

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Detecção molecular de *Flavivirus* em larvas de mosquito dos gêneros *Aedes* e *Culex*
(Diptera: *Culicidae*) da cidade de Uberlândia, MG

Luisa Rodrigues Benfatti

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso em Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Detecção molecular de *Flavivirus* em larvas de mosquito dos gêneros *Aedes* e *Culex*
(Diptera: *Culicidae*) da cidade de Uberlândia, MG

Luisa Rodrigues Benfatti

Professor Doutor Jonny Yokosawa

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Detecção molecular de *Flavivirus* em larvas de mosquito dos gêneros *Aedes* e *Culex*
(Diptera: *Culicidae*) da cidade de Uberlândia, MG

Luisa Rodrigues Benfatti

Professor Doutor Jonny Yokosawa
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Coordenador: Professor Doutor Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG

Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Detecção molecular de *Flavivirus* em larvas de mosquito dos gêneros *Aedes* e *Culex*
(Diptera: *Culicidae*) da cidade de Uberlândia, MG

Luisa Rodrigues Benfatti

Aprovado pela Banca Examinadora em: // Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

Dedico o presente trabalho aos meus pais, aos familiares, aos amigos, ao meu orientador, aos professores que contribuíram para a minha formação e todos aqueles que me apoiaram na elaboração dessa monografia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Flávia A. R. Benfatti e Walter Benfatti Júnior, por me proporcionarem essa oportunidade de estudar e me apoiarem nas minhas escolhas. Obrigada por sempre acreditarem em mim e pela motivação. Agradeço também a todos meus familiares pelo suporte.

Agradeço ao meu orientador Jonny Yokosawa por todo o auxílio, ensinamentos e confiança. Obrigada aos professores que contribuíram para a minha formação, que me ajudaram a compreender o mundo da Biotecnologia e me inspiraram a seguir minha carreira.

Agradeço aos meus amigos por estarem sempre ao meu lado nos momentos difíceis, por colaborarem com os momentos de descontração e também pelo apoio.

Enfim, sou muito grata a todos aqueles que participaram da minha formação pessoal e profissional, que me forneceram as bases para a realização desse projeto.

RESUMO

O gênero *Flavivirus* é constituído por diversos vírus causadores de doenças denominadas de arboviroses, por serem transmitidos por artrópodes, podendo-se destacar a dengue, a febre amarela e a febre Zika. Essas doenças são propagadas através da picada de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*. A dengue revela-se como uma doença de grande impacto no Brasil, devido ao clima favorável à reprodução dos mosquitos vetores e consequente propagação do vírus da dengue (DENV). Sabe-se da existência de quatro sorotipos desse vírus, sendo eles: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sendo que a circulação de mais de um sorotipo viral associa-se muitas vezes a casos mais graves da doença (dengue hemorrágica). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo principal implementar a RT-PCR para detecção de RNA de *Flavivirus*, especialmente de DENV, presentes em larvas de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* coletadas na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. Para isso, utilizou-se a RT-PCR seguida da *nested*-PCR e eletroforese em gel de agarose, visando a identificação do RNA viral. Verificou-se que em uma das amostras de larvas, houve a amplificação dos segmentos de RNA correspondentes aos sorotipos DENV-1, DENV-3 e DENV-4. Portanto, a identificação de RNA viral presente em lavras de mosquitos mostra-se de grande importância para a sociedade, pois assim poderão ser tomadas medidas efetivas de prevenção, visando diminuir a proliferação desses vírus, não só na população, bem como nos vetores, diminuindo o impacto na saúde humana.

Palavras-chave: *Aedes*; arboviroses; DENV; *Flavivirus*; RNA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. METODOLOGIA.....	11
3.1. Coleta de larvas e extração do RNA.....	11
3.2. RT-PCR para o gene da Actina.....	11
3.3 RT-PCR/ <i>nested</i> -PCR para a sequência C-prM de DENV.....	13
3.4 <i>One step</i> RT-PCR.....	14
3.5 RT-PCR/ <i>nested</i> -PCR para a sequência NS5 de vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	15
3.6. Eletroforese.....	16
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	23
6. REFERÊNCIAS.....	26

1. Introdução

O gênero *Flavivirus* engloba diversos vírus responsáveis pela propagação de doenças denominadas de arboviroses como dengue, febre amarela, febre Zika, febre chikungunya, febre do Nilo Ocidental, febre Oropouche, febre Mayaro e encefalites de St. Louis e por vírus Rocio (KUHN *et al.*, 2002). Elas são assim denominadas devido ao seu modo de propagação através da picada de vetores artrópodes hematófagos, mosquitos, como por exemplo, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e mosquitos do gênero *Culex* (Figura 1).

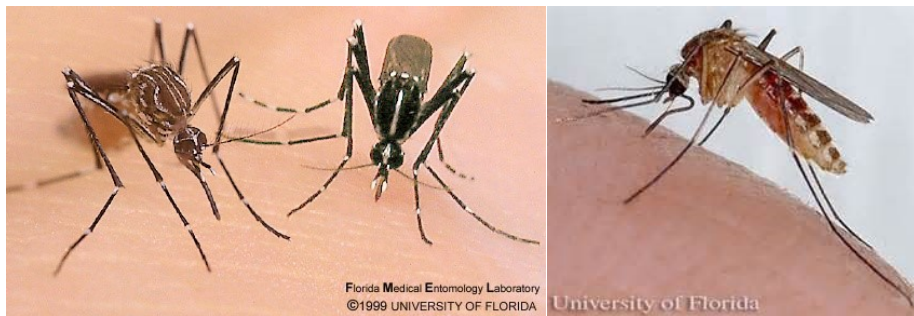


Figura 1. Da esquerda para a direita: *A. albopictus*, *A. aegypti* e mosquito *Culex sp.* Fonte: Universidade da Flórida.

No Brasil, cinco arboviroses destacam-se devido à sua importância epidemiológica e podem ser classificadas com base na evolução clínica e patológica que apresentam (Tabela 1).

Tabela 1. Arboviroses de importância epidemiológica no Brasil e evolução clínica e patológica.

Arboviroses	Evolução clínica e patológica
Oropouche	Febril
Mayaro	Febril e exantemática
Febre amarela e dengue	Febril e hemorrágica
Rocio	Encefalites

O ciclo das arboviroses depende de três hospedeiros, sendo eles: o vertebrado não humano, o invertebrado e o homem. O vertebrado não humano (roedores, preguiças, macacos, aves) é responsável pela infecção do invertebrado (inseto vetor hematófago) e não revela-se como um bom reservatório para o vírus devido à produção de anticorpos específicos que diminuem os níveis de partículas virais circulantes em seu sangue, chegando a um momento em que os invertebrados que se alimentam desse sangue não são mais infectados. Por outro lado, o inseto vetor mostra-se como um ótimo reservatório para o arbovírus, pois, após ser infectado, não é capaz de controlar a invasão viral e, assim, atua como transmissor do patógeno, produzindo inclusive descendentes infectados. Já o humano participa como um hospedeiro acidental, com exceção da febre amarela urbana e da dengue, em que ele é o único hospedeiro vertebrado (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A febre amarela destaca-se como uma arbovirose de grande importância para a saúde pública, sendo transmitida principalmente pelo mosquito *A. aegypti*, mas também pelos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Com base na epidemiologia, esta doença pode ter um ciclo rural, no qual os primatas não humanos, como os macacos, revelam-se como os principais hospedeiros e o homem pode ser um hospedeiro acidental, e outro urbano, no qual o homem mostra-se como o único hospedeiro (VASCONCELOS, 2003). Quanto aos aspectos clínicos, a doença possui um período de infecção caracterizado por sintomas gerais como febre, calafrios, mialgias, náuseas e vômitos. Após esse período ocorre a remissão, que se identifica por um período de diminuição dos sintomas, ocasionando uma aparente melhora do paciente. Por fim, a febre, a diarreia e os vômitos reaparecem e, além disso, há o surgimento de outros sintomas como insuficiência hepato-renal, acompanhada de hemorragia, configurando o período toxêmico (BRASIL, 2005).

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, o Brasil vive o maior surto de febre amarela observado em muitos anos, afetando principalmente os estados de Minas Gerais

e Espírito Santo. Cerca de 1158 casos de febre amarela foram notificados no estado de Minas Gerais de dezembro de 2016 a março de 2017, sendo que 349 casos foram confirmados e outros 667 casos estavam em processo de investigação (BRASIL, 2017). Logo, evidencia-se necessidade da detecção do vírus da febre amarela, objetivando a obtenção de dados epidemiológicos que auxiliarão no processo de combate à doença.

Outra arbovirose de grande destaque no cenário atual brasileiro é a febre Zika, a qual tem o mosquito *A. aegypti* como principal vetor e manifestou-se pela primeira vez no país em 2014 no Rio Grande do Norte, como um aparente surto de doença exantemática febril (VERAS *et al.*, 2016). O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez na África, em Uganda, em primatas não humanos, em 1947. No Brasil, ele foi identificado apenas em 2015, ano no qual comprovou-se que a contaminação de mulheres grávidas com o ZIKV estava atrelada ao nascimento de bebês com microcefalia, devido à transmissão vertical. A doença pode apresentar como principais sintomas erupções na pele, febre intermitente, hiperemia conjuntival, dor nas articulações e edema periarticular, porém em 80% dos casos é assintomática (CND, 2016).

Em 2016, foram registrados 211.770 casos de infecção por ZIKV no Brasil, com destaque para os estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, apresentando as maiores incidências da doença na região Sudeste, 67.481 e 15.211 casos respectivamente. Ademais, em 2015, foram notificados no país 4.180 casos de microcefalia decorrentes do ZIKV, sendo 270 confirmados e outros 3.448 em investigação. Dessa maneira, demonstra-se a necessidade de ampliar as pesquisas acerca dos modos de infecção, buscando para isso aperfeiçoar as técnicas de detecção e caracterização do ZIKV (BRASIL, 2016).

A dengue revela-se como uma doença de grande importância no Brasil devido ao clima tropical e subtropical, alta umidade com calor e grande volume de chuvas, favoráveis à reprodução dos vetores. Dados epidemiológicos indicam que a dengue tenha sido identificada

a mais de 200 anos nas Américas. Em 1963, comprovou-se a circulação dos sorotipos 2 e 3 em vários países da América e em 1982 ocorreu a primeira epidemia da doença no Brasil. No ano de 1981, em Cuba, houve uma epidemia provocada pelo sorotipo 2, desencadeando o primeiro caso de febre hemorrágica no continente Americano. Acredita-se que as primeiras epidemias de dengue tenham ocorrido no Brasil ainda no século XIX, porém a documentação clínica e laboratorial foi realizada somente em 1981-1982, em Boa Vista-Roraima, tendo sido identificados os sorotipos 1 e 4. Dessa maneira, a dengue vem se disseminando pelo Brasil, muitas vezes de maneira epidêmica, a qual geralmente associa-se com a aparição de novos sorotipos em locais antes não infectados (BRASIL, 2005).

No ano de 2016 foram registrados no país mais de um milhão e meio de casos de dengue e 642 mortes resultantes dessa doença, destacando-se Minas Gerais como o estado de maior incidência da doença no Brasil, contabilizando mais de 500 mil casos (BRASIL, 2016). Segundo Lopes, Nozawa e Linhares (2014), além do fator climático, o desmatamento, a agricultura, a domesticação dos animais, a migração populacional, a explosão demográfica com ocupação desordenada das cidades e consequente precariedade sanitária mostram-se como fatores que contribuem com o aumento da propagação das arboviroses.

Segundo Lopes, Nozawa e Linhares (2014), o vírus da dengue (DENV) pode ser transmitido por três vetores: *A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. polynesiensis*. Existem quatro sorotipos diferentes denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, em que o DENV-3 parece ser o tipo mais virulento. A infecção pelo DENV é geralmente assintomática, porém podem ocorrer sintomas da dengue clássica como febre alta, dores de cabeça, dores musculares, dor retro-orbital, vermelhidão no corpo e coceira. Na dengue hemorrágica, o quadro clássico evolui para sangramentos nasais, gengivais e hematomas na pele, dentre outros sintomas. Ademais, há também a forma rara da dengue chamada síndrome do choque associado a dengue, a qual envolve alterações neurológicas, cardiorrespiratórias e hepáticas

podendo levar facilmente à morte, e teria origem devido à infecção anterior por DENV de sorotipo diferente (RITA; FREITAS; NOGUEIRA, 2017).

A transmissão vertical de DENV do mosquito fêmea para sua prole é dada de duas maneiras, sendo: transovariana, na qual o vírus infecta o embrião adentrando o ovo, ou transovo, na qual o vírus permanece apenas na superfície do ovo (LEANDRO, 2015). Verifica-se que esse tipo de transmissão está relacionado com a manutenção de DENV nas populações de mosquitos (CECÍLIO *et al.*, 2015). Logo, a detecção desses vírus em ovos e larvas de mosquitos mostra-se de suma importância para a obtenção de dados epidemiológicos, os quais possibilitarão que ações preventivas sejam tomadas contra os agentes virais, visando a diminuição da disseminação de doenças.

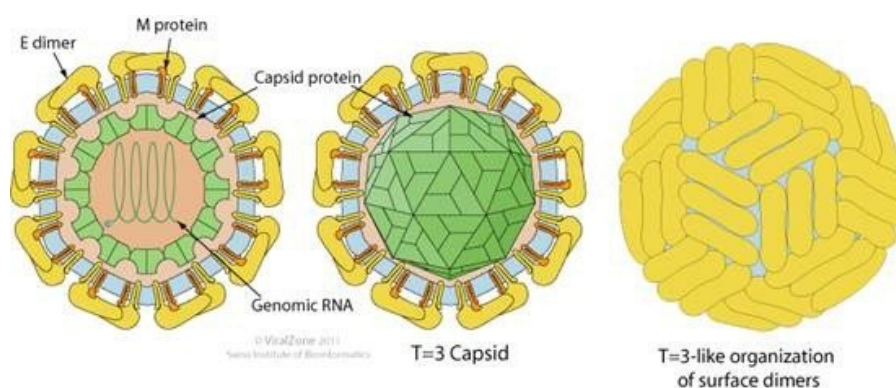


Figura 2. Organização estrutural de um *Flavivirus*. Fonte: *ViralZone* 2010 – *Swiss Institute of Bioinformatics*.

Os *Flavivirus*, em geral, são compostos por um capsídeo proteico com formato icosaédrico, o qual é envolto por um envelope lipídico onde estão inseridas proteínas de membrana e espículas glicoproteicas (Figura 2). Seu material genético é composto por um RNA de fita simples positiva que codifica três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína do envelope pré-M/precursora de M e proteína E (Figura 3). Proteínas não estruturais também são codificadas, as NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, as quais se

responsabilizam pela regulação da expressão viral relacionada à replicação, virulência e patogenicidade. A replicação dos *Flavivirus* inicia-se com a adsorção (ligação) do vírus ao receptor da célula-alvo e posterior penetração via endocitose em vesículas recobertas por clatrin. Ocorre a fusão do envelope viral com a membrana da vesícula graças ao pH baixo do endossoma e, assim, a proteína E sofrerá mudanças conformacionais que culminarão na liberação do capsídeo no citoplasma (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Após esse processo, o RNA viral é liberado diretamente no citoplasma, no qual haverá a síntese de proteínas por meio da tradução desse RNA. Em seguida, este RNA servirá como molde para a síntese de um RNA fita negativa e posteriormente o RNAm (fita positiva), que será traduzido em proteínas virais (Figura 4) ou direcionado para compor os novos vírus. Logo, o capsídeo será montado juntamente com o RNA viral, no formato icosaédrico característico dos *Flavivirus*, próximo ao retículo endoplasmático, no qual o nucleocapsídeo será envelopado, e as novas partículas virais serão liberadas para o meio extracelular via exocitose (ROEHE, 2017).

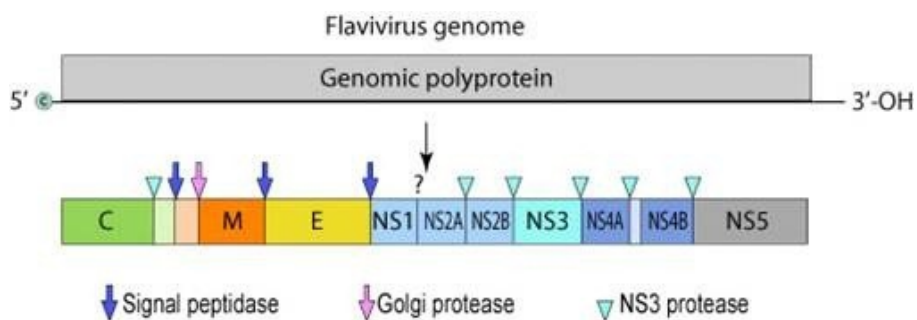


Figura 3. Esquema do genoma de *Flavivirus*. Fonte: *ViralZone 2010 – Swiss Institute of Bioinformatics*.

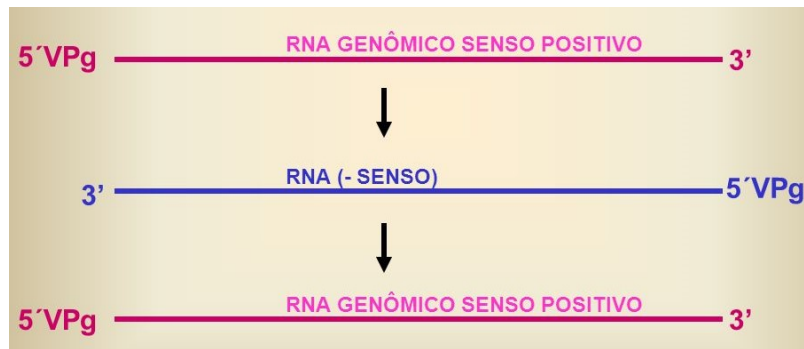


Figura 4. Esquema simplificado da replicação do RNA viral de fita simples positiva. Fonte: Microbiologia e Imunologia On-line – Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Sul.

Após a infecção, o DENV replica-se inicialmente nas células dendríticas da pele, alcançando os linfonodos e posteriormente atingindo a corrente sanguínea (viremia) (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). A técnica do ELISA (Ensaio Imunoenzimático) de captura de imunoglobulina M (IgM) consiste no método sorológico mais usado para detecção do DENV, pois possibilita a detecção de infecções atuais e recentes. Essa metodologia requer a fixação de um anticorpo monoclonal de captura (anti-IgM) a um suporte sólido (placa) e posterior adição da amostra, para ligação de IgM ao anticorpo. Em seguida, adiciona-se à placa um antígeno viral que se ligará ao IgM, caso sejam específicos, e depois um anticorpo de detecção acoplado a uma enzima (anti-antígeno conjugado), o qual se ligará ao antígeno. A adição de um substrato (cromógeno) específico da enzima, acarretará em uma reação em que seu produto é colorido, o qual indica a presença do IgM na amostra coletada da pessoa e, assim, que ela está ou foi infectada recentemente pelo vírus (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Ademais, podem ser usadas as técnicas de imunohistoquímica, baseada na detecção de antígenos virais em tecidos, de hibridização *in situ*, com uso de sondas radioativas (radioisótopos) ou não radioativas (enzimas), e também o diagnóstico histopatológico que envolve a coleta de material *post-mortem* (BRASIL, 2005).

O isolamento viral também pode ser utilizado no diagnóstico da infecção e implica na coleta de amostras de soro do paciente infectado, seguida da inoculação em cultura de células C6/36, linhagem celular de *A. albopictus* visando a amplificação viral. A identificação do vírus é feita através da técnica de imunofluorescência indireta, com uso de anticorpos monoclonais, marcados com compostos fluorescentes, específicos para os sorotipos do DENV (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Essa técnica caracteriza-se pela especificidade da ligação antígeno-anticorpo sendo, portanto, muito utilizada.

Na fase de viremia, é possível realizar a detecção do ácido nucleico do vírus no organismo. A Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) mostra-se como método eficaz na detecção de mosquitos infectados com o DENV e seu respectivo sorotipo (COSTA; SANTOS; BARBOSA, 2009). A PCR baseia-se na amplificação (multiplicação) de um segmento do material genético em estudo em milhões a bilhões de cópias, a fim de facilitar a detecção deste por eletroforese. Esse procedimento requer a amostra de DNA, que será submetida ao teste para verificar a presença ou não do DNA-alvo do vírus, por exemplo; dois *primers*, que são sequências de oligonucleotídeos complementares às extremidades opostas de cada segmento do DNA-alvo; desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs); e uma enzima polimerase termoestável (*Taq* DNA polimerase). A mistura resultante é inserida em um termociclador, aparelho que submeterá a amostra a diversos ciclos de temperatura necessários para a replicação do DNA-alvo. As etapas seguidas para a replicação consistem basicamente na desnaturação das duplas fitas de DNA, seguida da hibridização dos *primers* com a sequência alvo e por fim a polimerização do DNA pela *Taq* DNA polimerase (ROEHE, 2017).

Posteriormente à PCR, realiza-se a detecção do DNA amplificado, se este estiver presente nas amostras, através da técnica de eletroforese em gel de agarose, a qual permite sua visualização de acordo com o tamanho do DNA produzido. Para isso, são usados corantes

capazes de intercalar no DNA-alvo, como o brometo de etídeo, que quando exposto à luz ultravioleta torna-se fluorescente. Nessa técnica, há uso de uma cuba eletrolítica que permite o deslocamento do material genético do polo negativo para o polo positivo, em que as moléculas de maior peso molecular migram lentamente de um polo para outro. No caso de vírus de RNA, é necessária a realização de uma etapa extra, a transcrição reversa, na qual há uso da enzima transcriptase reversa que permite a obtenção de cDNA (DNA complementar) a partir do RNA-alvo (ROEHE, 2017). Ademais, a *nested*-PCR revela-se como outro método muito usado, pois permite a amplificação de uma região interna à região amplificada anteriormente, usando, para isso, dois *primers*, sendo um deles (*seminested*-PCR) ou ambos (*nested*-PCR) específicos para a região mais interna, a fim de aumentar a quantidade de material genético amplificado e elevar a sensibilidade da detecção.

A região genômica localizada entre o gene do capsídeo e os genes pré-membrana (C-prM) do DENV apresenta alta sensibilidade aos *primers* mD1 e D2 e, portanto, é comumente utilizada para obtenção de produtos de amplificação através da técnica de PCR (Tabela 2). Assim, esses *primers* são usados durante a primeira PCR, obtendo-se um produto de amplificação de 511 pares de bases (pb) para todos os sorotipos de DENV, enquanto que para a segunda (*seminested*) PCR combina-se o *primer* mD1 com os *primers* internos rTS1, mTS2, TS3 e rTS4, sendo cada um deles específico para identificação dos tipos sorológico da DENV 1 a 4, respectivamente (Tabela 3). Outras regiões genômicas também podem ser usadas como alvo de amplificação como a região da proteína não estrutural 5 (NS5) e a região 3' não codificante (3'NC), porém apresentam menor sensibilidade quando comparadas à região C-prM (CHIEN *et al.*, 2006).

Tabela 2. *Primers* externos e suas sequências nucleotídicas.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
mD1 (<i>forward</i>)	5' – TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG – 3'
D2 (<i>reverse</i>)	5' – TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC – 3'

Tabela 3. *Primers* internos, sorotipos, sequências e tamanho do produto de amplificação (mD1+*primer* interno).

<i>Primer</i>	<i>Sorotipo</i>	<i>Sequência</i>	<i>Tamanho (pb)*</i>
rTS1	DENV-1	5' – CCCGTAACACTTTGATCGCT – 3'	208
mTS2	DENV-2	5' – CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT – 3'	119
TS3	DENV-3	5' – TAACATCATCATGAGACAGAGC – 3'	288
rTS4	DENV-4	5' – TTCTCCCGTTCAGGATGTTC – 3'	260

*pb: pares de bases.

Diante do exposto, esta pesquisa justifica-se pela necessidade de identificar *Flavivirus* causadores de arboviroses que estão presentes na cidade de Uberlândia, para auxiliar as autoridades locais na tomada de decisões quanto às medidas de prevenção, visando diminuir a proliferação desses vírus, não só na população, como também nos vetores. Sabe-se que a circulação de mais de um sorotipo de DENV associa-se muitas vezes à incidência de casos mais graves da doença (dengue hemorrágica), logo essa pesquisa poderá contribuir para a identificação desses sorotipos. Ademais, a implementação de metodologias para a detecção de RNA viral mostra-se de grande importância para a saúde pública, já que a identificação viral possibilitará a obtenção de dados relevantes que serão úteis para a adoção de estratégias que permitam o controle desses vírus, diminuindo seu impacto à saúde humana.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Realizar a pesquisa e identificação de *Flavivirus* em larvas de mosquito dos gêneros *Aedes* e *Culex* coletadas na cidade de Uberlândia, MG.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Implementar a RT-PCR para detecção do RNA do vírus da dengue;
- ✓ Realizar a pesquisa de RNA de *Flavivirus* com amostras de larvas de mosquitos da cidade de Uberlândia.

3. Metodologia

3.1. Coleta de larvas e extração do RNA

Para esta pesquisa, foram utilizadas larvas de mosquitos *A. aegypti* e *Culex sp.* coletadas em diversos pontos da cidade de Uberlândia (em 2015), por agentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). As larvas não foram separadas de acordo com seu gênero e foram armazenadas em tubos, sendo que cada tubo continha um *pool* de oito larvas.

Após essa etapa, foi realizada a maceração das larvas para a extração do seu RNA com o uso do reagente Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), seguindo as instruções do fabricante, porém, utilizou-se metade dos volumes recomendados. O macerado das larvas foi armazenado sob refrigeração para melhor conservação do material genético. Após a execução do protocolo de extração de RNA, as amostras foram armazenadas a -70°C. Foram testadas dez amostras para detecção molecular de DENV ou de *Flavivirus*, sendo elas: 39, 124, 185, 213, 214, 263, 379, 381, 384, 416.

3.2. RT-PCR para o gene da Actina

Foi realizada a RT-PCR para amplificação de um segmento do RNA que codifica a proteína actina com o objetivo de se verificar a qualidade do RNA extraído. Para isso, os controles positivos (DENV-1 a DENV-4) e as amostras 39, 124, 384 e 831 foram testadas utilizando-se, na transcrição reversa, os seguintes reagentes: 7,8 µL de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), que inativa ribonucleases (RNases) que podem estar presentes na água e que poderiam degradar o RNA a ser amplificado; 2,0 µL do *primer* Act-8R a 10 µM (STALEY *et al.*, 2010); 2,0 µL de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) a 10 mM (cada dNTP) e 2,5 µL da amostra de RNA extraída. A mistura foi incubada a 95°C por 3 min e em seguida colocada em gelo por 1 min. Depois, adicionaram-se ao tubo 1,0 µL da enzima transcriptase reversa de M-MLV (Sigma-Aldrich, Inc.) a 200 U/µL; 2,0 µL de tampão de transcrição reversa 10X do mesmo fabricante da enzima e 0,5 µL de inibidor de RNase (Fermentas – Thermo Fisher Scientific) contendo 20 U/µL. A mistura foi novamente incubada em termocilador com a seguinte programação: 37°C por 60 min e 94°C por 5 min.

A PCR foi realizada com o uso dos reagentes: 11,75 µL de água para biologia molecular; 0,25 µL da enzima *Taq* DNA polimerase Platinum (Thermo Fisher Scientific) contendo 5 U/µL; 2,0 µL de tampão de PCR 10X do mesmo fabricante da enzima; 0,6 µL de cloreto de magnésio a 50 mM do mesmo fabricante da enzima; 0,4 µL de dNTPs a 10 mM; 2,0 µL de cada um dos *primers* Act-8R e Act-2F a 10 µM (cada *primer*) (STALEY *et al.*, 2010) (Tabela 4) e 1 µL de cDNA, totalizando 20 µL em cada tubo de PCR. A mistura foi incubada com a programação: 94°C por 10 min; 35 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 7 min.

Tabela 4. *Primers* para PCR do segmento que codifica a actina e suas sequências nucleotídicas.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
Act-8R	5' – GATTCCATACCCAGGAAGGADGG – 3'
Act-2F	5' – ATGGTCGGYATGGGNCAGAAG-GACTC – 3'

Observação: o tamanho do amplicon é de 683 pb.

3.3. RT-PCR/*nested*-PCR para a sequência C-prM de DENV

As próximas etapas consistiram em RT-PCR para detecção do RNA do DENV, sendo testadas as amostras 39, 384 e 831. Inicialmente, semelhante ao descrito anteriormente, foi preparada a mistura composta por dNTPs, RNA e, porém 2,0 µL de cada um dos *primers* mD1 e D2 10 µM (cada *primer*) (CHIEN *et al.*, 2006) em volume de 16,7 µL. Em seguida, foram adicionados o tampão da transcrição reversa, o inibidor de RNase e a transcriptase reversa de M-MLV, como volume final de reação de 20 µL.

A primeira PCR foi feita com as condições descritas acima, utilizando também os *primers* mD1 e D2 (Figura 5). Essa mistura final foi incubada em termociclador com a seguinte programação: 94°C por 2 min; 14 ciclos a 94°C por 30 s, 58°C (decrecendo 1°C por ciclo até a temperatura de *annealing* atingir 45°C – *Touchdown*) por 30 s e 72°C por 1 min; 26 ciclos de 94°C por 30 s, 45°C por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 7 min. A próxima etapa consistiu na *nested*-PCR (segunda PCR), na qual a mistura de PCR foi feita com o *primer forward* mD1 e os *primers reverse* rTS1 (Figura 5), mTS2, TS3 e rTS4, combinados (multiplex) ou separadamente (Tabela 5), e 1 µL do material amplificado pela primeira PCR. Essa mistura foi incubada em termociclador com a seguinte programação: 94°C por 1 min; 35 ciclos a 94°C por 30 s, 45°C por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 7 min.

Tabela 5. Combinação de *primers* para *nested*-PCR.

Mistura (<i>nested</i> -PCR)	<i>Primers</i>	Tamanho do amplicon (pb)
Para DENV-1	mD1 + rTS1	208
Para DENV-2	mD1 + mTS2	119
Para DENV-3	mD1 + TS3	288
Para DENV-4	mD1 + rTS4	260

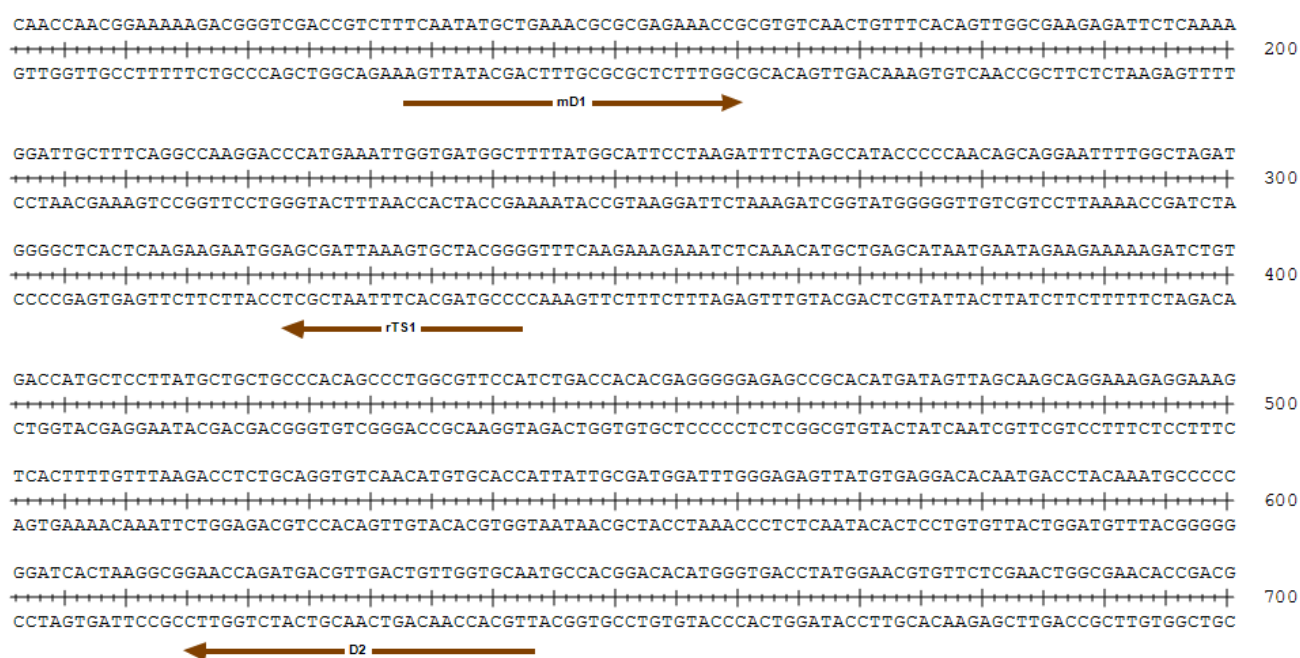


Figura 5. Sequência de bases nitrogenadas do genoma de DENV-1 (região C-prM) e regiões genômicas de ligação dos *primers* usados para RT-PCR (mD1 e D2) e *nested*-PCR (mD1 e rTS1).

3.4. One step RT-PCR

Algumas amostras (39, 124, 185, 213, 214 e 263) foram submetidas à Transcrição Reversa seguida da primeira PCR em um único passo (*one step* RT-PCR). Inicialmente, foi preparada uma mistura, composta por tampão de PCR, dNTPs, MgCl₂, *primers* mD1 e D2 e 2,5 µL do RNA. Esta mistura foi incubada a 94°C por 3 min em termociclador e em seguida

colocada em gelo por 1 min. Logo, foram adicionados inibidor de RNase, 1,0 µL de DTT (ditiotretitol – Thermo Fisher Scientific) a 10 mM, transcriptase reversa de M-MLV, *Taq* DNA polimerase, totalizando 20 µL de volume final. Essa mistura final foi incubada em termociclador com a seguinte programação: 42°C por 1 hora; 94°C por 10 min; 35 ciclos a 94°C por 30 s, 57°C por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 7 min.

3.5 RT-PCR/*nested*-PCR para a sequência NS5 de vírus do gênero *Flavivirus*

A RT-PCR também foi realizada com a utilização de outros *primers* descritos por Fulop *et al.* (1993), Bronzoni *et al.* (2005), Moureau *et al.* (2007) e Johnson *et al.* (2010) que permitem a detecção de RNA de diferentes *Flavivirus* e amplificam a sequência genômica codificante para a proteína NS5 (Tabela 6). Para tal, na transcrição reversa, foram adicionados os *primers* SP6PF2R e FG1MOD2, enquanto que na primeira PCR, foram adicionados os *primers* SP6PF2R e PF1S, baseados nos autores supracitados, porém alguns deles foram modificados para tentativa de se obter melhores resultados.

Para a *nested*-PCR foram utilizados os *primers* T7nFLVNS5FR e SP6, os quais foram baseados nos autores Fulop *et al.* (1993), Bronzoni *et al.* (2005), Moureau *et al.* (2007) e Johnson *et al.* (2010), resultando em um produto de amplificação de 243 pb, e sendo também modificados visando um melhor desempenho do processo de amplificação (Tabela 6). As amostras testadas para este protocolo foram: 39, 263, 379, 384 e 461.

Tabela 6. *Primers* para RT-PCR e *nested*-PCR e suas seqüências.

<i>Primer</i>	<i>Seqüência</i>
FG1MOD2	5' – TCA AGG AAC TCC ACC <u>C</u> AT GAG ATG TA – 3'
SP6PF2R	5' – <u>CTA GCA TTT AGG TGA CAC TAG</u> TGT CCC ADC CDG CDG TRT C – 3'
PF1S	5' – TGY RTB TAY AAC ATG ATG GG – 3'
T7nFLVNS5FR	5' – <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GGR CMA THT GGT WCA TGT GG – 3'
SP6	5' – CTA GCA TTT AGG TGA CAC TA – 3'

Observação: a seqüência sublinhada do *primer* SP6PF2R corresponde à seqüência do *primer* SP6 e a seqüência sublinhada do *primer* T7nFLVNS5FR corresponde à seqüência *primer* promotor de T7. A citosina sublinhada no *primer* FG1MOD2 foi alterada em relação ao *primer* original FG1 e, além disso, houve a remoção das duas últimas bases nitrogenadas da porção 3'.

3.6. Eletroforese

Posteriormente à etapa de *nested*-PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,2%, utilizando brometo de etídeo 0,3 µg/mL ou RedView e visualização em luz ultravioleta, de modo a verificar os resultados provenientes desses experimentos. A voltagem utilizada foi de 100 V e o tempo de corrida foi de 30 min.

4. Resultados

Primeiramente, avaliou-se a qualidade do RNA de três amostras extraídas de um *pool* de larvas coletadas em Uberlândia (amostras 39, 384 e 831) através da RT-PCR para a sequência codificante da actina (Figura 6) e, após a confirmação da viabilidade do material genético, realizou-se a RT-PCR seguida da *nested*-PCR combinadas para os diferentes sorotipos de DENV, obtendo-se como resultado produtos de amplificação com tamanhos próximos aos esperados com a amostra 39 (Figura 7). Estas etapas foram realizadas pela pesquisadora Amanda Costa Cervato, e as etapas seguintes são a continuidade dessa pesquisa. Para a confirmação do provável resultado, realizou-se a *nested*-PCR novamente para a amostra 39, porém, utilizando-se os *primers* de maneira individualizada para cada sorotipo viral (Tabela 5). Após esse procedimento, foi possível confirmar os sorotipos de DENV presentes na amostra (Figura 8).

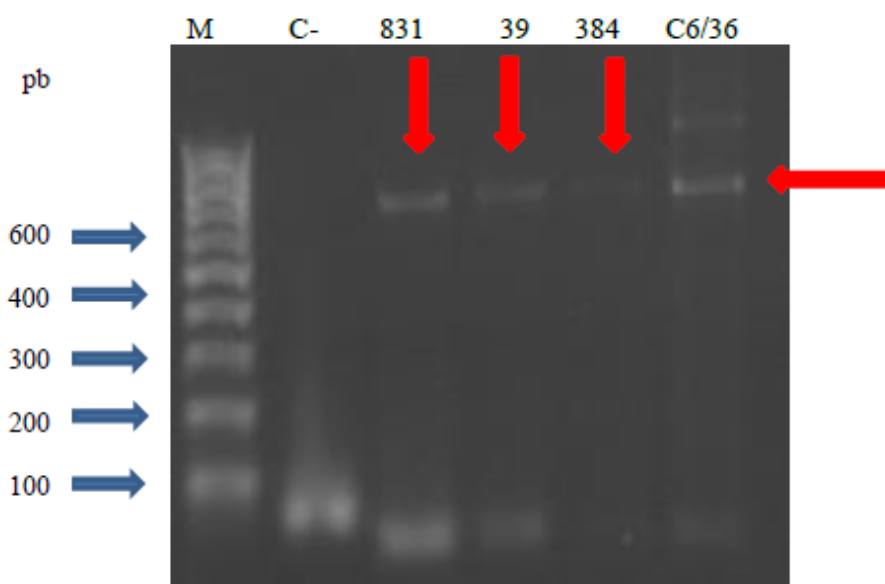


Figura 6. Eletroforese com produtos de RT-PCR para verificação da qualidade do RNA extraído para sequência nucleotídica da actina. As setas em vermelho indicam os produtos de amplificação com tamanhos esperados (683 pb). M: padrão de peso molecular 100 pb (Sigma). C6/36: controle positivo. C-: controle negativo (água).

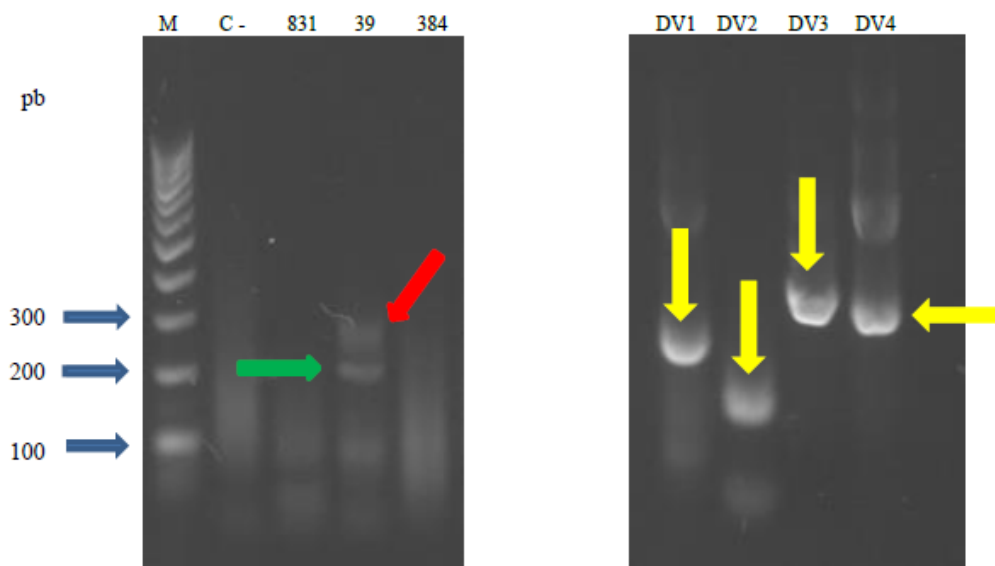


Figura 7. Eletroforese com produtos de RT-PCR/*nested* PCR para DENV com amostras 39, 384 e 83 e controles positivos DENV-1 a DENV-4. A RT-PCR foi realizada com *primers* para a amplificação do RNA de todos os sorotipos de DENV, enquanto que a *nested*-PCR foi realizada individualmente com *primers* para cada sorotipo viral. M: padrão de peso molecular 100 pb (Sigma). C-: controle negativo da primeira e da *nested*-PCR (água). As setas em amarelo indicam os produtos de amplificação dos controles positivos. A seta em vermelho indica produtos de amplificação de 288 pb ou 260 pb, demonstrando a presença do sorotipo de DENV-3 ou DENV-4, respectivamente, ou ambos. A seta em verde indica produto de amplificação de 208 pb, revelando a presença do sorotipo de DENV-1.

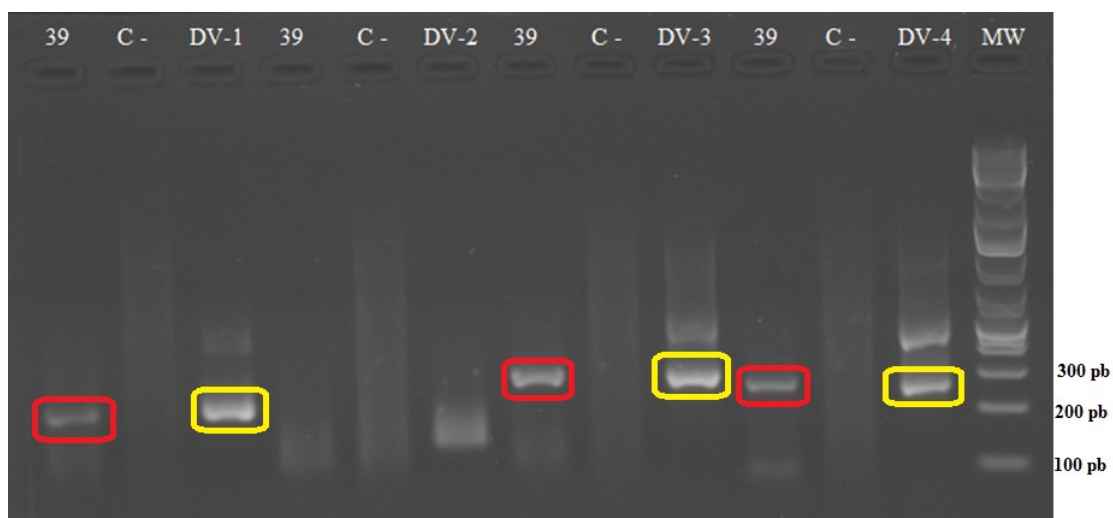


Figura 8. Eletroforese com os produtos de *nested*-PCR para DENV com amostra 39. A RT-PCR foi realizada com *primers* para a amplificação do RNA de todos os sorotipos de DENV, enquanto que a *nested*-PCR foi realizada individualmente com *primers* para cada sorotipo viral. C-: controle negativo da primeira e da *nested*-PCR (água). Em vermelho: produtos de amplificação obtidos com a amostra 39. Em amarelo: controles positivos (DENV-1 a 4). MW: padrão de peso molecular 1 kb DNA *ladder plus* (Fermentas).

Dessa forma, observou-se que a amostra 39 apresentou produtos de amplificação com tamanhos próximos aos controles de DENV-1 (208 pb), DENV-3 (288 pb) e DENV-4 (260 pb), indicando presença desses sorotipos.

As amostras 39, 124, 185, 213, 214 e 263 também foram submetidas a *One-step* RT-PCR, juntamente com os controles positivos (DENV-1 a DENV-4), não sendo visualizado nenhum resultado satisfatório.

Logo, optou-se pela verificação da qualidade do RNA extraído foi verificada por meio da RT-PCR para o gene que codifica a proteína actina, presente na larva do mosquito. Foram testados os controles positivos, além das amostras 39 e 124 (Figura 9).

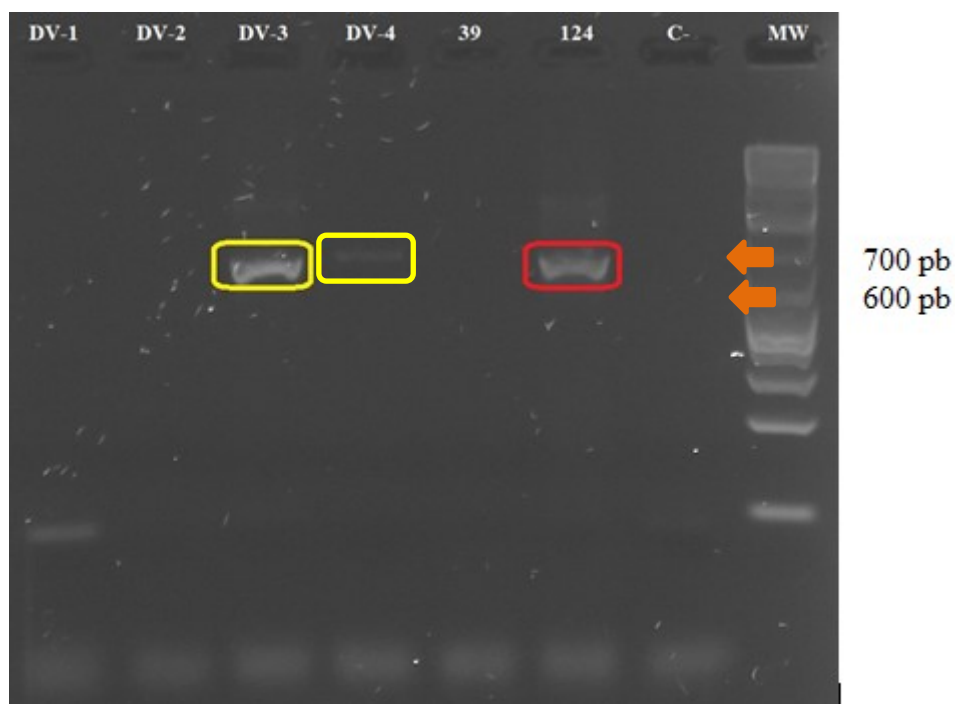


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose para verificação da qualidade do RNA extraído por meio de RT-PCR para sequência nucleotídica da actina. Da esquerda para a direita: controles positivos (DENV-1 a DENV 4), amostras 39 e 124, controle negativo (C-), marcador de peso molecular (MW). Em vermelho: produtos de amplificação obtidos através da amostra 124. Em amarelo: controle positivo (DENV-3 e DENV-4).

Assim, foi possível confirmar a viabilidade dos RNAs dos controles positivos para DENV-3 e DENV-4, além da amostra 124, pois apresentaram produtos de amplificação com o tamanho próximo ao esperado (683 pb).

Em um outro momento, realizou-se a extração do RNA dos controles positivos (DENV-1 a DENV-4), a partir de lisado de células C6/36 infectadas com os DENV e, em seguida, efetuou-se a RT-PCR e *nested*-PCR seguida de eletroforese (Figura 10). Os controles positivos foram testados seguindo essas metodologias, porém com o uso dos *primers* descritos na Tabela 6.

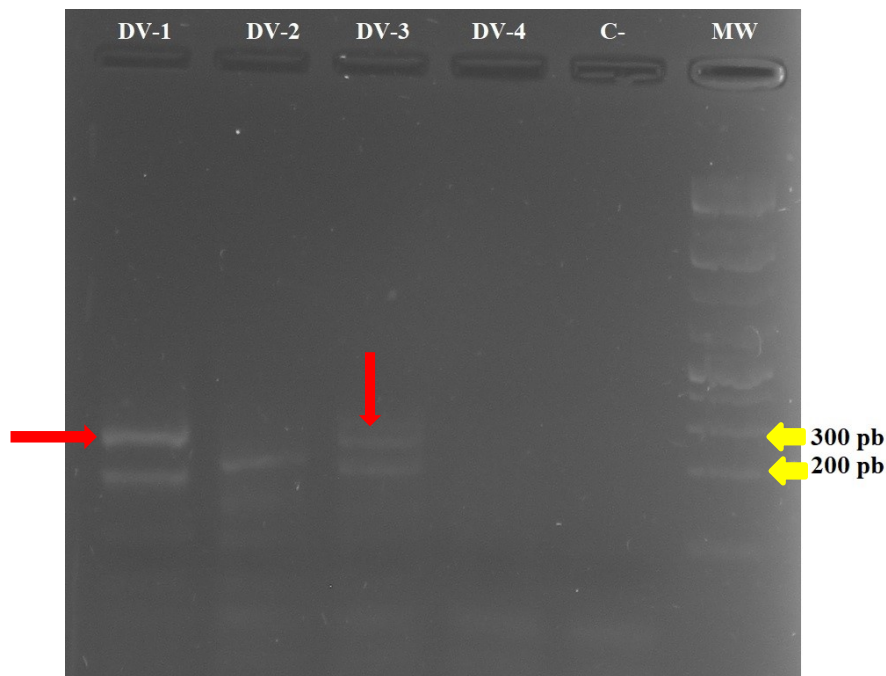


Figura 10. Eletrofore em gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação. Da esquerda para a direita: controles positivos (DENV-1 a DENV-4), controle negativo (C-) e marcador de peso molecular (MW). As setas em vermelho indicam possivelmente os produtos de interesse com tamanho esperado de 243 pb.

Após esse possível resultado, as amostras com os códigos 39, 263, 379, 384 e 461 foram testadas juntamente com os controles positivos de DENV-1 e DENV-3. Para isso, efetuou-se novamente a metodologia supracitada. Os resultados indicam que algumas amostras podem ser positivas para *Flavivirus* (Figura 11).

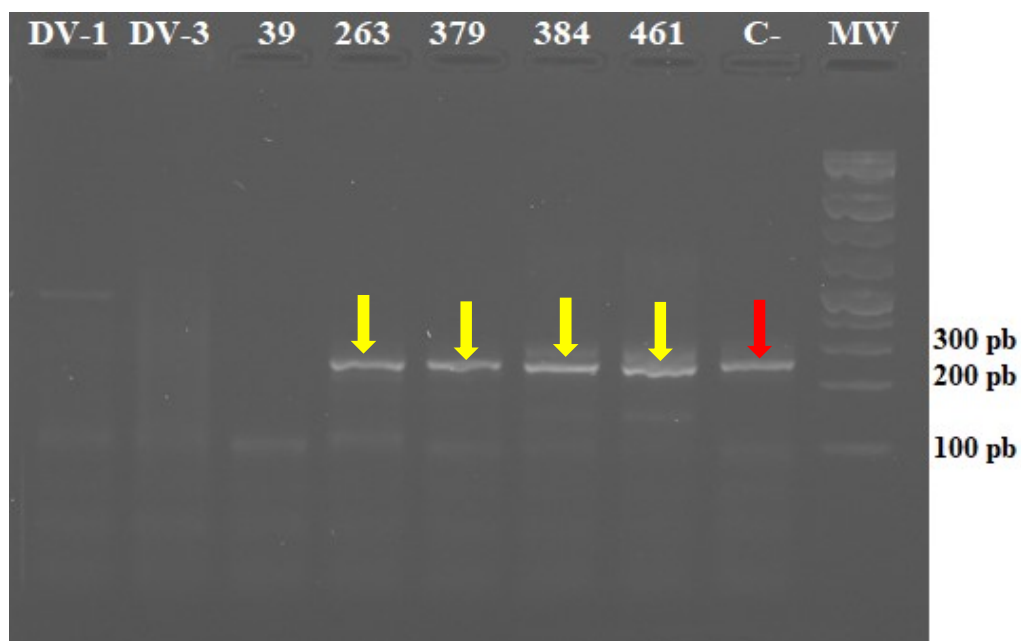


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação dos controles positivos (DENV-1 e DENV-3) e das amostras (39, 263, 379, 384, 461). C-: controle negativo. Nota-se pelas setas em amarelo produtos de amplificação com tamanhos próximos ao esperado (243 pb). A seta em vermelho mostra que o controle negativo foi possivelmente contaminado, pois também apresentou produtos de amplificação.

5. Discussão e Conclusão

Segundo Staley *et al.* (2010), a RT-PCR para a sequência que codifica a actina demonstrou que este protocolo mostra-se como uma opção para o monitoramento da integridade do RNA de mosquitos de várias espécies. Comparativamente, este trabalho obteve resultados aparentemente satisfatórios quanto à verificação da qualidade do RNA de mosquitos, já que observou-se que dois dos controles positivos (DENV-3 e DENV-4) e uma das amostras (124) apresentaram produtos de amplificação com tamanho próximo ao esperado.

De acordo com Chien *et al.* (2006), a combinação dos *primers* mD1 e rTS1, mTS2, TS3 e TS4, separadamente, tendo como alvo a sequência de C-prM de DENV, apresentaram maior sensibilidade do que outras combinações de *primers* testadas por estes autores. Os resultados observados na presente pesquisa mostraram que estes *primers* permitiram a detecção dos diferentes sorotipos de DENV, sendo mais eficientes quando utilizados de maneira separada.

Com base no alinhamento das sequências genômicas de diversos *Flavivirus*, Patel *et al.* (2013) desenvolveram uma *one-step* RT-PCR quantitativa para Pan-*Flavivirus*, utilizando para isso a região genômica conservada NS5 e visando a detecção simultânea de diferentes espécies de *Flavivirus*. Estes autores concluíram que a detecção e identificação dos *Flavivirus* são rápidas, com altas especificidade e sensibilidade. Outros autores, como Fulop *et al.* (1993) e Bronzoni *et al.* (2005) já haviam testado *primers* diferentes para a região NS5, sendo eles FG1 e FG2. Ambos obtiveram resultados satisfatórios na detecção de *Flavivirus* em geral, o que se relaciona diretamente com a caracterização do gene NS5 de diferentes vírus pertencentes a esta família, além de possibilitar a identificação de novas espécies virais. Nesta monografia, a *one-step* RT-PCR mostrou-se vantajosa pelo fato de permitir a realização da

RT-PCR em apenas uma etapa, adiantando o processo. Por outro lado, não é possível obter os cDNAs separadamente, logo, preferiu-se utilizar a RT-PCR convencional. Ademais, comparativamente aos autores supracitados, o *primer* FG1 foi modificado para FG1MOD2, visando a obtenção de um melhor desempenho do processo de transcrição reversa.

Moureau *et al.* (2007) elaborou outra RT-PCR em tempo real para detecção de RNA de diferentes espécies de *Flavivirus*, com uso dos *primers* PF1S e PF2S, responsáveis também pela amplificação da região genômica NS5. Conforme estes autores, a amplificação dessa região permite a identificação de novas espécies de *Flavivirus* devido à alta conservação genética que apresenta. No presente trabalho, o *primer* PF2S, que é degenerado, foi modificado com adição da sequência do promotor de SP6 para auxiliar na *nested*-PCR, que foi realizada com *primer* contendo somente a sequência SP6.

Os *primers* degenerados Flavi-For e Flavi-Rev foram testados por Johnson *et al.* (2010) para a amplificação da região NS5, através da RT-PCR em tempo real. Este autor concluiu que esse ensaio é capaz de detectar vários *Flavivirus* disseminados não só por mosquitos, como também por carrapatos. Logo, no presente estudo e de maneira semelhante à descrita acima, *primer* T7nFLVNS5FR, utilizado na *nested*-PCR deste estudo, constituiu-se de uma composição da sequência promotora de T7 e Flavi-For, no intuito de melhorar o sequenciamento dos produtos de PCR, caso necessário, utilizando o *primer* T7, ao invés do *primer* degenerado.

É oportuno mencionar que o controle da população de vetores virais mostra-se insuficiente para a prevenção e supressão de epidemias originárias de arboviroses. O controle da proliferação de larvas revela-se como um fator importante para evitar a disseminação das doenças virais, já que estas funcionam como um reservatório para os *Flavivirus*. A coleta de larvas evidencia-se como um procedimento muito mais simples do que a coleta de vetores

adultos, permitindo a captura de grandes quantidades de larvas e possibilitando uma detecção prévia dos vírus, auxiliando assim em um controle mais eficiente e efetivo de surtos epidêmicos iminentes (LEE e ROHANI, 2005; COSTA *et al.*, 2017).

Em suma, diferentes RT-PCR foram implantadas no presente estudo. A qualidade das amostras de RNA extraídas de larvas de mosquitos *Aedes* sp. e *Culex* sp. pôde ser avaliada com RT-PCR para RNA que codifica a actina desses organismos. Com a RT-PCR para detecção de DENV, foi possível detectar o RNA de três sorotipos virais em uma única amostra de RNA extraída de um *pool* de larvas coletadas em Uberlândia. Utilizando os diferentes sorotipos de DENV, cultivados em células C6/36, foi possível testar combinações de *primers* descritos na literatura científica e modificados em RT-PCR para pan-*Flavivirus*. Porém, neste caso, foi possível somente a detecção do RNA de DENV-1 e DENV-3. A implementação de metodologias para a identificação e caracterização de *Flavivirus* é de grande importância para a sociedade, já que possibilita não só a tomada de medidas profiláticas contra agentes virais novos ou não, como também o estudo acerca desses vírus, visando possivelmente a criação de medicamentos e/ou vacinas eficazes contra esses agentes.

6. Referências

BRASIL. Desconhecido. Portal da Saúde. **Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016.** 2016. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

BRASIL. Desconhecido. Portal da Saúde. **Dados epidemiológicos Zika.** 2016. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-zika>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

BRASIL. Desconhecido. Portal da Saúde. **Óbitos por Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2016.** 2016. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/obitos-ate-2016.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **INFORME ESPECIAL FEBRE AMARELA NO BRASIL Nº 01/2017.** 2017. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/18/Informe-especial-COES-FA.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

BRONZONI, R.V. *et al.* **Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses.** Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.2, p.696-702, 2005.

CECÍLIO, S. G. *et al.* **Dengue virus detection in Aedes aegypti larvae from southeastern.** Journal Of Vector Ecology. Ouro Preto, p. 71-74. jun. 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvec.12134/full>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

CHIEN, L. *et al.* **Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses.** Journal of Clinical Microbiology, v.44, n.4, p.1295-1303, 2006.

COMUNICAÇÃO CORPORATIVA PARA A SECRETARIA DE COMUNICAÇÃO SOCIAL (CND). **Vírus Zika no Brasil.** 2016. Área Internacional Presidência da República Federativa do Brasil. Disponível em: <https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/SaoFrancisco/pt-br/file/Fact_Sheet_Zika_Virus_Jan16.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2017.

CONSOLI, R. A. G. B; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228p.

COSTA, C. F. *et al.* **Transovarial transmission of DENV in Aedes aegypti in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring.** Parasites & Vectors, Manaus, 2017.

COSTA, C. A.; SANTOS, I. G. C.; BARBOSA, M. G. **Deteção e tipagem de vírus dengue em Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas.** 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822009000600013&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 20 mar. 2017.

FULOP, L. *et al.* **Rapid identification of flaviviruses base conserved NS5 gene sequences.** Journal of Virological Methods, v.44, p.179-188, 1993.

JOHNSON, N. *et al.* **Assessment of a novel real-time pan-flavivirus RT-polymerase chain reaction.** Vector-Borne and Zoonotic Diseases, v.10, n.7, p.665-671, 2010.

KUHN, R. J. *et al.* **Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion.** 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0092867402006608/1-s2.0-S0092867402006608-main.pdf?_tid=f26dcaf8-0dd6-11e7-b8f3-00000aabb0f26&acdnat=1490060430_5aa7ca84addd42900c7ba0041a53d1f0>. Acesso em: 10 mar. 2017.

LEANDRO, D. C. **TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 2 EM AEDES AEGYPTI (DIPTERA: CULICIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DO MOSQUITO.** 2015. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015. Disponível em: <[http://www.bdt.d.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/14061/Leandro, Danilo de Carvalho. Doutorado Acadêmico em Biologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.bdt.d.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/14061/Leandro,%20Danilo%20de%20Carvalho.%20Doutorado%20Acad%C3%AAmico%20em%20Biologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 19 dez. 2017.

LEE, H. L.; ROHANI, A. **Transovarial Transmission of Dengue Virus in Aedes aegypti and Aedes albopictus in Relation to Dengue Outbreak in an Urban Area in Malaysia.** Dengue Bulletin, Malaysia, v. 29, 2005.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil.** 2014. Artigo de Revisão. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007>. Acesso em: 20 mar. 2017.

MOUREAU, G. *et al.* **A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses.** Vector-Borne Zoonotic Diseases, v.7, n.4, p.467-477, 2007.

PATEL, P. *et al.* **Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses.** Virology Journal, Berlin, v. 10, n. 1, p.58-69, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-10-58>.

RITA, A. B.; FREITAS, R.; NOGUEIRA, R. M. R. **Dengue**. Agência Fiocruz. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/dengue-0>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

ROEHE, P. M. **Curso de Virologia Básica**. UFRGS. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labvir/material/poligrafo1.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

SANTOS, N. S. de O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional, 2015.

STALEY, M. *et al.* **Universal Primers for the Amplification and Sequence Analysis of Actin-1 from Diverse Mosquito Species**. National Institute Of Health, Ames, p.214-218, jun. 2010.

VASCONCELOS, P. F. C. **Febre amarela**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém, PA, p.275-293, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v36n2/a12v36n2>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

VERAS, Maria Amélia *et al.* **Zika vírus: desafios da saúde pública no Brasil**. Revista Brasileira de Epidemiologia, [s.l.], v. 19, n. 2, p.225-228, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5497201600020001>. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/rbepid/v19n2/1980-5497-rbepid-19-02-00225.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2017.