para sua reprodução (JOHNSON, 2015).

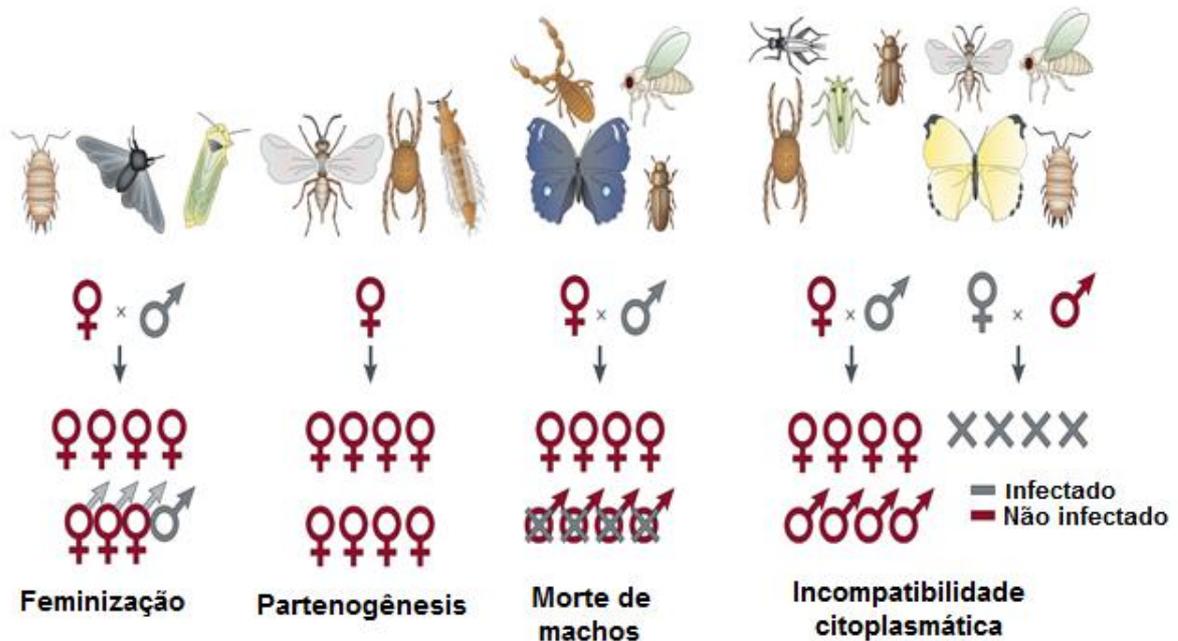
A transmissão vertical através da linhagem materna é a principal via de transmissão da *Wolbachia*. Para garantir a eficiência deste mecanismo de transmissão, a *Wolbachia* interfere diretamente no ciclo biológico do seu hospedeiro promovendo importantes alterações reprodutivas (LINDSEY *et al.*, 2018).

#### **4.10 Interação *Wolbachia*-hospedeiro**

A *Wolbachia* induz alterações específicas que impactam significativamente sobre os processos celulares e o ciclo reprodutivo do seu hospedeiro trazendo-lhe benefícios, mas também beneficiando-se desta relação. Sugere-se que a presença da *Wolbachia* afeta positivamente a imunidade do organismo hospedeiro conferindo-lhe proteção contra infecções por demais patógenos, como por exemplo, infecções virais (KING *et al.*, 2018; DUTRA *et al.*, 2016).

Os mecanismos que levam à modulação da biologia reprodutiva dos insetos infectados por *Wolbachia* são muito bem estudados e documentados na literatura científica. As alterações fenotípicas no entanto, dependem de fatores relacionados ao organismo hospedeiro bem como, de características genéticas da cepa envolvida (DORIGATTI *et al.*, 2018).

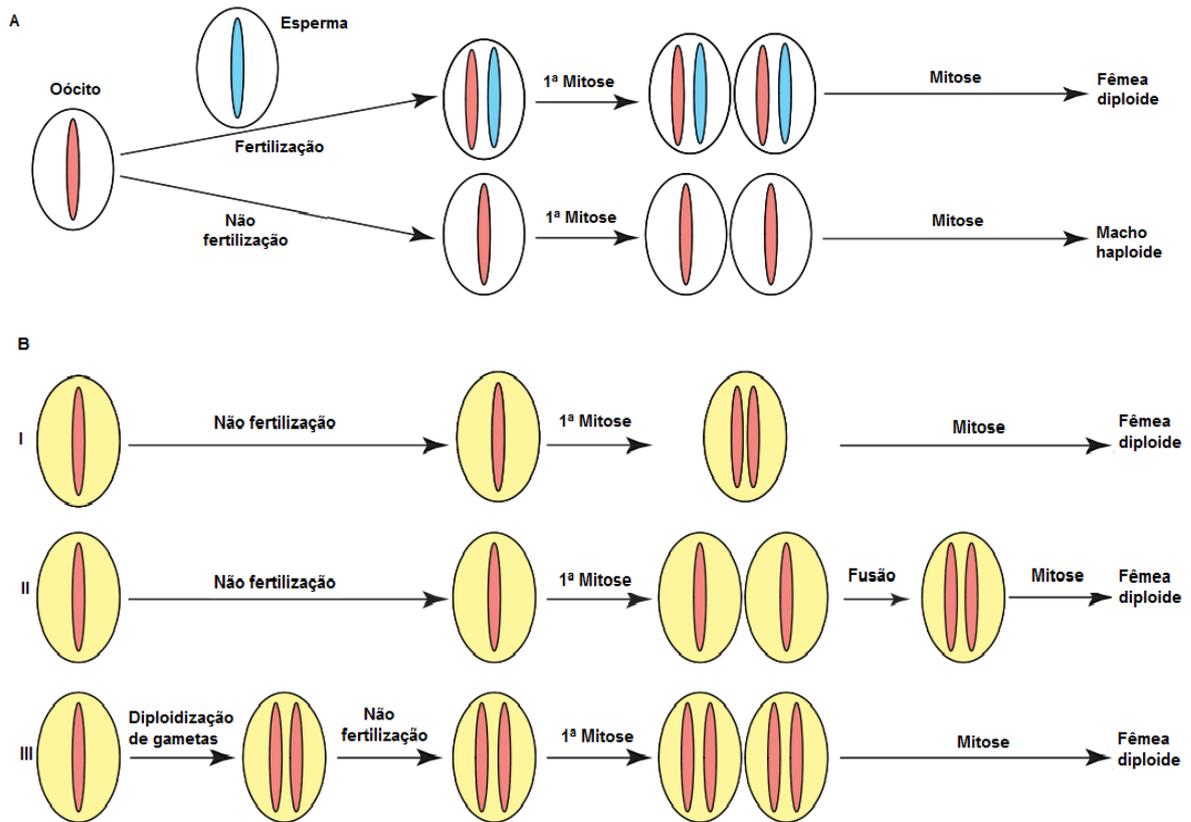
A presença da *Wolbachia* é capaz de interferir no ciclo reprodutivo do seu hospedeiro por diversos mecanismos, sendo eles: partenogênese, feminização, morte seletiva de machos e incompatibilidade citoplasmática (IC) (Figura 15) (PASCAR, 2018; WERREN *et al.*, 2008; LINDSEY e STOUTHAMER, 2017).



**Figura 15: Fenótipos induzidos por *Wolbachia* em diferentes hospedeiros.** Os mecanismos que levam à modulação do ciclo reprodutivo de seu hospedeiro são: feminização, partenogênese, morte de machos e incompatibilidade citoplasmática (Adaptado de WERREN *et al.*, 2008).

A partenogênese em insetos é um mecanismo de reprodução assexuada que caracteriza o desenvolvimento de um organismo vivo a partir de ovos não fecundados isto é, sem que haja a participação gênica paterna (WERREN *et al.*, 2008; LINDSAY *et al.*, 2016).

A partenogênese induzida por *Wolbachia* leva a interrupção do ciclo mitótico em função da dissociação incompleta dos cromossomos durante a prófase, resultando na formação de um núcleo diploide. Dessa forma, ovos fertilizados e não fertilizados darão origem a fêmeas, o que implica no aumento da população feminina e consequente disseminação da *Wolbachia* para sua prole (Figura 16) (WERREN *et al.*, 2008).



**Figura 16: Representação esquemática do mecanismo de partenogênese induzida por *Wolbachia*.** (A) Espécies livres de *Wolbachia* darão origem a fêmeas diploides após o processo de fertilização. Os ovos não fertilizados darão origem a organismos machos haploides. (B) A presença da *Wolbachia* faz com que fêmeas diploides sejam geradas sem o processo de fertilização por pelo menos três mecanismos distintos: dissociação incompleta de cromossomos (I); fusão dos núcleos após a primeira mitose (II) e diploidização de gametas (Adaptado de COURDAUX *et al.*, 2011).

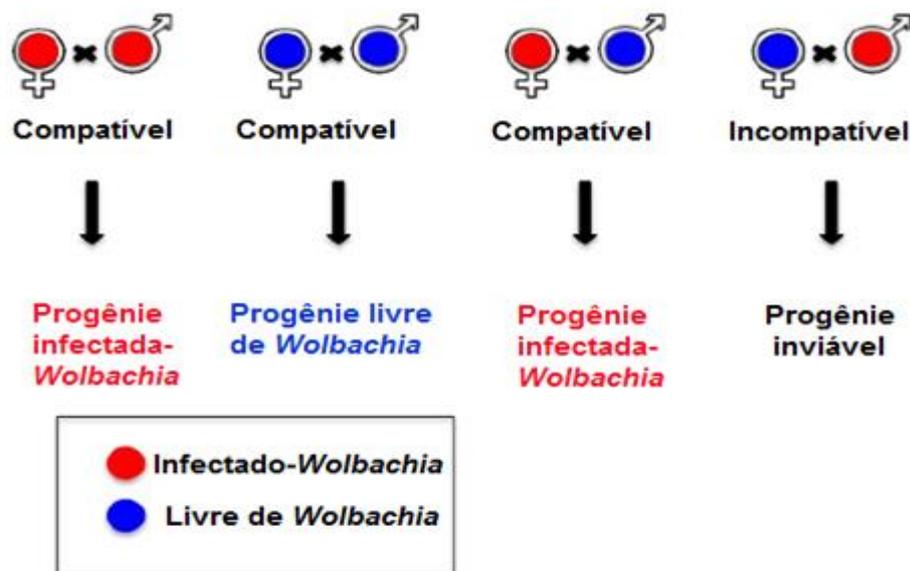
Em algumas espécies de artrópodes a *Wolbachia*, é capaz de desenvolver-se no interior da glândula androgênica causando sua hipertrofia e conseqüente inibição da sua função. Dessa forma, o desequilíbrio na síntese hormonal impede a diferenciação sexual fazendo com que machos genéticos se transformem em fêmeas fenotípicas pelo mecanismo de feminização (CORDAUX *et al.*, 2011).

Em insetos das ordens *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* e *Pseudoscorpionina* infectados por *Wolbachia*, a morte de machos ocorre durante o desenvolvimento embrionário, resultando assim em maior disponibilidade de alimentos para o completo desenvolvimento das fêmeas (WERREN *et al.*, 2008).

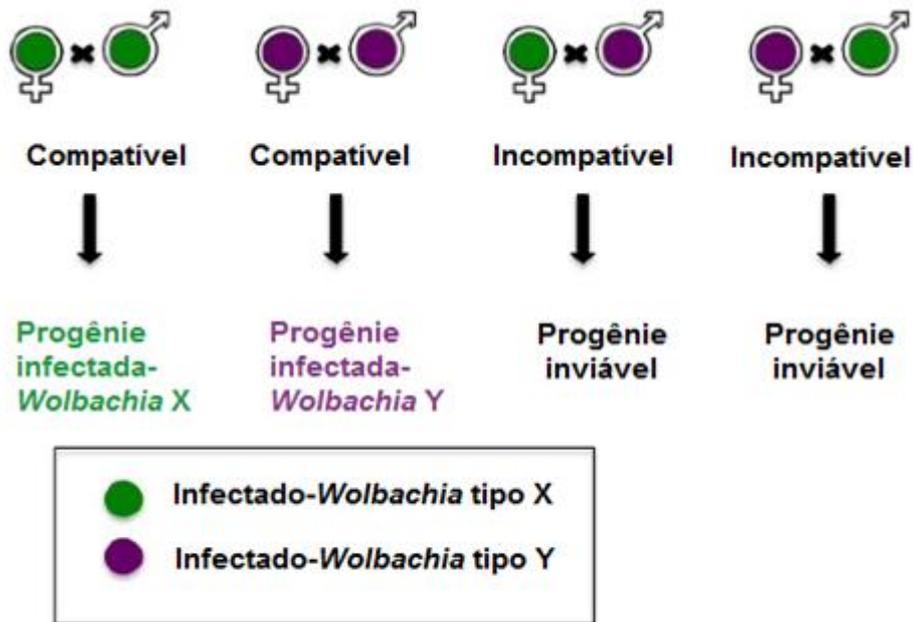
A incompatibilidade citoplasmática (IC) é a alteração fenotípica mais frequentemente observada em insetos infectados por *Wolbachia*. Refere-se à

incompatibilidade óvulo-espermatozoide que resulta na morte embrionária precoce. Quando fêmeas portadoras de *Wolbachia* acasalam com machos não infectados ou infectados por cepas compatíveis há formação de progênie viável garantindo a transmissão da bactéria aos seus descendentes. De um modo diferente, o cruzamento de fêmeas livres de *Wolbachia* ou portadoras de cepas incompatíveis com machos infectados por *Wolbachia* resulta na formação de progênie inviável uma vez que, os ovos não atingem a eclosão (JOHNSON, 2015).

A primeira situação caracteriza a incompatibilidade unidirecional, pois irá permitir a reprodução de apenas uma população específica de insetos portadores de *Wolbachia* (Figura 17). Enquanto a segunda situação é conhecida como incompatibilidade bidirecional, pois promove o desenvolvimento de populações diferentes de insetos que podem estar infectados por diferentes linhagens (Figura 18) (RAINEY *et al.*,2013).



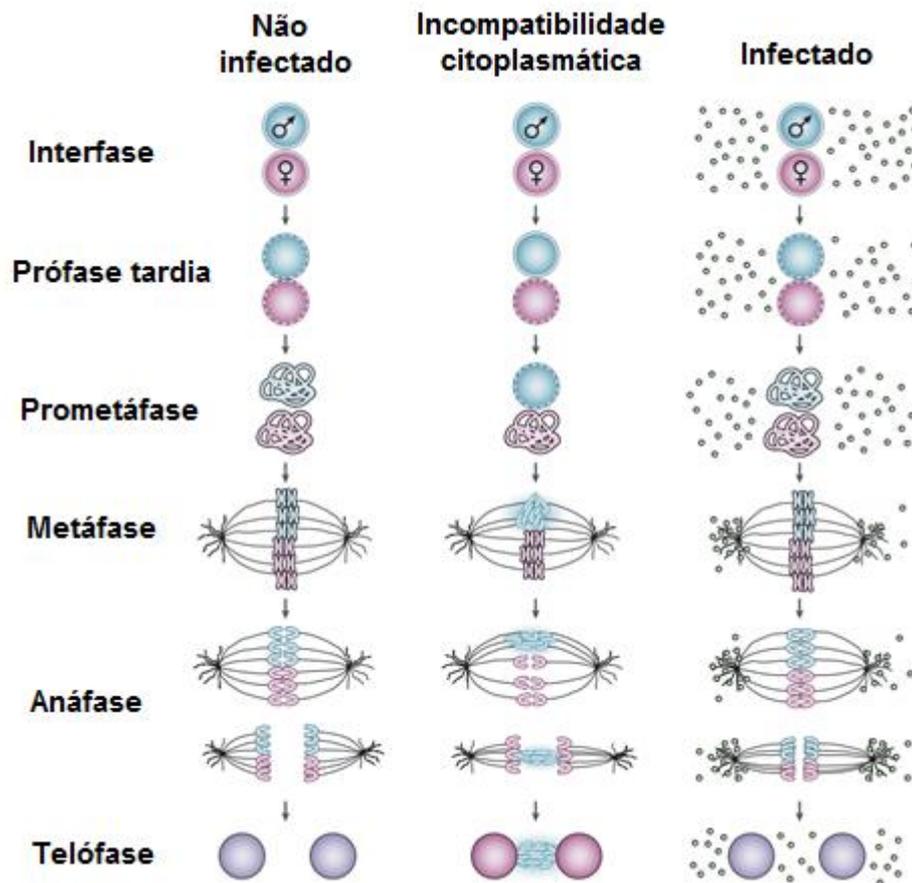
**Figura 17: Representação esquemática do mecanismo de incompatibilidade unidirecional.** Neste mecanismo, apenas uma população específica de insetos infectados com uma determinada cepa de *Wolbachia* é favorecida. O cruzamento entre organismos infectados por cepas incompatíveis resulta em progênie inviável (Adaptado de JOHNSON, 2015).



**Figura 18: Representação esquemática do mecanismo de incompatibilidade bidirecional.** Neste mecanismo, reprodução de diferentes populações de insetos portadores de diferentes cepas de *Wolbachia* é favorecida. O cruzamento entre organismos infectados por cepas incompatíveis resulta em progênie inviável (Adaptado de JOHNSON, 2015).

Os mecanismos moleculares que levam a IC ainda não são totalmente conhecidos. O modelo mais aceito atualmente é que a *Wolbachia* modifica os espermatozoides do inseto macho durante a espermatogênese e esta modificação será revertida durante o cruzamento com cepas compatíveis de *Wolbachia* (ALTINLI *et al.*, 2018; BONNEAU *et al.*, 2018).

A assincronia entre os prónucleos dos progenitores durante o início do ciclo celular resulta no atraso da replicação do material genético e na formação do envelope nuclear masculino. Na metáfase, os cromossomos maternos se condensam completamente enquanto os cromossomos paternos não se condensam corretamente e não se separam adequadamente durante a anáfase sendo excluídos ou deslocados para a extremidade do centrossoma (Figura 19) (WERREN *et al.*, 2008).



**Figura 19: Representação esquemática do mecanismo genético de IC.** Observa-se a assincronia dos núcleos feminino e masculino que não se condensam juntamente na metáfase (ao centro). Como consequência, não se dissociam adequadamente na anáfase deslocando-se para a extremidade do centrômero. IC não é observada em cruzamentos entre espécies infectadas por cepas compatíveis de *Wolbachia* (Adaptado de WERREN *et al.*, 2008).

A IC tem sido relacionada como uma estratégia para bloquear a transmissão de doenças veiculadas por vetores. O fato da *Wolbachia* ser transmitida principalmente por via vertical assegura sua transferência às futuras gerações (JEFRIES e WALKER, 2015). Dessa forma, os descendentes infectados por *Wolbachia* são capazes de substituir as populações locais de insetos vetores (SULLIVAN e O'NEILL, 2017).

Em 2009, McMeniman e colaboradores, realizaram com sucesso a transfecção de cepas *wMelPop* em mosquitos *Aedes aegypti*. Os resultados obtidos evidenciaram a redução em 50% da expectativa de vida de fêmeas adultas quando comparadas com mosquitos não infectados. A morte do vetor antes que ocorra o período de

incubação extrínseco impede o desenvolvimento completo do DENV e, conseqüentemente, a transmissão da doença (MCMENIMAN *et al.*, 2009).

A habilidade da *Wolbachia* em inibir a multiplicação viral em insetos e interferir no ciclo reprodutivo do seu hospedeiro, faz deste micro-organismo um potencial alvo de pesquisas para o controle biológico de infecções arbovirais (TATUENE *et al.*, 2017; FERGUSON *et al.*, 2015; MCGRAW e O'NEILL, 2013; FLORES e O'NEILL, 2018).

#### 4.11 Bloqueio de patógenos induzido por *Wolbachia*

Além das alterações reprodutivas observadas nos organismos portadores de *Wolbachia*, sabe-se que este endosimbionte é capaz de conferir proteção antiviral aos seus hospedeiros (RÀNCES *et al.*, 2013). Estudos demonstram que a presença de *Wolbachia* em moscas *Drosophila melanogaster* é capaz de impedir a infecção por Drosophila C vírus (DCV), um vírus de RNA que infecta comumente estes organismos (HEDGES *et al.*, 2008). A princípio, pensava-se que a proteção antiviral mediada por *Wolbachia*, era restrita aos vírus de RNA patogênicos de *Drosophila melanogaster* porém, novos estudos verificaram que a *Wolbachia* também impede a multiplicação de determinados arbovírus como o DENV, (RÀNCES *et al.*, 2012) vírus da febre amarela (YFV) (HURK *et al.*, 2012) e vírus do Oeste do Nilo (WNV)

Os mecanismos que bloqueiam a replicação viral em hospedeiros de *Wolbachia* não são totalmente conhecidos entretanto, sabe-se que a ativação de vias específicas da resposta imune, produção de compostos com atividade antiviral, competição por recursos intracelulares e mecanismos moleculares de regulação da expressão gênica estão envolvidos no bloqueio de infecções virais em artrópodes (JOHNSON, 2017; SIM *et al.*, 2014; TATUENE *et al.*, 2017; RÀNCES *et al.*, 2015)

As principais vias do sistema imune envolvidas na proteção contra infecções patogênicas em insetos são a via Toll, via da imunodeficiência (IMD) e a via de sinalização Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK-STAT). A ativação dessas vias leva à regulação da transcrição de genes codificadores de peptídeos antimicrobianos ampliando a capacidade de resposta imune entre os organismos hospedeiros de *Wolbachia* (TATUENE *et al.*, 2017; RAINEY *et al.*, 2013).

A competição por recursos essenciais como ferro e colesterol por exemplo, também está associada a proteção antiviral induzida por *Wolbachia* (TERRADAS e MCGRAW, 2017; FRASER *et al.*, 2017).

Sabe-se que a bactéria, não sintetiza o colesterol que necessita para o seu desenvolvimento, obtendo-o a partir da célula hospedeira. Da mesma forma, determinados vírus também adquirem do seu hospedeiro os recursos metabólicos necessários para sua replicação e montagem (TATUENE *et al.*, 2017). A competição por tais recursos e utilização do colesterol celular pela *Wolbachia* afeta a capacidade de replicação e infecção viral (TERRADAS e MCGRAW, 2017).

Concomitantemente, *Wolbachia* é capaz de ativar a transcrição de genes efetores da resposta imune relacionados à defesa contra patógenos e indução de liberação de espécies reativas de oxigênio causando estresse celular oxidativo (LINDSEY *et al.*, 2018). Embora se conheça o papel do endosimbionte na resposta imune do seu hospedeiro, é importante dizer que a eficiência da proteção antiviral está condicionada à densidade e distribuição da bactéria nos tecidos do inseto (MCGRAW e O`NEILL, 2013).

A partir do conhecimento do bloqueio de patógenos mediado por *Wolbachia*, associado aos fenótipos reprodutivos que permitem sua transmissão ao longo das gerações, estão sendo desenvolvidas estratégias para sua utilização como agente de controle biológico da dengue (MCGRAW e O`NEILL, 2013; LINDSEY *et al.*, 2018).

#### **4.12 Utilização da *Wolbachia* no controle e transmissão da dengue**

As primeiras estratégias para o controle da dengue baseavam-se na utilização da cepa *wMelPop* para manipular a longevidade de mosquitos vetores da doença, impedindo-os que atingissem a fase adulta e completassem o período de incubação extrínseco em que ocorre a replicação viral nas células do inseto (MCMENIMAN *et al.*, 2009; BROWNSTEIN *et al.*, 2003). Entretanto, o caráter intrínseco de virulência de *wMelPop* poderia impactar sobre a viabilidade do vetor no ambiente comprometendo seu desenvolvimento natural. Em virtude disso, a cepa *wMel* tem sido estudada para o controle da dengue, pois é capaz de impedir a multiplicação viral reduzindo os impactos sobre o ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti* (MOREIRA *et al.*, 2009).

Atualmente, uma estratégia global, proposta inicialmente pelo pesquisador Scott O`Neil da Universidade de Monash, Austrália, está sendo testada para reduzir a transmissão de doenças veiculadas por mosquitos. O *World Mosquito Program* (WMP) é uma iniciativa para o controle biológico da dengue a partir da liberação de mosquitos transfectados com *Wolbachia* em áreas endêmicas da doença. Consiste em uma

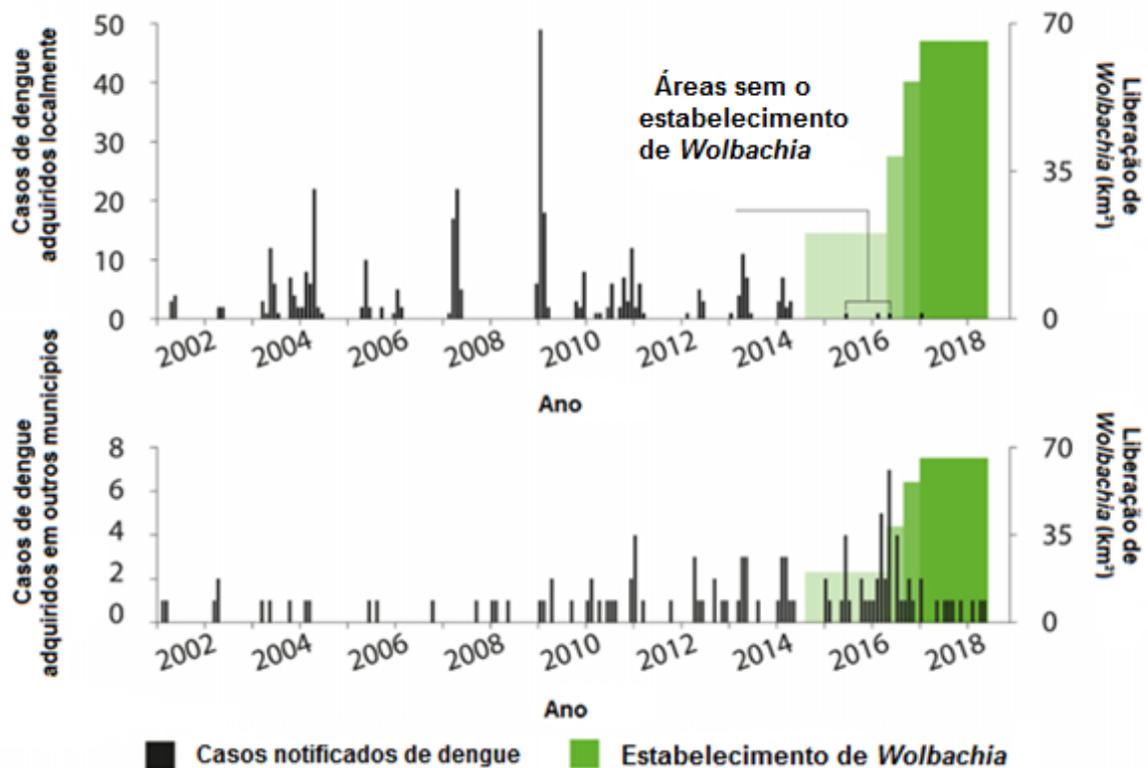
alternativa natural, segura e autossustentável para o controle das principais infecções arbovirais. Atualmente, o WMP está presente em 12 países, incluindo o Brasil (WMP, 2018).

O objetivo proposto pelo WMP consiste na substituição de espécies de *Aedes aegypti* locais por uma população de mosquitos *Aedes aegypti* infectados por *Wolbachia* (Figura 20). Em laboratório, a *Wolbachia* é transfectada para ovos de *Aedes aegypti*, a partir de microinjeções, uma vez que não é encontrada naturalmente nestes organismos. Os ovos, ao eclodirem, darão origem a pupas que se transformarão em mosquitos adultos estabelecendo uma nova geração de mosquitos portadores de *Wolbachia*. Estes, são mantidos em insetários em condições similares aquelas encontradas na natureza (WMP, 2018; FIOCRUZ, 2018).

Antes da liberação dos mosquitos testes na cidade da Austrália, a Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Comunidade das Nações (CSIRO) emitiu um relatório atestando a segurança da técnica tanto para o meio ambiente como para os seres humanos. Além disso, a saliva de mosquitos infectados foi testada e a *Wolbachia* não foi encontrada, indicando que a bactéria não é transmitida durante o repasto sanguíneo (WMP, 2018).

O emprego da *Wolbachia* tem se mostrado eficiente. Na Austrália, quase 100% da população nativa de *Aedes aegypti* atualmente está infectada por *Wolbachia* e ainda verificou-se que a presença da bactéria nestes insetos foi capaz de bloquear a multiplicação do DENV (FRENTIU *et al.*, 2014; HOFFMANN *et al.*, 2014).

O relatório da primeira implantação em larga escala na cidade de Townsville, demonstrou que a liberação de mosquitos transfectados com *Wolbachia* em grandes áreas pode ser realizado de modo rápido, eficiente e com baixos custos e grande aceitabilidade pela comunidade local. Além disso, o projeto permitiu avaliar os dados epidemiológicos referentes aos anos anteriores e compará-los com o período após a liberação da *Wolbachia* no ambiente (Figura 20) (O'NEILL *et al.*, 2018).



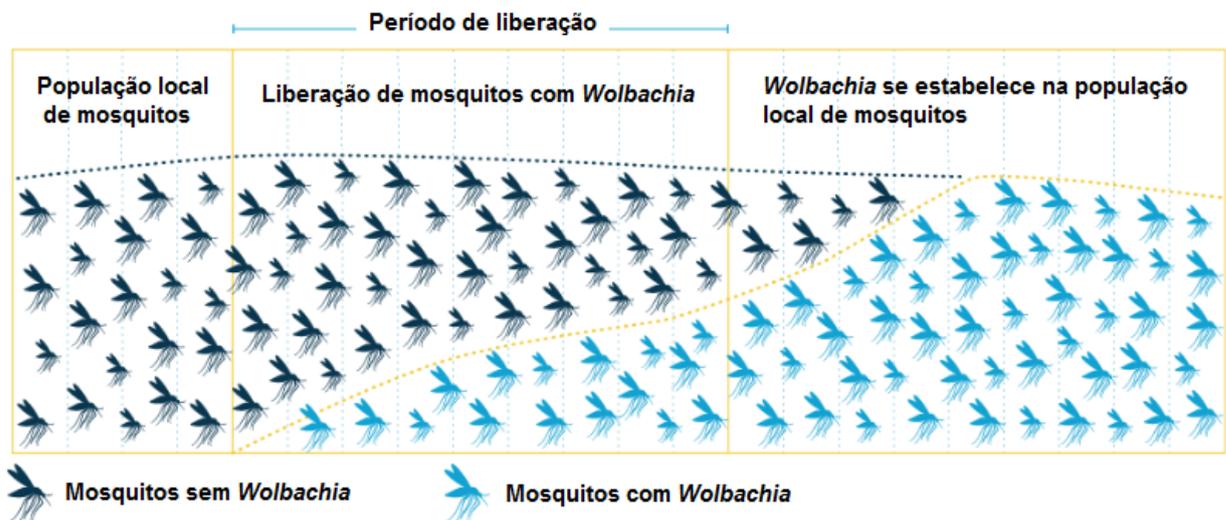
**Figura 20: Casos de dengue registrados na cidade de Townsville, Austrália.** Os dados obtidos compreendem o período de janeiro de 2001 a outubro de 2018, antes e após a aplicação do projeto Eliminar a Dengue, utilizando a *Wolbachia*. As áreas em verde demonstram o crescimento populacional da *Wolbachia* nos locais submetidos ao projeto (Adaptado de O'NEILL *et al*, 2018).

Em 2012 a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) deu início à implantação do projeto WMP no Brasil sendo chamado “Eliminar a dengue: desafio Brasil”. Em 2014 iniciou-se a liberação de mosquitos em escala piloto nas cidades de Tubiacanga, Rio de Janeiro, e Jurujuba, em Niterói e mais tarde, em 2017, a liberação de mosquitos foi realizada em larga escala também na cidade de Niterói (WMP, 2018).

As etapas do programa são muito bem delineadas e passam pela aprovação de órgãos reguladores e compreende as fases de engajamento comunitário, liberação de mosquitos e monitoramento. A primeira consiste na divulgação do método a toda comunidade local e posterior avaliação a fim de verificar o grau de entendimento e aceitação da população. Após um período de aproximadamente três meses das atividades desenvolvidas junto a comunidade, procede-se a liberação gradual de mosquitos portadores de *Wolbachia*. A liberação dos insetos é realizada no período

da manhã por profissionais da entomologia ou agentes comunitários e de vigilância em saúde em locais pré-determinados (WMP, 2018).

A etapa de monitoramento é realizada um mês após a soltura dos mosquitos que são capturados por armadilhas instaladas nos domicílios. Em seguida são executados testes moleculares para detectar a presença da *Wolbachia* nestes organismos a fim de verificar se houve o estabelecimento de uma população de *Aedes aegypti* infectados por *Wolbachia*. A partir de então a *Wolbachia* é naturalmente transmitida às demais gerações sem que haja necessidade de demais metodologias (WMP, 2018).



**Figura 21: Estratégia do programa Eliminar a dengue: desafio Brasil.** Os mosquitos portadores de *Wolbachia* ao reproduzirem-se com a população de mosquitos selvagens faz com que a *Wolbachia* seja transmitida verticalmente para as demais gerações, garantindo a autossustentabilidade da técnica (Adaptado de World Mosquito Program, 2018).

O programa conta com a aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) que também verificaram a segurança do método e os possíveis riscos para a saúde humana e ambiental (FIOCRUZ, 2018).

Resultados publicados pela FIOCRUZ referentes ao projeto piloto em Niterói confirmam a transmissão em 90% da bactéria para mosquitos *Aedes aegypti*, o que demonstra a eficiência e autossustentabilidade da técnica (FIOCRUZ, 2018).

Recentes estudos laboratoriais demonstraram também o potencial da *Wolbachia* em bloquear infecções pelo vírus *Mayaro* (MAYV) em populações de *Aedes aegypti*. Observou-se que a replicação viral em mosquitos que portavam a bactéria foi prejudicada e ainda apresentaram uma capacidade reduzida quanto à transmissão do MAYV (PEREIRA *et al.*, 2018). Além disso, a *Wolbachia* também foi capaz de impedir, em espécies *Aedes aegypti*, a multiplicação do CHIKV, DENV e do parasita *Plasmodium gallinaceum* (MOREIRA *et al.*, 2009) e também do vírus da febre amarela (ALIOTA *et al.*, 2016). Recentemente, foi evidenciado que cepas wMel também limitam a infecção por Zika vírus em mosquitos *Aedes aegypti* (ALIOTA *et al.*, 2016).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente a dengue é uma das mais importantes infecções arbovirais em todo o mundo, responsável por um grande número de casos que acometem indivíduos de diferentes faixas etárias. Além da sobrecarga ocasionada aos serviços de saúde, pelos altos índices de morbimortalidade, a dengue também implica em consequências socioeconômicas importantes.

Nos últimos anos os casos de dengue aumentaram significativamente em função da ampla distribuição de seus vetores associado aos processos de globalização, urbanização não controlada, mudanças climáticas e interferência humana no ambiente natural.

Atualmente, as principais medidas de controle da dengue limitam-se ao combate ao inseto vetor. Na busca por novas tecnologias seguras e eficientes, a utilização da *Wolbachia* tem se mostrado uma alternativa promissora, para controle das populações de insetos vetores, pois consiste em uma metodologia autossustentável e que não oferece riscos ao ambiente ou a população local. O WMP é uma iniciativa mundial aplicada em vários países, inclusive no Brasil, cujo projeto é desenvolvido pela FIOCRUZ. Esta nova abordagem de controle biológico da dengue, mostrou-se eficiente em reduzir a transmissão de vírus veiculados pelo mosquito *Aedes aegypti* sem suprimir as populações do vetor o que poderia afetar o ecossistema natural.

Concomitantemente, devem ser incentivadas a participação e o envolvimento de toda comunidade na identificação e remoção dos potenciais criadouros do mosquito *Aedes*, além da participação ativa do município na prática de programas de vigilância epidemiológica, entomológica e laboratorial.

A dengue deve ser uma preocupação dos governos nacional, estadual e regional que devem, juntos, planejar e elaborar metas de prevenção, além do monitoramento dos casos a fim de se evitar consequências graves decorrentes da doença.

## REFERÊNCIAS

- ACALA, *et al.* **The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted efficiently from infected mosquito cells.** *Virology*, v. 488, p. 278-287, 2016.
- ALIOTA, M. T. *et al.* **The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of Zika by *Aedes aegypti*.** *Scientific Reports*, 2016.
- ALTINLI, M. *et al.* ***Wolbachia* diversity and cytoplasmic incompatibility patterns in *Culex pipiens* populations in Turkey.** *Parasites & Vectors*, v.11, n. 198, 2018.
- AMÂNCIO, F. F. *et al.* **Dengue serotype 4 in highly susceptible population in Southeast Brazil.** *Journal of infection and public health*, v. 7, n. 6, p. 547-552, 2014.
- ANGEL, R. M.; VALLE, J. R. **Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet.** *PLoS Pathogens*, v. 9, n.10, p. 1-4, 2013.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica: vacina Dengvaxia.** Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201). Acesso em: 27 de novembro de 2018.
- ARAÚJO, H. R. *et al.* ***Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics.** *Insects*, v. 6, n. 2, p. 576-594, 2015.
- BÄCK, A, N.; LUNDKVIST, Â. **Dengue viruses** *Infection Ecology & Epidemiology*, v. 3, n.10, 2013.
- BEATTY, P. R. *et al.* **Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination.** *Science Translational Medicine*, v. 7, p. 1-11, 2015.
- BENELLI, G.; JEFFRIES, C. L.; WALKER, T. **Biological control of mosquito vectors: past, present and future.** *Insects*, v. 7, n. 52, p. 1-18, 2016.
- BOCHNER, R. **Óbito ocupacional por exposição a agrotóxicos utilizado como evento sentinela: quando pouco significa muito.** *Revista Vigilância Sanitária em debate: Sociedade, Ciência e Tecnologia*, v.3, n.4, p.39-49, 2015.
- BONIZZONI, M. *et al.* **The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives.** *Trends in parasitology*, v. 29, n. 9, p. 460-468, 2013.
- BONNEAU, M. *et al.* ***Culex pipiens* crossing type diversity is governed by an amplified and polymorphic operon of *Wolbachia*.** *Nature Communications*, v. 9, n. 319, 2018.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. ***Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRASIL. **Dengue: Diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança.** 5<sup>o</sup> edição. Ministério da Saúde. Brasília. Brasil. 2016.

BROWNSTEIN, J. S. *et al.* **The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 84, n. 1, p. 24-29, 2003.

BYK, L. A.; GAMARNIK, A. V. **Properties and functions of the dengue virus capsid protein.** Annual Review of Virology, v. 3, n. 1, p. 263-281, 2016.

CAMARA, T. N. L. **Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil.** Revista de Saúde Pública, v. 50, n.36, p. 1-7, 2016.

CARRINGTON, L. B. *et al.* **Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 88, n.4, p. 689-697, 2013.

CASTRO, V. A. *et al.* **Assessing the effects of interventions for *Aedes aegypti* control: systematic review and meta-analyses of cluster randomised controlled trials.** BCM Public Health, v. 17, p. 21-38, 2017.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Mosquito life-cycle. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m\\_lifecycle.html](https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html)>. Acesso em: 10 de outubro de 2018.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Dengue and *Aedes albopictus* mosquito.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/resources/30Jan2012/albopictusfactsheet.pdf>> Acesso em: 15 de setembro de 2018.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Dengue virus and dengue.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/training/cme/ccm/page47488.html>>. Acesso em: 29 de novembro de 2018.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Entomology and Ecology.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/index.html>>. Acesso em: 29 de julho de 2018.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure [Internet]. London: Cambridge University, 750 p, 1960.

CIRO, J. A. U. *et al.* **The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval.** Humman Vaccines and Immunotherapeutics, v. 10, n.9, p. 2674-2678, 2014.

CORDAUX, R. *et al.* **The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms.** Trend in Genetics, v. 27, n. 8, p.332-341, 2011.

- CUCUNAWANGSIH; LUGITO, N. P. H. **Trend of Dengue disease epidemiology.** *Virology: Research and Tratament*, v. 8, p.1-6, 2017.
- DELL VALLE, J. R. *et al.* **Dengue virus cellular receptors and tropism.** *Current Tropical Medicines Reports*, v. 1, n.1, p. 36-43, 2014.
- DENLINGER, D. L.; ARMBRUSTER, P. A. **Mosquito Diapause.** *Annual Review Entomology*, v. 59, p. 73-93, 2014.
- DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. **Molecular insight into dengue virus pathogenesis and its implications for disease control.** *Cell*, v. 162, n. 3, p. 488-492, 2015.
- DONALISIO, M. R. *et al.* **Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health.** *Revista de Saúde Pública*, v.51, n.30, 2017.
- DORIGATTI, I. *et al.* **Using *Wolbachia* for dengue control: insights from modeling.** *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 2, p. 102-113, 2018.
- DUTRA, H. L. *et al.* ***Wolbachia* blocks currently circulating zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes.** *Cell Host Microbe*, v.8, n. 6, p.771-774, 2016.
- FARES, R. C. G. *et al.* **Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil.** *BioMed Research International*, v. 2015, p.1-13, 2015.
- FARIA, N. R. *et al.* **Genomic and epidemiological characterization of a dengue virus outbreak among blood donors in Brazil.** *Scientific Reports*, v. 7, p.1-12, 2017.
- FERGUSON, N. M. *et al.* **Benefits and risks of the Sanof–Pasteur dengue vaccine: modeling optimal deployment.** *Science*, v. 353, p. 1033–1036, 2016.
- FERGUSON, N. M. **Challenges and opportunities in controlling mosquito-borne infections.** *Nature*, v. 559, n. 7715, p. 490-497, 2018.
- FERGUSON, N. M. *et al.* **Modeling the impact on virus transmission of *Wolbachia* mediated blocking of dengue virus infection of *Aedes aegypti*.** *Science Translational Medicine*, v.7, n. 279, 2015.
- FIGUEIREDO, L. T. M. **Dengue no Brasil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 285, 2012.
- FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. **Projeto Eliminar a Dengue.** Disponível em: [http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from\\_info\\_index=21&inford=2520&sid=32](http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=21&inford=2520&sid=32)>. Acesso em: 27 de novembro de 2018.
- FLASCHE, S. *et al.* **The long-term safety, public health impact, and costeffectiveness of routine vaccination with a recombinant, live-attenuated dengue vaccine (Dengvaxia): a model comparison study.** *PLoS*, v. 13, n.11, 2016.

FLORES, H. A.; O'NEILL, S. L. **Controlling vector-borne diseases by released modified mosquitoes.** Nature Reviews Microbiology, v. 16, n. 8, p. 508-518, 2018.

FORATTINI, O. P. **Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil.** Revista de Saúde Pública, v.20, p. 244-245,1986.

FRANZ, A. W. E. *et al.* **Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes.** Viruses, v.7, p. 3741- 3767, 2015.

FRASER, J. E. *et al.* **Novel *Wolbachia*-transfected *Aedes aegypti* mosquitoes possess diverse fitness and vector competence phenotypes.** PLOS Pathogens, v.13, n. 12, 2017.

FRENTIU, F. D. *et al.* **Limited Dengue Virus Replication in Field-ollected *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with *Wolbachia*.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 20, 2014.

GERTH, M. *et al.* **Phylogenomic analyses uncover origin and spread of the *Wolbachia* pandemic.** Nature Communications, v. 5, n. 5117, 2014.

GLOWSKA, E. *et al.* **New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: *Syringophilidae*).** Infection, Genetics and Evolution, v. 30, p. 140-146, 2015.

GOULD, E. *et al.* **Emerging arboviruses: why today?** One Health, v. 4, p.1-13, 2017.

GRAY, L. *et al.* **Experimental evaluation of the impact of household aerosolized insecticides on pyrethroid resistant *Aedes aegypti*.** Scientific Reports, v.8, n. 12535, 2018.

GUABIRABA, R.; RYFFEL, B. **Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models.** Immunology, v. 141, n. 2, p. 143-156, 2014.

GUBLER, D. J. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** Clinical Microbiology Reviews, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUZEETTA, G. *et al.* **Quantifying the spatial spread of dengue in a non-endemic Brazilian metropolis via transmission chain reconstruction.** Nature Communications, v.9, p. 1-8, 2018.

GUZMAN, M. G. *et al.* **Dengue Infection.** Nature Reviews Diseases Primers, v. 2, n.16055, 2016.

HEDGES, L. M. *et al.* ***Wolbachia* and virus protection in insects.** Science, v322, n. 5902, p. 702, 2008.

HERTIG, M. **The *Rickettsia*, *Wolbachia pipientis* (gen.et sp.n) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipens*.** Parasitology, v. 28, n. 4, 1936.

HERTIG, M.; WOLBACH, B. **Studies on *Rickettsia*-like microorganisms in insects.** The Journal of Medical Research, v.44, n.3, p.329-374, 1924.

HOFFMANN, A. *et al.* **Stability of the wMel *Wolbachia* Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations.** PLoS, v. 11, 2014.

HUANG, Y. J. S. *et al.* **Flavivirus-Mosquito Interactions.** Viruses, v. 6, n. 11, p. 4703-4730, 2014.

HURK, F. *et al.* **Impact of *Wolbachia* on infection with Chikungunya and Yellow Fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*.** PLoS neglected tropical diseases, v.6, n.11, 2012.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017. **Genus: *Flavivirus*.** Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus)>. Acesso em: 02 de dezembro de 2018.

JEFFRIES, C.L.; WALKER, T. **The potential use of *Wolbachia* based mosquito biocontrol strategies for Japanese Encefalitis.** PLoS, v. 9, n.6, 2015.

JOHNSON, K. N. **The impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes.** Viruses, v7, n.11, p. 5707-5717, 2015.

KING, J. G. *et al.* **Variation in *Wolbachia* effects on *Aedes* mosquitoes as a determinant of invasiveness and vectorial capacity.** Nature Communications, v. 9, n. 1, 2018.

KLEMA, V. L., *et al.* **Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping.** Viruses, p. 4640-4656, 2015.

KOSTYUCHENKO, C. A. *et al.* **Immature and mature dengue serotype 1 virus structure provide insight into the maturation process.** American Society for Microbiology Journals, v.87, n. 13, p. 7700-7707, 2013.

KRAEMER, M. U. G. *et al.* **The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*.** eLife, v. 4, 2015.

LIANG, G. **Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control.** Emerging Microbes and Infections, v.4, n. 3, 2015.

LINDENBACH, B. D. *et al.* **Flaviviridae.** Fields Virology. In: KINIP, D. M: HOWLEY, P. M. Fields Virology. 6th ed. v. 1, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2007.

LINDSEY, A. R. *et al.* **Comparative genomics of parthenogenesis inducing *Wolbachia* symbiont.** G3 (Bethesda), v. 6, n.7, p.21-13-2123, 2016.

LINDSEY, A. R. I. *et al.* **Conflict in the intracellular lives of endosymbionts and viruses: a mechanistic look at *Wolbachia*-mediated pathogen-blocking.** *Viruses*, v. 10, n.4, 2018.

LINDSEY, A. R. I.; STOUTHAMER, R. **Penetrance of symbiont-mediated parthenogenesis is driven by reproductive rate in a parasitoid wasp.** *PeerJ*, v. 5, 2017.

LIU, Y. *et al.* **Vaccines and immunization strategies for dengue prevention.** *Emerging Microbes and Infections*. v.5, n.7, 2016.

LOBO, K. S. *et al.* **Isolation and molecular characterization of *Bacillus Thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae.** *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 62, n. 1, p. 5-12, 2018.

LOPES, N. *et al.* **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 5, n.3, p. 55-64, 2014.

LUCARELLI, J. W. *et al.* **Taking a bite out of nutrition and arbovirus infection.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v. 12, n.13. p. 1-25, 2018.

MALAVIGE, G. N. *et al.* **Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection.** *BCM Infectious Diseases*, v.13, 2013.

MARTINEZ, J. *et al.* **Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* strains.** *PLoS Pathogens*, v.10, n.9, 2014.

MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. **Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 3, p. 181-193, 2013.

MCMENIMAN, C. J. *et al.* **Stable Introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*.** *Science*, v. 323, n. 5910, p. 141-144, 2009.

MESSER, W. B. *et al.* **Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity.** *PNAS*, v.112, n. 20, p. 1934-1944, 2015.

MIN, K. T.; BENZER, S. ***Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death.** *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 20, p.10792-10796, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico.** 5ª Edição, Brasília, 58 p., Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor - Manual de Normas Técnicas.** 3ª Edição, Brasília, 84p. Fundação Nacional de Saúde, Brasil, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Nacionais Para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue.** 1ª Edição, Brasília, 160p., Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD).** Brasília, 32p. Fundação Nacional de Saúde, 2002.

MOREIRA, L. A. *et al.* **A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue.** *Cell*, v. 139, n.7, 2009.

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.7, n. 1, p. 67-70, 2015.

NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* **Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p.925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* **Isolamento do vírus da dengue tipo 2 no Rio de Janeiro.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.85, n.2, p. 253, 1990.

NORMILE, D. **Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts.** *Science*, v. 342, n. 6157, p.415, 2013.

O’NEILL, S. *et al.* **Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses.** *Gates Open Research*, v. 2, n. 36, 2018.

O’NEILL, S. L. *et al.* **16S rDNA phylogenetic analyses of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, p. 2699-2702, 1992.

Organização Mundial da Saúde. **Dengue: diretrizes para diagnóstico, tratamento, prevenção e controle.** Nova edição. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2009

OSANAI, C. H. *et al.* **Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima – Nota prévia.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* v. 25, p. 53-54, 1983.

OVERGAARDE, H. J. *et al.* **Assessing Dengue transmission risk and a vector control intervention using entomological and immunological indices in Thailand: study protocol for a cluster-randomized controlled trial.** *Trials*, v. 19, p. 1-19, 2018.

PALMA, L. *et al.* ***Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity.** *Toxins (Basel)*, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PARANAVITANE, S. A. *et al.* **Dengue NS1 antigen as a marker os severe clinical disease.** *BCM Infectious Diseases.* v. 14, p. 1-7, 2014.

PASCAR, J.; CHANDLER, C. H. **A bioinformatics approach to identifying infections in arthropods.***PeerJ*, v. 6, 2018.

PEREIRA, T. N. *et al.* ***Wolbachia* significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for *Mayaro virus***. Scientific Reports, v. 8, n. 6889, 2018.

PETTERSSON, J. H. O.; PALACIOS, O. F. **Dating the origin of the genus *Flavivirus* in the light of Beringian biogeography**. Journal of General Virology, v. 95, p.1969-1982, 2014.

PROMPETCHARA, E. *et al.* **Dengue vaccine: global development update**. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 2019.

RAINEY, S. M. *et al.* **Understanding the *Wolbachia* mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: progress and challenges**. Journal of General Virology, v. 95, p. 517-530, 2013.

RÀNCES, E. *et al.* **The Toll and Imd Pathways are not required for *Wolbachia*-mediated dengue virus interference**. Journal of Virology, v.87, n. 21, p.11945-11949, 2013.

RÀNCES, E. *et al.* **The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference**. PLoS, v.8, n.2, 2012.

RATHER, I. A. *et al.* **Prevention and control strategies to counter dengue virus infection**. Frontiers in cellular and infection Microbiology, v. 7, n. 336, 2017.

RODRIGUES, A. A. R. S; BEDRIKOW, R. **Controle da Dengue sob a ótica bioética**. Revista Bioética, v.24, n.3, p.478-487, 2016.

ROSSO, J. J. *et al.* **Molecular and taxonomic characterisation of introduced specimens of *Poecilia reticulata* in the lower Paraguay River basin (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)**. Neotropical Ichthyology, v. 15, n.4, 2017.

ROTHMAN, A. L. **Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms**. Nature Reviews Immunology, v.11, n.8, p. 532-543, 2011.

SABCHAREON, A. *et al.* **Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial**. The Lancet, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, 2012.

SANTOS, F. B. *et al.* **First report of multiples lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil**. Virology Journal, v. 8, 2011.

SCHATZMAYR, H. G.*et al.* **An Outbreak os Dengue virus at Rio de Janeiro**. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. v.18, n. 2, p. 245-246, 1986.

SCREATON, G. *et al.* **New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection**. Nature Reviews Immunology, v. 15, n.12, p. 745-759, 2015.

SERUFO, J. C. *et al.* **Isolation of Dengue virus type 1 from larvae of *Aedes Albopictus* in Campos Altus city, state of Minas Gerais, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 88, n. 3, p. 503-504, 1993.

SES/MG, Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. **Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de dengue, chikungunya e zika. Ministerio da Saúde da Semana Epidemiológica 47 de 2018.** Disponível em: <[http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim\\_Aedes\\_20.11.2018%20%C3%81REA%20T%C3%89CNICA.pdf](http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Boletim_Aedes_20.11.2018%20%C3%81REA%20T%C3%89CNICA.pdf)>. Acesso em: 02 de dezembro de 2018.

SEVERO, O. P. **Eradication of the *Aedes aegypti* mosquito from the Americas.** Yellow fever: a Symposium in commemoration of Carlos Juan Finlay, 1955.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* **Working towards dengue as a vaccine-preventable disease: challenges and opportunities.** Expert Opinion on Biological Therapy, v. 17, n.10, p. 1193-1199, 2017.

SIM, S. *et al.* **Mosquito immunity against arboviruses.** Viruses, v.6, n.11, p. 4479-4504, 2014.

SITTIVICHARPINYO, T. *et al.* **Complete coding sequence of dengue virus serotype 4 isolated from field-caught mosquitoes in Thailand.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 112, n. 8, 2017.

SULLIVAN, W.; O'NEILL, S. L. **Manipulation of manipulators.** Nature, v. 543, n. 7644, p. 182-183, 2017.

SVS, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 34 de 2018.** Disponível em: <<http://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/setembro/10/2018-045.pdf>>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

TABACHNICK, W. J. **Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence.** International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 10, n. 1, 249-277, 2013.

TATUENE, J. K. *et al.* **The potential role of *Wolbachia* in controlling the transmission of emerging human arboviral infections.** Current Opinion Infectious Diseases, v. 30, n.1, p. 108-116, 2017.

TEICH, V. *et al.* ***Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil.** Jornal Brasileiro de Economia da Saúde. v.9, n. 3, p- 267-276, 2017.

TERRADAS, G.; MCGRAW, E. A. ***Wolbachia*-mediated virus blocking in the mosquito vector *Aedes aegypti*.** Current Opinion in Insect Science, p.1-8, 2017.

TORRESI, J. *et al.* **Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue.** Human Vaccines and Immunotherapeutics, v. 13, n.5, p.1059-1072, 2017.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. **Dengue Teorias e Práticas**. 1ª Ed. Fiocruz, 2015.

VASILAKIS, N. *et al.* **Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health**. *Nature Reviews Microbiology*, v.9. n.7, p.532-541, 2011.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. **A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: uma revisão sistemática**. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 16, n. 2, p. 240-256, 2013.

VILLAR, L. *et al.* **Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America**. *The New England Journal of Medicine*, n. 372, v.2, p.113-123, 2015.

WAMAN, V. P. *et al.* **Analyses of genotype diversity and evolution of Dengue virus serotype 2 using complete genomes**. *PeerJ*. v.4, p. 1-12, 2016.

WANG, G. H. *et al.* **Discovery of a new *Wolbachia* supergroup in cave spider species and the lateral transfer of phage WO among distant host**. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 41, p. 1-7, 2016.

WERREN, J. H. *et al.* ***Rickettsial* relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*)**. *Journal of Bacteriology*, v. 176, n.2, p.388-394, 1994.

WERREN, J. H. *et al.* ***Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n.10, p. 741-751, 2008.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* **Prospects for a dengue virus vaccine**. *Nature Reviews Microbiology*, v.5, p. 518-528, 2007.

WHO, World Health Organization. **Chemical control**. Disponível em: <[https://www.who.int/denguecontrol/control\\_strategies/chemical\\_control/en/](https://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/chemical_control/en/)>. Acesso em 11 de novembro de 2018.

WHO, World Health Organization. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 19 de agosto de 2018.

WHO, World Health Organization. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. New Edition, 2009.

WHO, World Health Organization. **Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012-2020**, 2012.

WHO, World Health Organization. **A global brief on vector-borne diseases**, 2014.

WHO, World Health Organization. **Planning Social Mobilization and Communication for Dengue Fever Prevention and Control**. A Step-by-Step Guide, 2004.

WHO, World Health Organization. **Vector-borne diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 10 de agosto de 2018.

WMP, World Mosquito Program. **The world mosquito program's project sites around the world**. Disponível em: <<http://www.eliminatedengue.com/program>>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

XIE, X. *et al.* **Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for Dengue virus RNA synthesis and virion assembly**. Journal of Virology, v. 89, n. 2, p. 1298-1313, 2015.

YACOUB, S. *et al.* **The pathogenesis of dengue**. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 26, n. 3, p. 284-289, 2013.

ZARA, A. L. S. A. *et al.* **Estratégias de Controle do *Aedes Aegypti*: uma revisão**. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 25, n. 2, 2016.