



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Plínio Pereira Gomes Júnior

**Dengue em Serra Talhada - PE: vigilância entomológica,
epidemiologia e perspectiva molecular.**

Recife

2016

Plínio Pereira Gomes Júnior

**Dengue em Serra Talhada - PE: vigilância entomológica,
epidemiologia e perspectiva molecular.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

**Recife
2016**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Gomes Júnior, Plínio Pereira

Dengue em Serra Talhada-PE: vigilância entomológica, epidemiologia e perspectiva molecular/ Plínio Pereira Gomes Júnior– Recife: O Autor, 2016.

192 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Valdir de Queiroz Albino

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, 2016.

Inclui referências e anexos

- 1. Dengue 2. Polimorfismo (genética) 3. Epidemiologia I. Albino, Valdir Queiroz (orientador) II. Título**

616.91852

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-169

Plínio Pereira Gomes Júnior

**Dengue em Serra Talhada - PE: vigilância entomológica,
epidemiologia e perspectiva molecular.**

Aprovado em 10/03/2016

Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Valdir de Queiroz Albino
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dra. Heidi Lacerda Alves da Cruz
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Nelson Bernardi Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Dr. Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Profa. Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

Recife

2016

**Por tudo que tenho e
fiz, dedico a Deus.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os colegas, técnicos ou alunos do LABBE-UFPE, pelos momentos e troca de conhecimentos. Todos me ensinaram algo que levarei para o resto da vida. Em especial: Kláudia, Moises, Lidiane e Sérgio, parceiro de longa data e colega de trabalho. A estes, minha eterna gratidão.

Agradecer aos colaboradores do Laboratório Central, Laboratório de Bioquímica e Laboratório de Genética de Microorganismos. Além dos colaboradores do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães.

Agradeço a todos os colegas de trabalho da Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UAST, que sempre estavam dispostos a trocar horários para que eu pudesse estar presente no meu compromisso acadêmico. E é claro, aos meus alunos, que durante todo este período tiveram que se virar na minha ausência e nunca reclamaram. E dentre estes, Ariadja Monique, que me surpreendeu com uma gratidão imensa ao ponto de dispor seus horários livres para me ajudar nas coletas e de livre espontânea vontade, pois já havia defendido a monografia.

Agradeço ao Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pela paciência, pelos ensinamentos e pela oportunidade durante todos esses anos de convívio. Ao Núcleo de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde de Serra Talhada, obrigado pela confiança.

E o mais importante, a Deus, pois durante todos esses anos passei por muitos momentos difíceis, desagradáveis e arriscados, que sem ele, não seria possível suportar.

Agradeço à minha família, esposa, filhos e pais, por suportar a distância e os momentos de mau humor e estresse. Por também ter contribuído como forma de incentivo, pois tudo que faço é pensando no melhor para eles. E por me apoiarem durante as doenças que desenvolvi ao longo desta odisséia.

E finalmente, a todos os professores que me passaram um pouco de seus conhecimentos, à coordenação do programa de Pós-graduação em Genética e a Universidade Federal de Pernambuco, por disponibilizar a oportunidade de realizar uma pós-graduação de *Stricto sensu* de excelência.

“A distância se mede pensando na vida. Pense no que fez de bom e de ruim. Pense no que deu certo e principalmente, no que deu errado. E quando tu deres conta, já trilhastes todo o caminho”.

RESUMO

Serra Talhada, no sertão Pernambucano, registra grandes surtos de dengue. O armazenamento inadequado de água devido a estiagem prolongada, contribui para a perpetuação dos mosquitos. Além disso, *Aedes albopictus* também pode gerar maiores problemas para o município. Em nossas análises, o número de casos de dengue no período de 2012 a 2013, possui correlação com o número de ovos coletados no mês anterior. Apesar dos surtos intermitentes, o baixo número de casos de Dengue Hemorrágica, levanta questões a respeito de genes de suscetibilidade/resistência. Por isso, analisamos as frequências alélicas e genótípicas do marcador CCR5 e dos SNPs IL-4, IL-10 e Ly-6. Em nossos resultados, a mutação CCR5 Δ 32, apresentou baixa frequência. Os SNPs IL-4 e IL-10 encontraram-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Em relação às frequências alélicas, quando comparadas à população global, Ibérica, Peruana e Africana, observamos diferenças significativas para IL-4, mas não para IL-10. Já Ly-6 apresentou frequência alélica significativa em relação a Ibéricos, Peruanos e Africanos. A frequência genotípica dos genótipos CT e TT de IL-4, apresentaram diferenças significativas em relação a todas as populações. Enquanto que o genótipo TT de IL-10 foi significativamente diferente em relação aos Ibéricos. Para Ly-6, o genótipo GG foi significativamente diferente em relação à população africana, enquanto AG e AA diferiram das populações Ibérica, Peruana e Africana. Porém, só após o acréscimo de um grupo controle ou de outra categoria comparativa, teremos resultados conclusivos.

Palavras Chave: Epidemiologia, polimorfismo, CCR5, IL-4, IL-10, Ly-6.

ABSTRACT

Serra Talhada, in semiarid of Pernambuco State, register every two years, dengue outbreaks. Inadequate water storage due prolonged drought, perpetuate the mosquito. Moreover, *Aedes albopictus*, may cause major problems for the municipality. Our analysis detected that the number of dengue cases in the period 2012-2013, has correlation with the number of eggs collected in the previous month. Despite facing intermittent outbreaks, the low number of cases of Hemorrhagic Dengue, raises questions about susceptibility / resistance genes. Therefore, we analysed allelic and genotypic frequencies of the marker CCR5 and SNPs IL-4, IL-10 and Ly-6. About our results, the CCR5 Δ 32 mutation, showed a low frequency. About SNPs IL-4 and IL-10, Hardy-Weinberg disequilibrium were found. Regarding to allele frequency significant differences were observed for IL-4 but not IL-10 when compared to the overall population, Iberian, Peruvian and African. Ly-6 showed significant allele frequency compared to Iberian, African and Peruvian. Concerning to genotypic frequency, significant differences in relation to all populations were found to CT and TT genotype of IL-4. While the TT genotype of IL-10 was significantly different in relation to the Iberian. For Ly-6, the GG genotype was significantly different in relation to the African population, while AG and AA differ from the Iberian populations, Peruvian and African. However, to conclusive results regarding these markers, it becomes necessary to add a control group or another comparative category.

KEY-WORD: epidemiology, polymorphism, CCR5, IL-4, IL-10, Ly-6.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2. Revisão bibliográfica	Página
2.1 Dengue	
Figura 1. Mapa sinalizando os casos de dengue registrados ao redor do mundo nos primeiros meses de 2014.	18
2.3 <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762.	
Figura 2. Mapa global da distribuição prevista de <i>A. aegypti</i> . O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (a partir de 0 azul para vermelho 1) com uma resolução espacial de 5 km × 5 km.	24
Figura 3. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	25
Figura 4. Ilustração do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .	26
2.4 <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894.	
Figura 5. Mapa global da distribuição prevista de <i>A. albopictus</i> . O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (a partir de 0 azul para vermelho 1) com uma resolução espacial de 5 km × 5 km.	27
Figura 6. Da esquerda para a direita <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .	28
2.5.6 Vírus Zika	
Figura 7. Países que possuem evidências passadas ou atuais de transmissão de vírus Zika (até dezembro de 2015)	37
2.6 Imunopatologia da dengue	
Figura 8. Principais mecanismos propostos para descrever este realce: um é a supressão da resposta antiviral mediada por interferon pela suprarregulação de reguladores negativos e a outra é a polarização da citocina tipo Th 2 despertada pela ativação de IL-10. A entrada o	43

vírus é detectada pela célula apresentadora de antígeno que estimula as células B a produzir anticorpos de reação cruzada que se ligam aos vírus e são capturados pelos macrófagos (Boonnak *et al.*, 2011).

2.6.1 Citocinas

Figura 9. Visão geral dos eventos imunes chaves apos infecção do DENV. O DENV se liga ao DC-SIGN, o receptor viral na superfície da DCs, para mediar a entrada. Então as células NK e MBL, como defensores iniciais, rapidamente tomam medidas para matar as células infectadas. No entanto, haveriam algumas células infectadas que escaparam, na qual poliproteínas DENV sintética podem ser processadas entre peptideos e subseqüentemente acessa o antígeno processante e programa a apresentação. Depois, o linfócito T CD4+ pode ser ativado e diferenciado para promover as respostas de Th1 e Th2 para exercer seus efeitos complexos adversos. A migração de células Th1/Th2 pode ser direta ou indiretamente regulada pelo calcitriol 1,25-(OH)2D3 pela ligação com nVDR. As células B podem produzir diversos anticorpos com a ajuda de Th2 relacionados a citocinas. Os anticorpos tem três tipos de efeitos: ADE, neutralização e danos a plaquetas (quando ligados com HPA). O mecanismo imune patogênico do DENV aqui considera estes eventos imunes do hospedeiro para permitir o dano às células endoteliais, o aumento na permeabilidade vascular e finalmente sintomas hemorrágicos. As estrelas azuis representam moléculas imunes estratégicas na qual o polimorfismo do locus tem sido associado com a patogenese do DENV (Fang *et al.*, 2012). 45

2.6.2 Receptor de quimiocina CCR5

Figura 10. Estrutura do correceptor de membrana CCR5, são indicados os domínios ligantes de HIV (domínio N-terminal e ECL2) e o ECL1. 51

Capítulo I

Resultados

- Figura 1. Heatmap gerado por meio da análise de série temporal pelo programa R, relacionando a média de ovos coletados ao longo do período de estudo para cada bairro. 69

Capítulo II

Results and discussion

- Figura 1. Electrophoresis gel showing the amplification product of *Aedes albopictus* DNA barcode region. *Lane M* = molecular weight; *lane 1* = one single egg; *lane 2* = 5 eggs; *lane 3* = 10 eggs; *lane 4* = 20 eggs; *lane 5* = 30 eggs; *lane 6* = 40 eggs; *lane NC* = negative control. 80
- Figure 2. Multiple sequence alignment of *Aedes aegypti* and *A. Albopictus* DNA barcode sequences. Two sequences obtained in this study and two reference sequences from GenBank are compared. The accession number is displayed. The outlined nucleotide bases are conserved. 82

Capítulo IV

Resultados e discussão

- Figura 1. Mapa da cidade de Serra Talhada mostrando os bairros de acordo com a Secretaria de Obras do Município. Contornados em vermelho, bairros com situação de saneamento básico precário, em laranja situação de saneamento básico regular e em azul situação satisfatória. 98

LISTA DE TABELAS

Capítulo I		Página
Resultados		
Tabela 1.	Distribuição do quantitativo de ovos coletados por mês para cada bairro de julho de 2012 a dezembro de 2013 em Serra Talhada. Com média ponderada de ovos por bairro. S. Cris. – Bairro de São Cristovão, A. Conc. – Bairro do Alto da Conceição, Borb. – Bairro da Borborema, A.B.J. – Bairro do Alto do Bom Jesus, Cen. – Bairro do Centro, Malh. – Bairro da Malhada, Cx. Eco. – Bairro da Caixa Econômica, V. Mil. – Bairro da Vila Militar, BB. I – Bairro da Bomba I, BB. II – Bairro da Bomba II, Cax. – Bairro da Caxixola, Coh. – Bairro da Cohab, Mut. – Bairro do Mutirão. De acordo com os dados da Secretaria de Obras do Município, em vermelho os bairros com baixa qualidade de saneamento básico, em laranja os bairros de qualidade de saneamento intermediário e em azul, o bairro com saneamento adequado.	67
Tabela 2.	Relação de pluviosidade e temperatura compensada média com número total de ovos de julho de 2012 a dezembro 2013.	68
Tabela 3.	Bairros com maior índice de densidade de ovos (EDI) e maior índice de positividade de ovitrampa (POI) por mês de julho de 2012 a dezembro de 2013 em Serra Talhada. S. Cris. – Bairro de São Cristovão, A. Con. – Bairro do Alto da Conceição, A.B.J. – Bairro do Alto do Bom Jesus, Cent. – Bairro do Centro, Malh. – Bairro da Malhada, Cx. Eco. – Bairro da Caixa Econômica, V. Mil. – Bairro da Vila Militar, BB. I – Bairro da Bomba I, BB. II – Bairro da Bomba II, Cax. – Bairro da Caxixola, Mut. – Bairro do Mutirão	71
Capítulo IV		
Resultados		
Tabela 1.	Caracterização do grupo caso relacionando os bairros com as variáveis: gênero, raça declarada, faixa etária, escolaridade e renda.	100
Tabela 2.	Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg.	101
Tabela 3.	Frequência alélica e genotípica para CCR5.	101

Tabela 4.	Análise de interação por classificação cruzada de CCR5 e sexo.	102
Tabela 5.	Teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg.	103
Tabela 6.	Comparação das frequências alélicas e genotípicas entre: população Global, população da península ibérica, população Peruana, População Africana, Grupo caso, sub-população de Serra Talhada e sub-população dos indivíduos nascidos em outras cidades.	104
Tabela 7.	Distribuição de genótipos conforme análise dos SNP's com local de nascimento.	105
Tabela 8.	Análise de associação de genótipos de SNP's entre sexos.	106

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CCR5 –	<i>Citocine Chemocine Receptor 5</i> (Quimiocina receptora de citocina 5)
CCR5Δ32 –	Deleção de 32 pares de bases do gene de CCR5
CCZ –	Centro de Controle de Zoonoses
CPqAM -	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DDT -	Diclorodifeniltricloroetano
DENV –	Vírus Dengue
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
DNAmt –	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
DSS -	Determinantes Sociais de Saúde
FD –	Febre da Dengue
FHD -	Febre hemorrágica do Dengue
GPS –	Sistema de Posicionamento Global
GWAS	Genome-Wide Association Studies (Estudos de associação em todo Genoma)
HIV -	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
IBGE –	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-4 –	Interleucine 4
IL-10 –	Interleucine 10
LABBE -	Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva
LirAa –	Índice de leitura rápida de infestação de <i>Aedes aegypti</i>
Ly- 6 –	<i>Lymphocyte antigen 6</i>
NVS -	Núcleo de Vigilância em Saúde
OMS –	Organização Mundial de Saúde
PCR –	<i>Polymerases Chain Reaction</i>
SCD –	Síndrome de Choque da Dengue
SNPs -	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE –	Universidade Federal de Pernambuco
WHO –	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Dengue – considerações gerais	18
2.2 Epidemiologia da Dengue	21
2.2.1 Epidemiologia da Dengue no Mundo	21
2.2.2 Epidemiologia da Dengue no Brasil	22
2.2.3 Epidemiologia da Dengue em Pernambuco	23
2.3 <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS, 1762.	24
2.4 <i>Aedes albopictus</i> SKUSE, 1894.	27
2.5 Principais Arbovirus Transmitidos por <i>Aedes</i> spp.	29
2.5.1 Vírus da Encefalite Equina	30
2.5.2 Vírus do Nilo Ocidental ou do Oeste do Nilo	30
2.5.3 Vírus Vale Rift	32
2.5.4 Vírus Febre Amarela	33
2.5.5 Vírus Chikungunya	34
2.5.6 Vírus Zika	36
2.5.7 Vírus Dengue	38

2.6	Imunopatologia da dengue	39
2.6.1	Citocinas	44
2.6.1.1	Interleucina 4	46
2.6.1.2	Interleucina 10	47
2.6.2	Receptor de quimiocina CCR5	48
2.6.3	Ly-6 (antígeno de linfócito 6)	51
2.7	Estudos de Associação Genética na Dengue	54
2.8	Identificação molecular de espécies	56
2.8.1	Marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I	57
2.8.2	Marcador Mitocondrial BARCODE	58
2.9	Marcadores imunológicos de resistência/suscetibilidade	59
3	OBJETIVOS	61
3.1	Geral	61
3.2	Específicos	61
4	Capítulo I	62
5	Capítulo II	77
6	Capítulo III	84

7 Capítulo IV	89
8 DISCUSSÃO GERAL	120
9 CONCLUSÕES	130
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
11 ANEXOS	151
12 Curriculum Lattes	175

1. INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose mais preocupante no mundo atualmente, colocando sob o risco de infecção, dois terços da população mundial. Esta doença apresenta quatro sorotipos distintos e pode se manifestar tanto como um quadro febril clássico, como quadros graves com manifestações hemorrágicas e síndrome de choque hipovolêmico, potencialmente fatais. Sua dispersão vem aumentando graças às migrações, seja devido à mudança climática, seja por conflitos armados ou devido à facilidade de locomoção entre os continentes.

A redução de transmissão de dengue pode ser obtida primariamente através do levantamento da culicidaeofauna que ocorre nos locais de transmissão intensa e pelo controle da densidade populacional dos vetores, em especial a do mosquito *Aedes aegypti*, seu principal vetor, mantendo-as abaixo do limiar crítico. Pois este inseto utiliza construções humanas, formando criadouros em reservatórios feitos pelo homem, de preferência, os que possuem um grande número de pupas. Este fato, deveria produzir uma abordagem de controle de custo efetivo e focada, o qual poderia resultar na redução da população de mosquitos adultos.

O município de Serra Talhada, assim como a maioria dos 5.585 municípios do Brasil, tem sofrido com surtos epidêmicos recorrentes de dengue. No país, esta doença apresenta um ciclo bienal, caracterizado pela entrada ou dispersão de novos sorotipos a nível local, causando várias mortes em virtude de suas formas mais graves, a dengue hemorrágica e a síndrome de choque da dengue. No entanto, alguns municípios, em virtude de sua história de formação étnico-cultural e dos fatores ambientais, apresentam números de casos de dengue hemorrágica abaixo do estimado segundo pelas instituições de monitoramento de

casos, demonstrando que fatores genéticos da população podem protegê-la do desenvolvimento de quadros graves de dengue.

Foi observado que *A. aegypti*, encontra facilidade de perpetuação graças à carência de políticas públicas e descaso dos moradores, uma vez que sua forte domiciliação associada com o armazenamento inadequado de água, garante a manutenção das populações do mosquito vetor. Além do *A. aegypti* existem outros vetores do dengue que merecem atenção, como o *A. albopictus*, que possui hábito mais silvestre, mas também está implicado no ciclo de transmissão da dengue.

Uma forma de resistência e dispersão dos *Aedes* spp. são os ovos, que podem ficar mais de um ano latentes aguardando condições favoráveis para a eclosão das larvas. Durante a rotina de vigilância entomológica, foram recolhidos ovos, que por meio da análise de correlação com o número de casos do mesmo período com o mês anterior, observamos um aumento significativo nos primeiros oito meses do estudo. No período de coleta de 2011 a 2013, alguns ovos foram coletados para análise genética por meio do marcador Barcode, para identificação de culicídeos que ovipositavam nas ovitrampas do programa de vigilância entomológica. E por meio deste sistema de vigilância molecular, pudemos confirmar, pela primeira vez no sertão de Pernambuco, a presença do *A. albopictus*.

Em alguns casos, populações expostas a infecções recorrentes de dengue, adquirem resistência a um sorotipo circulante. No entanto, com a introdução de um novo sorotipo, o número de casos de dengue e dengue hemorrágica aumenta, uma vez que a resposta imune cruzada gera quadros mais graves. Por tanto, este trabalho teve como objetivo, analisar a viabilidade do uso de métodos tradicionais

e moleculares no estudo da epidemiologia da dengue no município de Serra Talhada, sertão de Pernambuco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DENGUE

As infecções virais de dengue tem se tornado uma das mais importantes infecções virais transmitidas por mosquito no mundo, com um aumento de 30 vezes na sua incidência. Ela tem causado epidemias significantes em cinco das seis regiões da World Health Organization (WHO) (Figura 1) (Callaway, 2007).

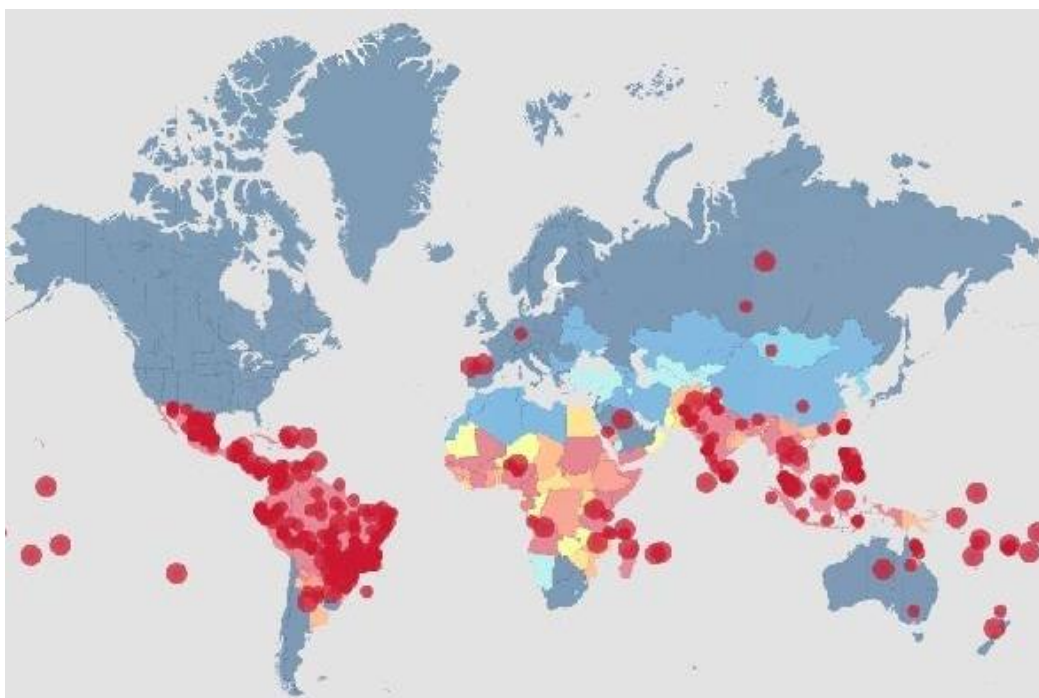


Figura 1 - Os pontos vermelhos no mapa sinalizam os casos de dengue registrados ao redor do mundo nos primeiros meses de 2014. Fonte: Exame Abril. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/> Acessado em: 25/08/2014.

A maioria das infecções é assintomática (Teixeira *et al.*, 2000), porém 100 milhões de pessoas a cada ano tem febre da dengue (FD), a qual se apresenta frequentemente como uma doença febril aguda que dura ao menos sete dias de graves dores nas articulações que é seguida de fraqueza generalizada e mal estar (Halstead, 1981).

A FD é caracterizada por febre alta acompanhada de, pelo menos, dois dos seguintes sintomas: forte dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, ou erupções cutâneas (Cordeiro *et al.*, 2007). As características clínicas da febre da dengue variam de acordo com a idade. Bebês e crianças pequenas principalmente sofrem de uma doença febril com erupção cutânea, enquanto adolescentes e adultos, mais frequentemente sofrem de sintomas incapacitantes de início abrupto de febre alta, mialgia, artralgia, erupção cutânea, dor de cabeça e retro-orbital; a artralgia e mialgia podendo ser tão severa, ao ponto da doença ter sido chamada de febre quebra-ossos pelas áreas popularmente endêmicas (Gunthera *et al.*, 2011).

A dengue merece atenção especial não só pela sua distribuição global, mas também pela prevalência e gravidade das formas mais severas, a febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome de choque da dengue, estimadas em 2,1 milhões de casos todos os anos (Callaway, 2007).

A presença de FHD é definida pelas mesmas manifestações clínicas como para FD, mas com a adição de manifestações hemorrágicas incluindo: teste do laço positivo, trombocitopenia (contagem de plaquetas $<100,000/\text{mm}^3$), hemoconcentração ou outros sinais de extravasamento de plasma. Além disso, foi aplicado mais uma classificação, ou seja, “febre da dengue com complicações” (FDC), referindo-se a um subgrupo de pacientes FD que desenvolvam trombocitopenia, mas não preenchem completamente os critérios da OMS para FHD (Cordeiro *et al.*, 2007).

Uma porcentagem muito pequena de infecções sintomáticas (1-6%), evolui para febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome de choque da dengue (SCD). Esta forma da doença é frequentemente mortal e é caracterizada pela

febre alta (40-41°C) e fenômeno hemorrágico. Em alguns casos os pacientes aparentam estar recuperados de FD por causa do início da diminuição da temperatura, mas isto é rapidamente seguido pelos sinais de falhas circulatórias e os pacientes podem atingir um estado de choque e morrer dentro de 24 h (Gunthera *et al.*, 2011). A maioria dos casos de FHD ocorrem em indivíduos acometidos com infecção recente com um ou mais dos quatro sorotipos virais ou indivíduos que possuem anticorpos maternos não-neutralizantes (Halstead, 1981).

Embora a patogênese da FHD seja parcialmente compreendida, sabe-se que os indivíduos positivos para anticorpo dengue que experimentam uma infecção por dengue subsequente têm maior risco de desenvolver FHD (Burke *et al.*, 1988), indicando que a imunidade pré-existente para DENV pode exacerbar a doença (Wahala *et al.*, 2011), potencialmente fatal associada com trombocitopenia, derrame vascular, hemorragia e choque hipovolêmico (Gubler e Kuno, 1997). Isto ocorre, provavelmente, devido ao realce de anticorpo mediado e a ocorrência de resposta imune anormal contra os altos níveis de viremia e antígenos circulantes, resultando em uma produção exarcebada de citocinas, ativação de linfócito T e recarga insuficiente de corpos apoptóticos. A correlação da gravidade da doença com marcadores moleculares de ativação imune e de outros fatores, tais como: plaquetas alteradas, células dendríticas e as contagens de monócitos, têm sugerido que as respostas imunitárias dos vírus do dengue contribuem para processo autoimune que resulta em FHD (Halstead, 2007).

Ainda não há vacinas viáveis aprovadas e o tratamento para FD e FHD/SCD é principalmente paliativo. No entanto, com os modernos cuidados médicos adequados e terapia apropriada de reposição do volume plasmático,

diminuem os números de mortes relacionados à FHD/SCD (Gunthera *et al.*, 2011).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE

2.2.1 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE NO MUNDO

Nas décadas de 1950 e 1960, a Organização Panamericana de Saúde quase erradicou *A. Aegypti*, por direcionar o tratamento com inseticidas sobre as formas adultas e imaturas em habitat doméstico e eliminando criadouros (Gómez-Dantés e Willoquet, 2009).

A febre da dengue representa um dos principais problemas de saúde pública, com milhões de casos e milhares de mortes todos os anos em áreas tropicais urbanas, suburbanas e rurais (Guzman e Istúriz, 2010). Desde a década de 1990, as epidemias de dengue vem se espalhando no mundo graças à urbanizações rápidas e ao aumento mundial de viagens (Xiao-Xia *et al.*, 2013).

Para superar a carga da dengue, tem-se tentado o monitoramento de resistência, estratégias alternativas e desenvolvimento de novos inseticidas ou formulações diferentes de inseticidas novos (Dusfour *et al.*, 2011).

As infecções terciárias de DENV tem sido raramente documentadas, além disso, apoia ainda mais a noção de que a infecção secundária estimula a longo prazo anticorpos neutralizantes que podem até mesmo ser efetivo contra sorotipos não encontrados anteriormente (Myers e Varkey, 1971; Kosasih *et al.*, 2006).

Não existe um método totalmente eficaz de prevenir a infecção de dengue em viajantes que visitam áreas tropicais. O risco de infecção pode ser reduzido

significativamente, pela compreensão do comportamento básico e hábitos de alimentação do mosquito vetor e tomando algumas precauções simples para diminuir a exposição a picadas de mosquitos infecciosos. Fêmeas de mosquitos *A. aegypti* preferem se alimentar dentro de casa, com pico de atividade de picar ocorrendo durante 2 a 3 horas após o amanhecer e durante 3 a 4 horas antes do anoitecer. Embora o risco possa ser maior nestes momentos, é importante lembrar que o mosquito pode se alimentar dentro de casa a qualquer momento durante o dia, bem como ao ar livre, especialmente em dias nublados. Para turistas e viajantes que vão para locais com alto índice de infestação, são recomendados, ficar em quartos com ar-condicionado, dedetização dos quartos com inseticidas em aerossol para matar os mosquitos adultos, uso de repelente que contenha dimetil-metatoluamida (DEET) na pele exposta, e vestir roupas de proteção tratadas com um repelente semelhante (Gubler, 1998).

2.2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE NO BRASIL

Ainda não há vacina efetiva autorizada contra Dengue, mas se a vacina fosse viável, o controle do vetor permaneceria como parte importante do manejo desta doença e de outras arboviroses relacionadas. No Brasil, o último programa de controle da dengue, PNCD, enfatiza a vigilância regular casa-a-casa e análise trimestral da taxa de infestação predial ou índice de casas infestadas em áreas sentinelas metropolitanas. Isto é usado em um índice rápido de vigilância de *A. aegypti* (LirAa), desenvolvido para determinar o índice de infestação predial baseado na presença de larvas nas áreas definidas e formalmente (estratos) a nível de vizinhança através de cada cidade (BRASIL, 2005).

2.2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE EM PERNAMBUCO

Os primeiros registros de dengue em Pernambuco, datam do ano de 1987, contudo essa epidemia foi controlada, devido às ações realizadas para controlar o vetor *A. aegypti*, entretanto em 1995 voltou a atuar uma nova epidemia de dengue, graça a entrada do sorotipo DENV-2. O sorotipo DENV-3 chegou ao Estado em 2002, provocando inúmeros casos da doença e até o ano de 2006 houve cerca de 380 mil notificações de dengue (Cordeiro *et al.*, 2008). Sendo que entre os anos de 2004 a 2006 ocorreu uma diminuição nos casos de dengue, apesar de estudos confirmarem que no estado haveria a circulação de três sorotipos simultaneamente, fato este que aumentam as chances de ocorrer outras epidemias (Guedes *et al.*, 2010).

Por se localizar na região nordeste do Brasil, Pernambuco apresenta um clima bastante favorável para a proliferação do vetor da doença, e desta forma contribui para um grande número de casos de dengue, e também há outros fatores que podem estar associados a essas epidemias como as condições socioeconômicas da população mais atingida, as quais não detêm de informações fundamentais para o combate ao mosquito vetor, e mesmo com medidas realizadas pelos governos, a situação da dengue no estado ainda é preocupante (SSEPE, 2011).

No ano de 2010, Pernambuco registrou um número sete vezes maior de casos de dengue em relação a 2009, que passou de mais de 8 mil casos em 49 municípios para cerca de 58 mil em 185 cidades, sendo 17 casos de dengue clássica com complicações, 150 casos de febre hemorrágica e com 20 óbitos (Silva e Nóbrega, 2012).

2.3 *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762.

O mosquito *Aedes aegypti* é um inseto da ordem Diptera, família Culicidae, originário do norte da África e que se dispersou pelo mundo por meio do comércio e tráfico de escravos (Figura 3)(Forattini e Brito, 2003). É vetor da Chikungunya, febre amarela e dengue em áreas urbanas no Novo Mundo (Kyle e Harris, 2008). No território brasileiro, a dengue foi reintroduzida pelo vetor *A. aegypti* (Figura 2) devido à falta de vigilância dos países vizinhos (Brasil, 2005). Como todos os outros mosquitos, *A. aegypti* é um inseto holometábolo, nutre-se de néctar floral e seiva vegetal. Contudo, as fêmeas são anautógenas, necessitando de um repasto sanguíneo, que é geralmente sucedido por uma postura de ovos. Entretanto, *A. aegypti*, mais do que qualquer outra espécie do gênero, alimenta-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando a fêmea não está totalmente ingurgitada, característica epidemiologicamente importante, pois aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e transmitir o vírus (Barata *et al.*, 2001).

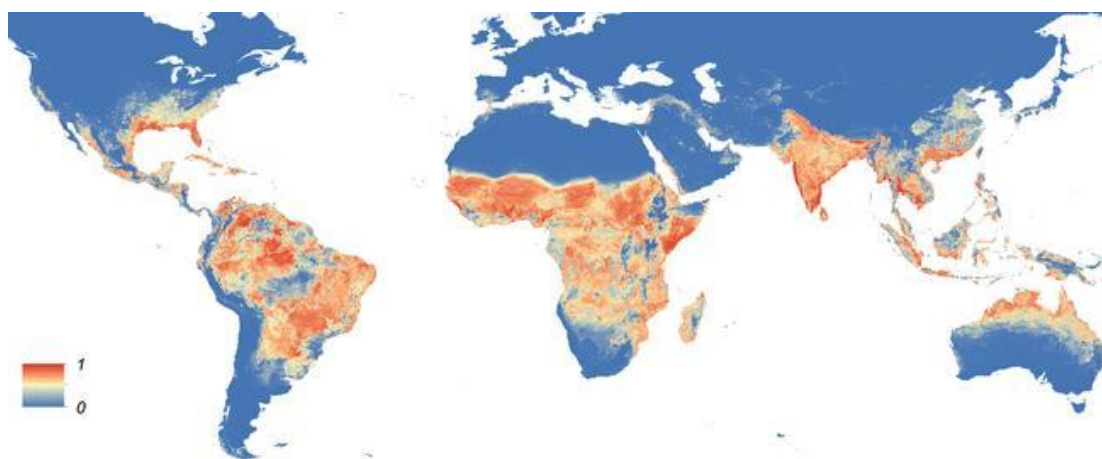


Figura 2. Mapa global da distribuição prevista de *A. aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (a partir de 0 azul para vermelho 1) com uma resolução espacial de 5 km × 5 km. Fonte: <http://elifesciences.org/content/4/e08347/F1> <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.08347.004>



Figura 3. Mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: www.biologia.seed.pr.gov.br

A. aegypti (Figura 2) é um mosquito colonizador de recipientes, colocando os ovos próximos à lâmina d'água. A eclosão é deflagrada por um conjunto de fatores ambientais, os quais combinam fatores abióticos (e.g. umidade e temperatura) e bióticos que garantam a sobrevivência da prole (Livdahl e Edgerly, 1987). O tempo entre o estágio de ovo a adulto em condições favoráveis varia de 10 a 13 dias (Forattini, 1965). Após um período de desenvolvimento embrionário de 48 a 72 horas, as larvas eclodem e passam por quatro estádios de desenvolvimento (L1 a L4), durando em média sete dias. As larvas se alimentam de detritos e microorganismos presentes na água até alcançarem as condições fisiológicas necessárias à pupação, fase na qual os insetos não se alimentam (Figura 3) (Christophers, 1960). A pupação dura de dois a três dias, ao final da qual emergem os adultos, que podem viver até 45 dias (Marques e Miranda, 1992).

As larvas em desenvolvimento competem pelos recursos em um ambiente espacialmente limitado. Estudos experimentais demonstram que a lotação e os recursos limitados estão associados com alta mortalidade larval, aumentando o tempo de maturidade e gerando adultos biologicamente inviáveis, além de fêmeas

menos férteis (Moore e Fisher, 1969; Mulla, 1979; Southwodd *et al.*, 1972). Ao emergirem, as fêmeas adultas copulam e passam a buscar fontes de repasto sanguíneo e locais para oviposição (Christophers, 1960). A fêmea escolhe o local de oviposição dependendo da densidade larval e presença de ovos (Chadee, 2009; Zahiri e Rau, 1998). O comportamento de oviposição é ainda afetado pelas características físico-químicas do criadouro (Bentley e Day, 1989; McCall e Cameron, 1995). As mortes ocorrem principalmente devido a eventos independentes da densidade (e.g. predação e presença de inseticidas) (Bar-Zeev, 1958; Christophers, 1960; Rueda *et al.*, 1990).

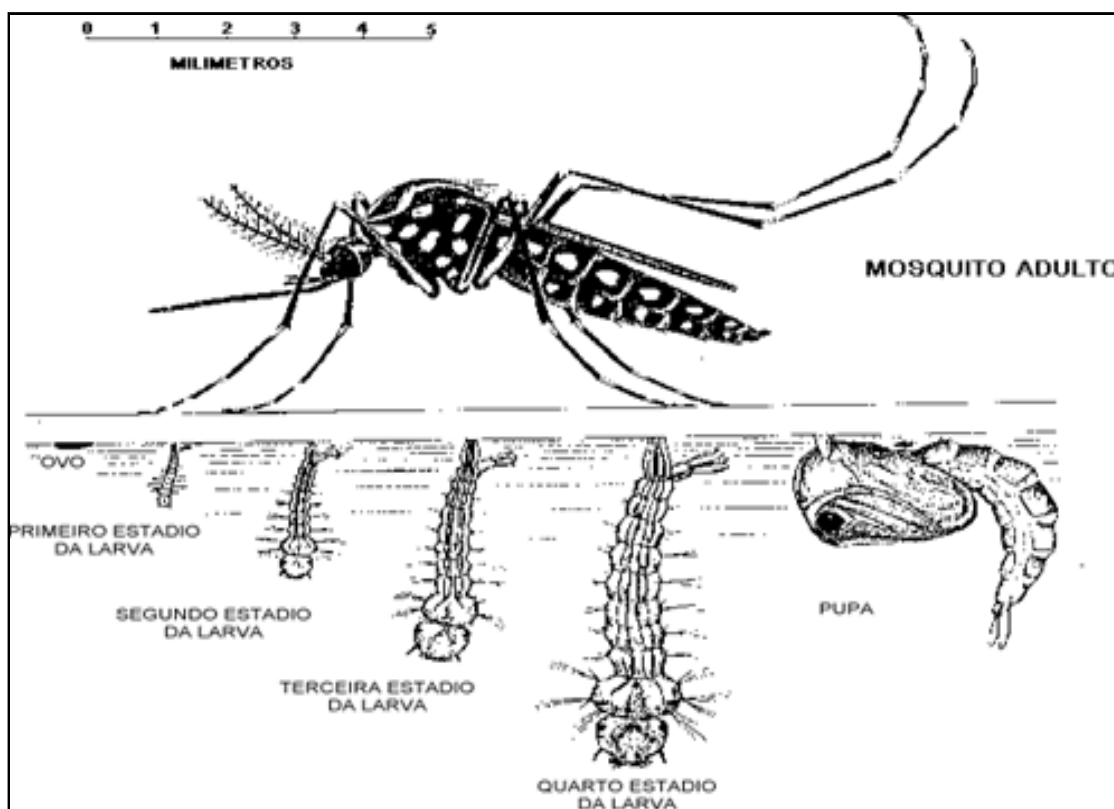


Figura 4. Ilustração do ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Fonte: Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kidengue/epidemiologia/imagens.html>

2.4 *Aedes albopictus* SKUSE, 1894.

O mosquito *Aedes albopictus*, de origem asiática, cuja distribuição original compreendia o sudeste da Ásia, é considerado autóctone na região oriental formada por Australásia, Oceania e Paleártica. A espécie se dispersou para os outros continentes graças ao comércio de pneus usados, sendo agora registrado nas Américas, Europa meridional e África, além de algumas ilhas do pacífico e Havaí (Figura 4)(Hughes e Porter, 1956).

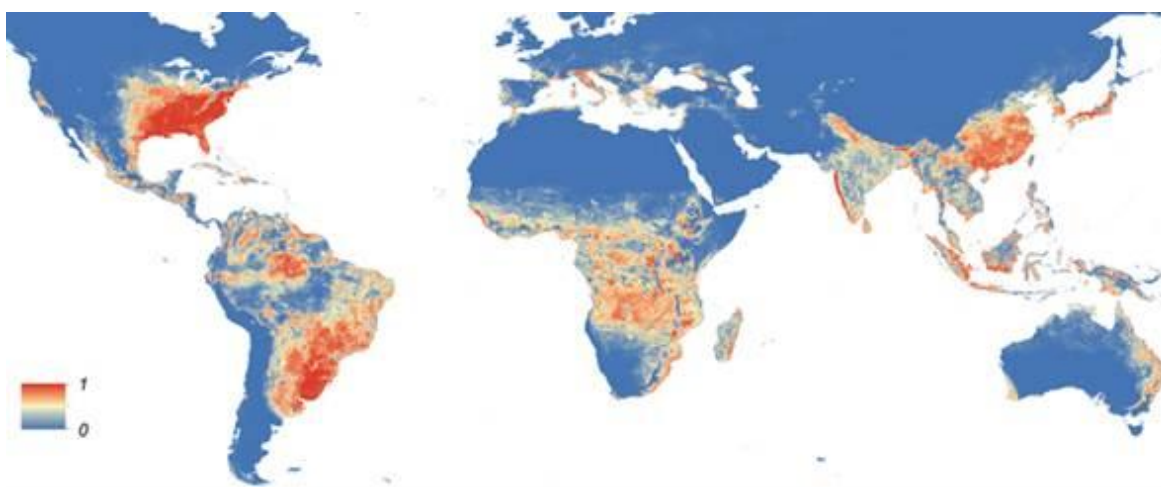


Figura 5. Mapa global da distribuição prevista de *A. albopictus*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (a partir de 0 azul para vermelho 1) com uma resolução espacial de 5 km x 5 km. Fonte: <http://elifesciences.org/content/4/e08347/F6> <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.08347.009>

Aedes albopictus (Figura 6) apresenta grandes semelhanças com *A. aegypti*, tais como: hábitos diurnos e densidade fortemente influenciada pela pluviosidade. Entretanto, exibe algumas diferenças consideráveis, pois se dispersa com facilidade no ambiente rural, semissilvestre e silvestre, sendo habitualmente encontrado em áreas com baixa densidade humana onde *A. aegypti* é inexistente ou raro. Em locais povoados, é mais frequente no peridomicílio. Além da divergência em relação aos habitats preferenciais, observa-se discrepância entre as espécies também quanto ao hospedeiro: *A. albopictus* é mais eclético, sendo o ser humano e aves os seus hospedeiros mais frequentes.

Além disso, esta espécie é capaz de se adaptar às temperaturas frias, tornando-se latente durante o inverno em regiões temperadas (Paupy *et al.*, 2009).



Figura 6 - Da esquerda para a direita *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.
Fonte: Disponível em: <http://fmel.ifas.ufl.edu/>. Acessado em: 19/08/2014.

A. albopictus é um mosquito generalista e que tem demonstrado capacidade de utilizar variados tipos de criadouros naturais (e.g. internódios de bambu, ocos de árvores e cascas de frutas) e artificiais (e.g. pneus, vidros, pratos sob vasos de plantas, recipientes plásticos, etc.), desde que encontre condições favoráveis ao seu desenvolvimento (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1998).

A. albopictus é considerado um vetor secundário da dengue nas Américas (Tauil, 2002), devido a algumas características intrínsecas à espécie, associadas a sua elevada capacidade adaptativa e de dispersão. Este mosquito foi considerado como um vetor experimental de várias arboviroses, dentre elas doenças causadas por flavivírus, tais como: febre amarela, encefalite japonesa, febre do Nilo ocidental, zika vírus e dengue, e alphavirus chikungunya. Em condições laboratoriais, espécimes de *A. albopictus* de Fortaleza, Ceará, demonstraram capacidade de transmitir os vírus da dengue, da febre amarela e

da encefalite eqüina venezuelana (Alencar, 2008). Porém, no país existem até o momento apenas dois registros de mosquitos naturalmente infectados com o vírus dengue nos Estados de Minas Gerais (Serufo *et al.*, 1993) e Ceará (Martins *et al.* 2012).

A. albopictus e *A. aegypti* podem ocorrer simpatricamente em várias áreas, compartilhando, em muitas situações, os mesmos criadouros. A coexistência pode ser uma situação transitória que resultará no deslocamento de uma das espécies. A diminuição ou o deslocamento populacional de espécies residentes tem sido observada em vários países após a introdução de *A. albopictus* (Paupy *et al.*, 2009).

2.5 PRINCIPAIS ARBOVIRUS TRANSMITIDOS POR *Aedes* spp.

As arboviroses são viroses transmitidas por artrópodes. havendo mais de 500 espécies identificadas até agora (Mercado-Curiel *et al.*, 2008). Estes organismos têm RNA como material genético, possuem origem zoonótica e são mantidas em ambiente natural através de complexos ciclos que envolvem os artrópodes hematófagos e os seus hospedeiros, geralmente mamíferos e aves. O ciclo é completo quando vetores não virêmicos se alimentam do sangue de indivíduos infectados, e passam a estar aptos a infectar novos hospedeiros (Figueiredo, 2007).

A competência completa do vetor é determinada não apenas pela sua habilidade de se tornar infectado, mas também por sua capacidade de transmitir o patógeno (Moncayo *et al.*, 2004). Assim sendo, é intrínseco a um vetor adquirir, manter e transmitir um patógeno, embora muitos fatores dificultem a infecção,

disseminação e a transmissão de uma arbovirose através de mosquitos (Xiao-Xia *et al.*, 2013).

2.5.1 VÍRUS DA ENCEFALITE EQUINA

Pertence ao gênero *Alphavirus*, sendo o agente etiológico da encefalite equina, que é uma enfermidade infecto-contagiosa aguda que atinge o sistema nervoso devido a inflamações a nível cerebral, medular e meníngeo. Esta doença acomete equinos (e.g. cavalos, mulos, etc.), humanos e aves. A patologia é desencadeada pela picada do mosquito infectado, geralmente pertencentes ao gênero *Culex* spp. (Bolling, 2011). Contudo, de acordo com Figueiredo (2007), espécies incluídas nos gêneros *Aedes*, *Psorophora*, *Deinocerites* e *Mansonia*, também podem estar envolvidas na disseminação do vírus. Segundo Kotait *et al.* (2006), o homem e o equino são hospedeiros acidentais e não contribuem para a manutenção do vírus, assim como suínos, ovelhas, cães e demais espécies, nas quais o vírus vem sendo identificado.

A técnica semi-nested RT PCR vem sendo utilizada para identificação dos *Alphavirus* tanto em mosquitos, pássaros e em equinos (Silva *et al.* 2011). A prevenção se dá pelo controle de mosquitos e monitoramento de aves migratórias (Brasil, 2007).

2.5.2 VÍRUS DO NILO OCIDENTAL OU DO OESTE DO NILO

O vírus do oeste do nilo (WNV) foi inicialmente identificado em uma mulher com quadro febril na província de Uganda, África, em 1937. A província era denominada *West Nile* (Nilo Ocidental), daí a denominação da doença e do

agente (Hayes et al., 2005). Pertencente à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, o WNV, possuem uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva de 9.5 kilobases, como genoma. Os vírions são esféricos e possuem aproximadamente 50 nanômetros de diâmetro, são sensíveis a detergentes lipídicos e desinfetantes comuns e não resistem muito tempo no ambiente (Lindebach e Rice, 2001). É disseminado pelos vetores às aves, equinos e humanos; nestes últimos, o vírus pode causar a febre do Nilo Ocidental, que tem como principais sintomas a dor de cabeça e a febre, ou meningite aguda ou encefalite. O vírus tem as aves migratórias como reservatórios naturais e já foi encontrado em mais de setenta espécies. Ao migrar, esses animais dispersão o vírus geograficamente, uma vez que, já foi isolado de 43 espécies de mosquitos dos gêneros: *Culex*, *Aedes*, *Coquillettidia*, *Anopheles*, *Mansonia*, dentre outros (Dibo et al., 2011).

O diagnóstico da infecção em aves pode ser feito por sorologia pareada (ELISA), detecção de IgM na fase aguda ou detecção de vírus e ácidos nucleicos virais no encéfalo (Flores e Weiblen, 2008).

O controle da infecção pelo WNV em áreas endêmicas baseia-se no combate aos insetos e na aplicação de medidas para reduzir a exposição de pessoas e animais domésticos aos vetores, além de vacinação de eqüinos (CDC, 2002).

No Brasil, o vírus poderia manter-se em baixas proporções devido à proteção imunológica das aves anteriormente infectadas, bem como à falta de um vetor competente que se alimente do sangue das aves, humanos e cavalos. Todavia um caso da doença foi diagnosticado pelo Ministério da Saúde no Estado do Piauí em novembro de 2014. Na ocasião, outros quatro pacientes

apresentaram sintomas suspeitos, entretanto exames laboratoriais descartaram a possibilidade de febre do Nilo nestes pacientes (Portal Brasil, 2014).

2.5.3 VÍRUS DO VALE “RIFT”

Pertencente à família Bunyaviridae e ao gênero *Phlebovirus*, o vírus foi identificado pela primeira vez no ano de 1931 durante uma investigação epidemiológica em uma criação de ovelhas no Vale do rio Rift no Quênia. O vírus é o agente etiológico da febre do Vale do Rift (VRFV), uma zoonose viral, mas que tem a capacidade de acometer humanos. Além disso, a patologia promove perdas econômicas significativas por conta das mortes e dos abortos causados nos animais por conta da VRFV (WHO, 2014).

A maioria das infecções em humanos é resultante do contato direto e indireto com sangue ou órgãos de animais infectados, uma vez que o vírus pode ser transmitido por meio da manipulação do tecido animal durante o abate, realização de procedimentos veterinários, auxílio ao parto e através da eliminação de carcaças ou fetos. Até então não foi registrada a transmissão de humano para humano, a transmissão ocorre principalmente por mosquitos de gênero *Aedes* spp. infectados (WHO, 2014).

Os hospedeiros primários e principais multiplicadores do vírus da VRFV são ovelhas, cabras e vacas, além do ser humano. A porta de entrada para o VRFV é a pele íntegra, pela qual o mosquito acopla seu aparelho bucal para o repasto sanguíneo e por onde inocula o vírus; e a pele com algum tipo de abrasão ou solução de continuidade, no caso de contato direto com tecidos e fluidos de animais infectados (Chevalier et al., 2010).

O isolamento do vírus é o método diagnóstico padrão ouro para o diagnóstico da VRFV (OIE, 2014). Testes sorológicos comumente usados incluem virusneutralização, ELISA e testes de inibição da hemaglutinação. Imunofluorescência, fixação do complemento, radioimunoensaio e imunodifusão são usados com menor frequência. Reações cruzadas com outros flavovírus podem ocorrer. Outras técnicas laboratoriais, tais como RT-PCR e sequenciamento genético (Xu *et al.*, 2007).

Em relação proteção pessoal, podem ser utilizados repelentes, camisas longas, calças e mosquiteiros com o intuito de prevenir a transmissão pelos mosquitos e outros vetores potenciais. Atividades ao ar livre devem ser evitadas, principalmente durante os períodos de atividade do mosquito. Inseticidas podem ser úteis (Chevalier *et al.*, 2010).

2.5.4 VÍRUS DA FEBRE AMARELA

É uma arbovirose ocasionada por um vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, responsável por causar hepatite grave e febre hemorrágica em cerca de 10% dos pacientes. Baseando-se na similaridade entre os genomas africanos e sul-americanos sugere-se que, originalmente, como um vírus de origem africana, que foi disseminado na América do Sul nos últimos 500 anos, através dos navios negreiros e de comércio do Caribe e da América do Norte. No Brasil, o vírus desencadeou grandes epidemias da doença, sobretudo no litoral. Tornando-se um importante problema de Saúde Pública no Rio de Janeiro, onde 50.000 pessoas morreram entre 1850 e 1909. A patologia foi considerada erradicada na década de 1930 (Figueiredo, 2007).

A arbovirose é transmitida ao homem através de mosquitos infectados dos gêneros *Aedes*, *Sabethes* e *Haemagogus*, podendo haver ciclos silvestre e urbano. Ambos não diferem etiológica, clínica, imunológica nem fisiopatologicamente. Contudo, o ciclo urbano caracteriza a patologia como uma antroponose, no qual nenhuma espécie animal de importância epidemiológica está envolvida. A febre amarela tem *A. aegypti* como principal vetor, tanto no continente Africano quanto na América do Sul (Tauil, 2010).

Estima-se que pelo menos 90% dos casos de febre amarela com expressão clínica sejam das formas classificadas como leve e oligossintomática, raramente diagnosticadas e que somente 10% sejam das formas graves associadas com elevada letalidade (Vasconcelos, 2000).

O método mais eficaz para se prevenir a febre amarela é a vacinação. Outro procedimento que pode prevenir a ocorrência da febre amarela é o combate aos vetores e o uso de medidas de proteção individual. O combate aos vetores silvestres é inviável, restando o combate ao vetor urbano, *Aedes aegypti* (Galler *et al.*, 2001).

2.5.5 VÍRUS CHIKUNGUNYA

O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um alphavírus da família *Togoviridae*, de origem africana, e foi descrito pela primeira vez em 1950 na Tanzânia. A partir de 1952 se espalhou por várias ilhas ocorrendo nas ilhas do Oceano Índico desde 2005, de onde vem promovendo a doença febril aguda com grande artralgia nos pacientes, além de casos com meningoencefalite (Figueiredo, 2007). Gestantes infectadas com o vírus no período perinatal podem transmiti-lo ao recém-nascido via transmissão vertical. Neste período as chances da mãe transmitir o vírus ao

filho podem chegar a 85%, resultando formas graves em 90% dos recém-nascidos. O parto cesariano não garante a não transmissão do vírus, sendo que este não é transmitido por meio do aleitamento (Ministério da Saúde, 2014). Em 2014, o Estado de Pernambuco notificou, em quatro municípios, 23 casos suspeitos de Chikungunya, sendo 4 confirmados. No ano de 2015, notificou 105 municípios com 2.605 casos suspeitos de Chikungunya, sendo 450 casos confirmados. Até então, nenhum caso foi confirmado em Serra Talhada (SES-PE, 2015).

O CHIKV é transmitido pelo *A. aegypti* e por *A. albopictus*, sendo o primeiro seu principal vetor, e a transmissão, por sua vez, ocorre através da picada do mosquito infectado. A febre chikungunya constitui um importante problema de saúde pública mundial (Figueiredo, 2007). Existe, ainda, o risco de estabelecimento de um ciclo enzoótico da Chikungunya macaco-mosquito no Brasil impossibilitando a erradicação da doença no país (Donalísio e Freitas, 2015).

A Febre de Chikungunya pode não ter as manifestações típicas ou pode coexistir com outras doenças infecciosas e não infecciosas. Por isso, o diagnóstico diferencial deve levar em consideração os aspectos epidemiológicos, tais como local de residência, histórico de viagens e de exposição (Brasil, 2009).

Um programa operacional de controle efetivo para o vetor transmissor da dengue fornece as bases para uma preparação adequada contra o CHIKV, uma vez que ambos os vírus são transmitidos pelo mesmo mosquito, o *Aedes aegypti* (OPAS, 2014). Portanto, para responder à introdução do vírus chikungunya, recomenda-se utilizar e intensificar as ações de vigilância e controle do vetor, desenvolvidas para a dengue, conforme preconizado nas “Diretrizes Nacionais

para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue” (Brasil, 2009), que seguem os preceitos estabelecidos pela Estratégia de Gestão Integrada da Dengue nas Américas (EGI-dengue).

2.5.6 VÍRUS ZIKA

Vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus assim como os vírus da febre amarela, dengue, Nilo Ocidental, e vírus da encefalite japonesa. Foi isolado pela primeira vez em 1947, a partir de amostras de macacos usados como sentinelas para a detecção da febre amarela, na Floresta Zika, em Uganda. Ele é considerado endêmico no leste e oeste do continente africano e há registro de circulação esporádica também na Ásia e na Oceania (Brasil, 2015).

Em 2007, ZIKV causou um surto de doença relativamente leve caracterizada por erupções cutâneas, artralgias e conjuntivite na Ilha Yap no sudoeste do Oceano Pacífico. Esta foi a primeira vez que ZIKV foi detectado fora da África e da Ásia. A história, dinâmica de transmissão, virologia, e manifestações clínicas da doença de ZIKV podem se confundir com outras doenças tal como chikungunya e dengue (Hayes, 2009).

O ZIKV é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *A. Albopictus*, existindo também a possibilidade de transmissão pela via sexual, por transfusão sanguínea e neonatal, embora não se saiba o real protagonismo dessas vias de transmissão na propagação da infecção (Luz *et al.*, 2015).

Em maio de 2015, a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), confirmou o primeiro caso no Brasil (Figura 7)(CDC, 2016). Até 2 de janeiro de 2016, foi notificado à Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) um total de 3.174 casos suspeitos de microcefalia relacionada à

especificidade em regiões onde circulam diferentes flavivírus e, nesse contexto, o RT-PCR assume grande relevância (Zanluca *et al.*, 2015).

Em virtude da proliferação do mosquito ser diretamente proporcional às péssimas condições sanitárias do nosso país, e dengue, chikungunya e ZIKV compartilharem o mesmo vetor, o Estado deve implementar medidas efetivas para o controle da doença, com especial enfoque na educação da população a fim de prevenir surtos epidêmicos (Luz *et al.*, 2015).

2.5.7 VÍRUS DENGUE

O vírus Dengue (DENV), é um flavivírus, família *Flaviviridae*, com 4 sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, representa um grave problema de Saúde Pública, principalmente para as regiões tropical e subtropical de todo o mundo (WHO, 2010). Os quatro sorotipos de vírus dengue (DENV) causam 100 milhões a 500 milhões de novas infecções a cada ano em mais de 100 países, resultando em 40 milhões de casos clinicamente aparente e 20.000 mortes (Dengue Vaccine Initiative, 2012).

O RNA genômico é aproximadamente 11 kb de comprimento e é composto de três genes que codificam proteínas estruturais: o nucleocapsídeo ou a proteína principal (C), uma proteína associada a membrana (M), uma proteína de envelope (E), e sete genes de proteínas não estruturais (NS). A ordem dos genes é 5'-CprM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', como para outros flavivirus (Rice *et al.*, 1985; Deubel *et al.*, 1988; Chambers *et al.*, 1990; Leyssen *et al.*, 2000).

O DENV tem como seu principal vetor o mosquito *A. aegypti*, mosquito que utiliza criadouros artificiais, sendo favorecido pela falta de abastecimento regular

de água, ausência da coleta de resíduos sólidos e principalmente, pela falta de mobilização comunitária (WHO, 2010).

Em 2011, o Estado de Pernambuco registrou os dois primeiros casos de dengue com o sorotipo 4, ambos em Serra Talhada onde também circula o sorotipo 1, que estava ausente a 20 anos, o que aumentou o risco de febre hemorrágica da dengue (FHD) (SES-PE, 2015). Em 2015, Pernambuco notificou 146.089 casos, distribuídos em seus 185 municípios. Ao todo confirmaram-se 51.776 casos de dengue, com 31 óbitos. O maior agravante é fato da circulação dos quatro sorotipos do vírus, que aumenta a incidências das formas mais graves da doença (SES – PE, 2016).

2.6 IMUNOPATOLOGIA DA DENGUE

Ao entrar em contato com a pele o DENV, e possivelmente outros vírus transmitidas por artrópodes, pode infectar a pele humana células de Langerhans. Embora se tenha apenas um único caso descrito de célula dendrítica (DC) da pele infectados por DENV *in vivo*. Neste caso, a infecção de DC por DENV foi substancialmente mais eficiente do que a infecção de macrófagos ou linfócitos, e ocorreu na ausência de anticorpo contra DENV, indicando que DCs de pele são provavelmente o alvo inicial da infecção por DENV na transmissão por artrópodes para os seres humanos (Wu *et al.*, 2000).

Estima-se que um terço da população mundial esteja em risco de contrair o vírus da dengue (Umareddy *et al.*, 2008). Muitos são os fatores que estão relacionados à resposta imune contra o vírus dengue (DENV), principalmente o estado imunológico do paciente. Além disso, características genéticas do hospedeiro podem interferir diretamente no desenvolvimento da doença.

Entretanto, a carga viral *in vivo* parece ser importante, pois é significativamente maior em pacientes com FHD/SCD do que naqueles com FD (Libraty *et al.*, 2002; Vaughn *et al.*, 2000). A análise epidemiológica dos focos DENV (1997 e 2001) em uma área endêmica cubana mostrou que pessoas de diferentes raças têm diferentes morbidades e sintomas após a infecção DENV (Kouri *et al.*, 1998; De la C Sierra *et al.*, 2007).

A gravidade ou a frequência de uma resposta alterada da dengue depende de: 1) sequência de tipos de vírus encontrados pelo indivíduo; infecções secundárias com dengue sorotipo 2, envolvido com a prevalência de SCD, resultando em uma maior proporção de choque para o total de infecção secundária do que outros sorotipos de vírus, (Halstead *et al.*, 2001) e 2) o intervalo entre induzir e sensibilizar a infecção, provavelmente ocorre a um mínimo de 3 meses e um máximo de 5 anos (Fischer e Halstead, 1970; Halstead, 1965).

Para explicar estas observações sobre a patogênese do DENV, tem sido proposto um processo chamado facilitação dependente de anticorpo (ADE) (Halstead, 1988). Duas outras hipóteses dominantes envolvem reação cruzada de células T memória e sorotipo (Rothman, 2011) e virulência viral (Rico-Hesse, 2007). Estes três processos não mutualmente exclusivos, são postulados por aumentar a carga viral e engatilhar a alta produção de citocinas e ativação do sistema complemento resultando em FHD/SCD. Porém, o mecanismo preciso de patogênese de FHD/SCD e a relação entre carga viral, alta produção de citocinas e ativação do complemento são incertos. Além disso, fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar na patogênese da doença, como o polimorfismo presente em vários genes de resposta imune de hospedeiros (Coffey *et al.*, 2009).

De acordo com a hipótese de Halstead (1970), a alteração da resposta imunológica do hospedeiro a um vírus com uma maior massa antigénica total ou complexado com uma gama mais vasta de anticorpos heterólogos de dengue pode gerar uma reação de sensibilização mais alta do que os vírus sem esses atributos. De fato, pouco se sabe sobre o mecanismo da imunidade anti-DENV, e a maioria dos estudos tem focado em examinar a função do sistema imune por meio da interação DENV- complemento no contexto da patogênese de FHD/SCD (Shresta, 2012).

As lesões do sistema vascular na FHD são notáveis por falta de resposta inflamatória. Ocasionalmente, é observada necrose do endotélio vascular, embora, as membranas basais sejam preservadas. Além disso, a infiltração perivascular com células mononucleares ou neutrófilos raramente ocorre. Em estudos com pacientes da Tailândia, trombos ou trombos de plaquetas são observados apenas raramente (Bhamarapravati *et al.*, 1968).

Os mecanismos exatos de condução do vazamento vascular profundo que ocorre em pacientes com SCD não são claros, embora fatores imunológicos do hospedeiro tenham sido repetidamente citados (Rothman, 2004). O realce anticorpo dependente (ADE) de replicações virais é a explicação mais amplamente aceita para as associações entre FHD e anticorpos preexistentes. (Simmons *et al.*, 2007).

Uma hipótese alternativa propõe que a resposta imune inata inicial e em particular a resposta de interferon tipo I (IFN) pode determinar a subsequente resposta e início clínico (Umareddy *et al.*, 2008). O IFN protege as células de uma nova infecção da dengue, mas não tem efeito na infecção estabelecida, indicando que a replicação da dengue produz um antagonista de IFN (Diamond *et al.*, 2000).

Todos estes estudos indicam que a resposta de IFN é de algum modo, prejudicada, facilitando assim o estabelecimento da infecção por dengue no hospedeiro (Umareddy *et al.*, 2008). No entanto, nos eventos provocados tais como anticorpos específicos para DENV ou de reação cruzada, os linfócitos T, e um grande número de citocinas pode não resultar na proteção, mas em vez disso os resultados patológicos graves que podem participar na patogênese da DENV (Mathew e Rothman, 2008).

O linfócito T CD8+ como toda célula T citotóxica pode matar células infectadas pelo DENV (Yauch *et al.*, 2009). Porém, os linfócitos T memória CD8+ reativos-cruzados de uma infecção primária pode alterar a produção/atividade das citocinas e resposta immune do hospedeiro durante a infecção secundária heteróloga de DENV (Fang *et al.*, 2012).

Desde a existência de anticorpos que apareceram na infecção primária do DENV, a imunoglobulina G (IgG) reativa-cruzada pode ser prontamente detectada no primeiro dia de uma infecção secundária de DENV (Fang *et al.*, 2012).

As infecções anticorpo-realçadas necessitam de um evento imunológico inicial, chamado sensibilização, que ocorrem de três maneiras: 1) infecções primárias ocorridas naturalmente por vírus heterotópicos do mesmo gênero (grupo 1), 2) infecção por vírus que criam diversidade antigênica pela evolução rápida de variantes biológicos ou antigênicos durante o curso de uma infecção crônica (grupo 2), e 3) imunização que resulta na imunidade protetiva incompleta (grupo 3). Os quatro sorotipos do DENV estão incluídos no grupo 3 (Kimman *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 1996; Halstead, 1982; Tirado e Yoon, 2003).

Em humanos, as infecções severas de vírus dengue seguem um estereotipo; sinais tais como anoxia, choque e hemorragia gastrointestinal

acompanhada de uma rápida perda de fluido dos compartimentos vasculares devido a permeabilidade capilar (Cohen e Halstead. 1966). Durante os estudos de mecanismos patogênicos, esforços consideráveis tem sido direcionados na aferição de níveis de citocinas no sangue em pacientes tardios durante a fase aguda da dengue, apenas antes dos primeiros sinais de choque (Figura 8)(Bethell *et al.*, 1998).

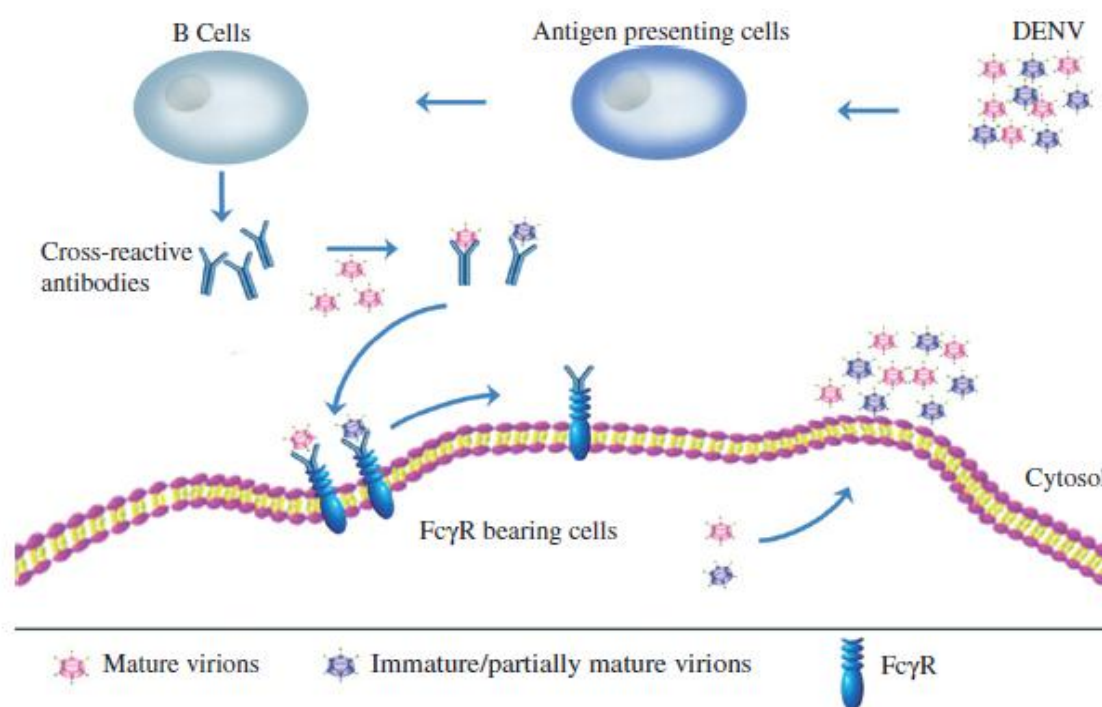


Figura 8. Principais mecanismos propostos para descrever este realce: um é a supressão da resposta antiviral mediada por interferon pela superegulação de reguladores negativos e a outra é a polarização da citocina tipo Th 2 despertada pela ativação de IL-10. A entrada o vírus é detectada pela célula apresentadora de antígeno que estimula as células B a produzir anticorpos de reação cruzada que se ligam aos vírus e são capturados pelos macrófagos (Boonnak *et al.*, 2011).

A replicação do vírus deve ocorrer da seguinte maneira: primeiro o DENV intracelular libera o seu RNA para sintetizar e produzir novas partículas de DENV. O antígeno do vírus é transportado através do lúmen do retículo endoplasmático pelo transportador associado processante de antígeno (TAP), o único transportador ABC conhecido na membrana do retículo endoplasmático (Lorente *et al.*, 2012).

2.6.1 Citocinas

As citocinas são pequenas moléculas proteicas sinalizantes que são secretadas por inúmeras células e trabalham ativamente na comunicação intercelular. As funções biológicas de citocinas são complexas, longas e sobrepostas (sinergista ou antagonista). Em pacientes com FD, por exemplo, o IL-1a circulante aumentado pode exercer ações antipiréticas em um esforço para contra-atacar as concentrações já aumentadas de IL-1b. O CXCL10/IP-10 foi confirmado como um forte marcador pro-inflamatório (De-Oliveira-Pinto *et al.*, 2012).

Os fatores imunológicos do hospedeiro atuam na febre hemorrágica da dengue (FHD) e/ou síndrome de choque da dengue (SCD), uma vez que a doença severa ocorre mais frequentemente em indivíduos que experimentam a infecção secundária pelo vírus dengue (Rothman e Ennis, 1999).

Os níveis aumentados no soro de IL-6 e IL-8 são positivamente correlacionados com a dose infecciosa do DENV e tem promovido efeitos no desenvolvimento inicial de FHD (Huang *et al.*, 2000).

Vários estudos demonstraram que camundongos que não possuem tanto o IFN-a/b como o receptor IFN-c sucumbem na infecção primária de DENV, enquanto que seus antagonistas do tipo selvagem sobrevivem. O IFN-c tem sido provado por ser efetivo para ajudar na remoção do DENV em humanos pela suprarregulação da expressão de moléculas HLA. Ademais, os níveis IFN sustentaram durante a fase aguda da infecção por DENV mostrando função protetora (Figura 9)(Gunther *et al.*, 2011).

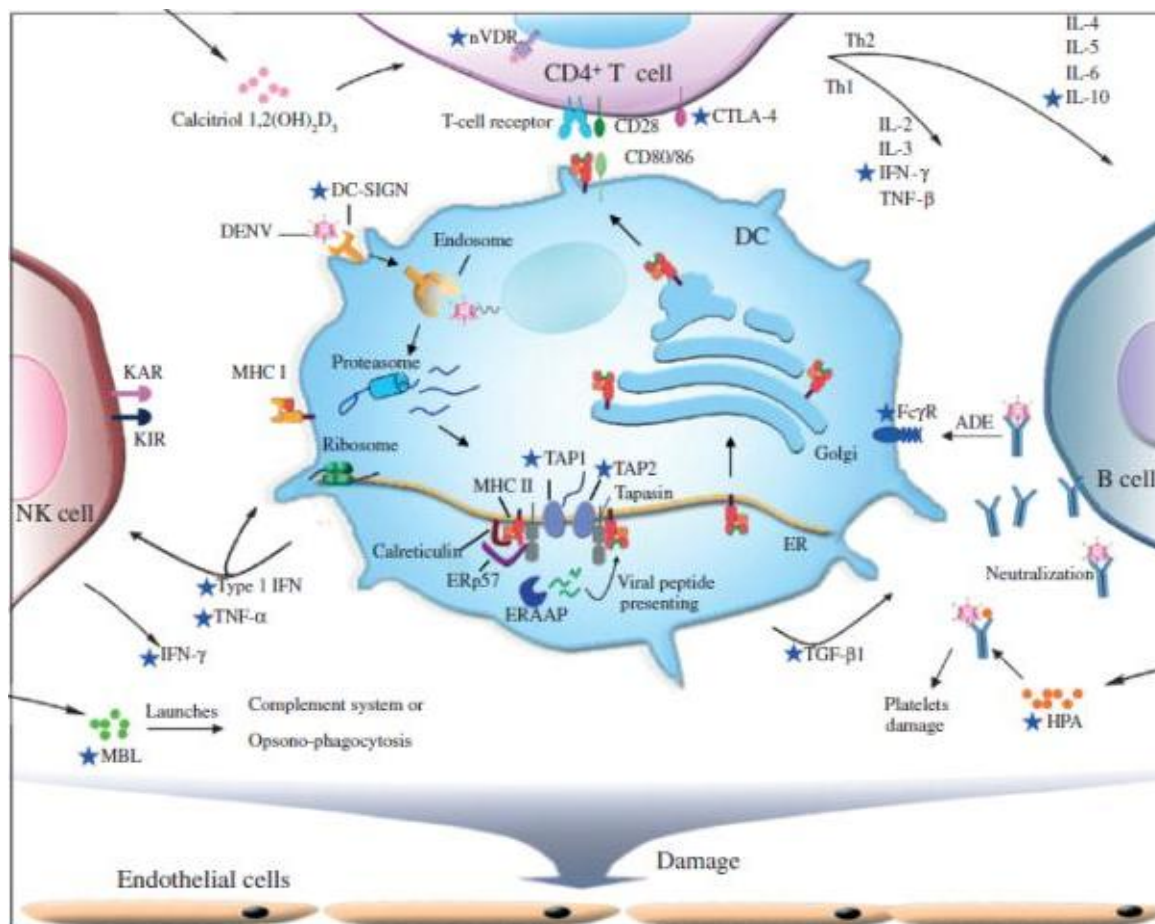


Figura 9. Visão geral dos eventos imunes chave após infecção do DENV. O DENV se liga ao DC-SIGN, o receptor viral na superfície das DCs, para mediar a entrada. Então as células NK e MBL, como defensores iniciais, rapidamente tomam medidas para matar as células infectadas. No entanto, haveriam algumas células infectadas que escaparam, na qual poliproteínas DENV sintéticas podem ser processadas em peptídeos e subsequentemente acessar o antígeno processante e programar a apresentação. Depois, o linfócito T CD4+ pode ser ativado e diferenciado para promover as respostas de Th1 e Th2 para exercer seus efeitos complexos adversos. A migração de células Th1/Th2 pode ser direta ou indiretamente regulada pelo calcitriol 1,25-(OH)₂D₃ pela ligação com nVDR. As células B podem produzir diversos anticorpos com a ajuda de Th2 relacionados a citocinas. Os anticorpos têm três tipos de efeitos: ADE, neutralização e danos a plaquetas (quando ligados com HPA). O mecanismo imune patogênico do DENV aqui considera estes eventos imunes do hospedeiro para permitir o dano às células endoteliais, o aumento da permeabilidade vascular e finalmente sintomas hemorrágicos. As estrelas azuis representam moléculas imunes estratégicas na qual o polimorfismo do locus tem sido associado com a patogênese do DENV (Fang *et al.*, 2012).

Os linfócitos T CD4+ são usualmente divididos entre dois subconjuntos antagônicos, mas reativo-cruzados: as células T helper (Th) 1 e 2. O equilíbrio de células Th1/Th2 é relevante para o surgimento das doenças tais como na infecção por DENV (Fang *et al.*, 2012).

2.6.1.1 Interleucina 4 (IL - 4)

Em resposta a patógenos, as células T CD4⁺ se diferenciam em células efetoras Th1 e Th2. As células Th1 produzem IL-2, IFN γ e TNF β , os quais estão envolvidos nas reações inflamatórias mediadas por células. As células Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, os quais mediam a ativação das células B, produção de anticorpos e regulação de respostas de Th1 (Paul e Seder, 1994).

No entanto, o mais efetivo indutor de diferenciação de células T CD4⁺ parecem ser os ambientes de citocinas locais. É evidente que a citocina IL-12 dirige a diferenciação para um fenótipo Th1 (Hsieh *et al.*, 1993; Seder *et al.*, 1993), enquanto IL-4 guia a diferenciação para um fenótipo Th2 (Le Gros *et al.*, 1990; Swain e Weinberg, 1990).

As funções efetoras de IL-4 são importantes na resposta imune para uma variedade de infecções e estão também claramente implicados na patogênese de doenças atópicas (Abbas *et al.*, 1996). Nestas condições, as funções de IL-4 em parte por sua habilidade de induzir mudanças em células B classe IgE. O IL-4 também atua na função de baixa regulação de resposta imune que conduz a uma redução da rejeição de aloenxertos (Davies *et al.*, 1996; Donckier *et al.*, 1995) e na prevenção ou melhoria de doença autoimune experimental (Tominaga *et al.*, 1998; Calcinaro *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1996; Rabinovitch *et al.*, 1995; Rapoport *et al.*, 1993).

2.6.1.2 Interleucina 10 (IL-10)

A interleucina-10 é uma glicoproteína de 18 kDa (Fiorentino *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1993), inicialmente identificada como um produto de células Th2 e que tem subsequentemente, sido mostrada por ser produzida por uma ampla variedade de tipos de células, incluindo células Th1, células Tr1, células B, monócitos, macrófagos, queratinócitos, e muitas células tumorais (Moore *et al.*, 1993; Del Prete *et al.*, 1993; O'Garra *et al.*, 1992; de Waal-Malefyt *et al.*, 1991; Enk e Katz, 1992; Gastl *et al.*, 1993; Groux *et al.*, 1997).

O balanço entre inflamação e anti-inflamação é crítica para o controle de infecção (Couper *et al.*, 2008; Wilson e Brooks, 2011). A IL-10, que foi originalmente chamada de fator inibidor de síntese de citocina, é uma citocina que é produzida por células T *helper* tipo 2 (Fiorentino *et al.*, 1989). A IL- 10 exibe propriedade anti-inflamatórias, incluindo a inibição de secreção de mediador imune, apresentação de antígeno e fagocitose (Jung *et al.*, 2004).

Altos níveis de citocinas proinflamatórias e imunomodulatórias, incluindo a IL-10, estão associados com doenças severas (Green *et al.*, 1999). Evidências indiretas sugerem que citocinas mediam a permeabilidade vascular do vírus dengue. Infecções anticorpo-realçadas são um fator de risco para o agravamento da dengue (Kliks *et al.*, 1989). A viremia realçada tem sido mostrada por ser uma correlação antecipatória da doença severa (Libraty *et al.*, 2002; Vaughn *et al.*, 2000). Recentes estudos de patologia de tecidos humanos, tem estabelecido firmemente a função central de monócitos, macrófagos e células dendríticas madura e imaturas como células alvo infectadas (Balsitis *et al.*, 2009, Durbin *et al.*, 2008, Jessie *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2000).

A IL-10 pode inibir uma variedade de funções efetoras de macrófagos, incluindo óxido nítrico (Gazzinelli *et al.*, 1992) e produção intermediada de oxigênio reativo (Cenci e Bogdan, 1991) e expressão de antígenos do principal complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) (de Waal *et al.*, 1991; de Waal *et al.*, 1991).

Além disso, a síntese de citocinas pró-inflamatórias por uma ampla variação de células, particularmente monócitos e macrófagos, é profundamente inibida por IL-10 (Moore *et al.*, 1993).

As baixas expressões do fator de transcrição Th1(T-bet) e maiores níveis de citocinas (interleucina-10, IL-10) em população do sul de Taiwan estão associados com a patogênese de FHD (Chen *et al.*, 2005).

2.6.2 Receptor de quimiocina CCR5

A CCR5 é uma proteína com 352 aminoácidos com uma estrutura básica que é consistente com outros membros dos sete receptores da superfamília transmembrana G proteína-acoplada (GPCR) (Figura 10). Ela consiste de três *loops* (ECL1, ECL2 e ECL3) e o termino N, os quais são envolvidos na ligação em quimiocina, e três *loops* intracelulares e o termino C, os quais participam no sinal de transdução proteína-mediada G. (Strizki *et al.*, 2001). Trata-se de um receptor de quimiocina presente principalmente nas células do sistema imune, tais como macrófagos e linfócitos T, agindo principalmente na migração destas células para sítios de inflamação. O nome oficial deste gene é receptor de quimiocina (motivo C-C) 5 (Chemokine C-C motif receptor 5), mas CCR5 é o símbolo oficial do gene (GHR, 2008), que está localizado na região p21.3 do cromossomo humano 3,

formando um grupo com outros genes de receptores de quimiocinas (Liu *et al.*, 1996).

A CCR5 foi primeiro isolado como um GPCR funcional que é antagonizado por três quimiocinas CC (Combadiere *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996), sendo uma das últimas a ser descoberta de várias outras quimiocinas CC (Blanpain *et al.*, 1999).

Uma deleção de 32 pb em CCR5 origina um códon de parada resultando em uma proteína truncada, não expressada na superfície da célula, que é associada com a resistência a infecções em indivíduos homozigotos e retardo a progressão da doença em indivíduos heterozigotos. A distribuição do alelo e genótipo CCR5 Δ 32 varia entre diferentes áreas geográficas e tem sido relatada por ser rara na África onde a epidemia de HIV-1 exibe um rápido crescimento (Martinson *et al.*, 1997).

Em *Homo sapiens* CCR5-deficiente (CCR5 $^{-/-}$) são representados em 2 a 3% de brancos (O'Brein e Moore, 2000). A falta de expressão de CCR5 nestes indivíduos é causada pela ocorrência natural da deleção de 32 pares de bases no gene CCR5. Os indivíduos que são homozigotos para o alelo mutante CCR5 são altamente resistentes a infecção pelo HIV-1. O alelo mutante não está associado com qualquer fenótipo obvio. Embora a homozigosidade para a mutação CCR5 Δ 32 esteja claramente associada com a resistência a infecção por HIV-1 tem sido relatada em pacientes hemofílicos (O'Brien *et al.*, 1997) e vários indivíduos CCR5 $^{-/-}$ (Balotta *et al.*, 1997; Biti *et al.*, 1997; Theodorou *et al.*, 1997; Michael *et al.*, 1998; Kuipers *et al.*, 1999; Gorry *et al.*, 2002; Sheppard *et al.*, 2002).

Libert *et al.* (1998), avaliando a frequência alélica de CCR5 Δ 32 em 18 populações europeias, observou um gradiente Norte-Sul, com frequências maiores nas populações Finlandesas (16%) e Mordivianas e menores na Sardenha 4%). Além disso, propuseram que o alelo CCR5 Δ 32 tenha sua origem em um único evento de mutação no nordeste da Europa a poucos milhares de anos atrás. Segundo Stephens *et al.* (1998), uma possível pressão de seleção, exercida por patógenos como *Yersinia pestis* (o agente etiológico da peste bubônica), *Shigella*, *Salmonella*, e *Mycobacterium tuberculosis*, ou por alguma outra infecção tal como sífilis, varíola e gripe, justificaria a alta frequência de CCR5 Δ 32 encontrada em Europeus.

Os níveis de expressão de CCR5 podem variar em indivíduos sem afetar a função imune (Hogan e Hammer, 2001). Dependendo do número de receptores expostos, pois tem sido descritos baixa e alta expressão de CCR5 (Reynes *et al.*, 2000). Esta variação em níveis de expressão CCR5 entre indivíduos reflete fatores genéticos assim como estímulos ambientais, tal como relatado em um estudo comparativo que observou maiores níveis de expressão de CCR5 e ativação imune em sujeitos europeus e africanos residentes na África – possivelmente devido a infecções parasíticas – mais do que em coorte do mesmo grupo étnico residindo na Europa (Clerici *et al.*, 2000).

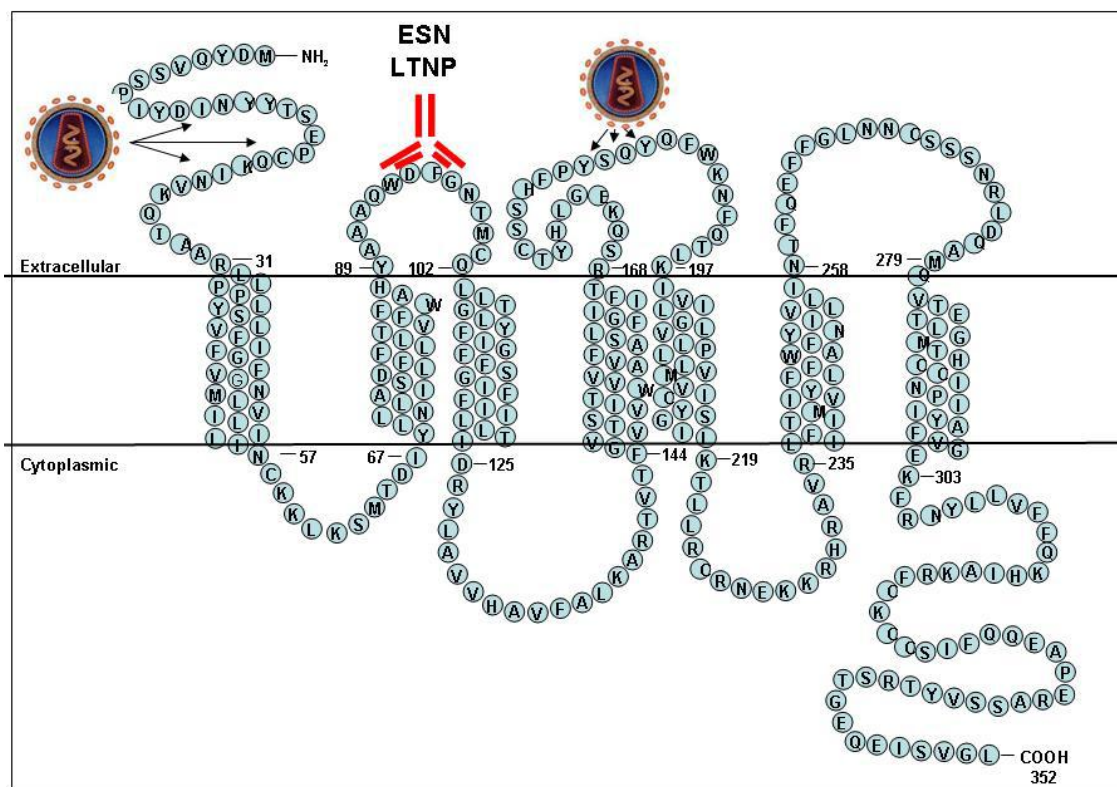


Figura 10. Estrutura do correceptor de membrana CCR5, são indicados os domínios ligantes de HIV (domínio N-terminal e ECL2) e o ECL1.

2.6.3 Ly-6 (antígeno de linfócito 6)

O complexo principal de histocompatibilidade humana (MHC), localizado no cromossomo 6p21.3, tem aproximadamente 4 Mb de comprimento. Ele consiste de três regiões: a classe I e a classe II, flanqueando a classe III central. A região da classe III tem 0,9 Mb de comprimento e contém 62-64 genes e 2-3 pseudogenes, dependendo do haplótipo (Xie *et al.*, 2003; Milner e Campbell, 2001). Dentre estes, encontra-se os genes da superfamília do antígeno de linfócito 6, cuja sigla em inglês é Ly-6.

Os membros da superfamília Ly-6 são ricos em cisteína, geralmente com GPI ancorados, estas proteínas de superfície celular tem papéis definidos ou relacionados ao estado imune (Stroncek *et al.*, 2004). Os genes de Ly-6 da região da classe III de MHC, Ly6g5B e Ly6G6D mostraram um comportamento particular

na regulação de sua expressão, envolvendo um evento de retenção de intron (Mallya *et al.*, 2002).

Com relação à nomenclatura alfabética dos membros da superfamília Ly-6, um novo gene humano recebeu a sigla Ly-6k. Este novo gene é um típico membro da família com as características conservadas de Ly-6. Assim como outros antígenos Ly-6, o Ly6k tem 10 resíduos de cisteínas em uma posição conservada e ancora uma sequência que teoricamente determina a ancoragem de GPI (Dalen *et al.*, 2003).

Estudos anteriores definiram precisamente os padrões de splicing alternativos de um grupo de cinco genes da superfamília de antígeno de linfócito 6 (Ly-6) (Mallya *et al.*, 2002) e caracterizaram a expressão das proteínas correspondentes (Mallya *et al.*, 2006).

O gene *Ly-6* produz um grupo de aloantígenos relatados primeiramente em linfócitos de camundongos na década de 1970 (McKenzie *et al.*, 1977). Um conjunto de dados gerados com anticorpos policlonais e monoclonais contra proteínas Ly-6 revelaram uma ampla expressão tecidual em células de origem hematopoiéticas. Além disso, a expressão de proteínas Ly-6 também tem sido observada em células não-hematopoiéticas (Halloran *et al.*, 1981).

Alguns dados recentes sugerem que as proteínas Ly-6 regulem os processos de sinalização iniciado pelo receptor de antígeno em linfócitos (Henderson *et al.*, 2002; Stanford *et al.*, 1997). Similarmente, as proteínas Ly-6 também tem sido relatadas por regular a sinalização em células não linfoides através de seu receptor celular tipo-específico (Choi *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2001; Miwa *et al.*, 1999). Um número de proteínas Ly-6 de camundongos e humanos participa no processo de adesão célula-célula (Bamezai e Rock, 1995; Brakenhoff *et al.*, 1995; Classon e Boyd, 1998; Hanninen *et al.*,

1997) pela fixação de seus ligantes (Apostolopoulos *et al.*, 2000; Classon, 2001; English *et al.*, 2000; Pflugh *et al.*, 2002). Algumas proteínas Ly-6 também são conhecidas por regular a adesão de células mediada por integrinas (Hanninen *et al.*, 1997). Ainda é desconhecida a função que a proteína Ly-6 pode exercer em um estágio desenvolvimental preciso ou de ativação de células imunes (Bamezai, 2004).

Embora os antígenos murinos de Ly6 tenha sido originalmente identificados como marcadores hematopoieticos, a expressão do gene murino ThB demonstrou ser maior em queratinócitos do que em linfócitos (Brakenhoff *et al.*, 1995).

Dalen *et al.* (2003) observaram que muitos dos genes humanos Ly-6 são expressos em células escamosas. Uma função na adesão de células nos queratinócitos e sinalização de células, tem sido descrito anteriormente para o antígeno E48 (Brakenhoff *et al.*, 1995; Schrijvers *et al.*, 1991; Eshel *et al.*, 2000; Eshel *et al.*, 2002), indicando que os antígenos Ly-6 podem atuar na adesão e sinalização de células nos queratinócitos (Dalen *et al.*, 2003).

De acordo com a análise primária de vírus da febre amarela, Ly-6E conferiu um impressionante aumento de 75% na frequência da infecção, um fenótipo que pode correlacionar com estudos de Ly-6E na suscetibilidade de galinhas ao vírus da doença de Marek (Liu *et al.*, 2003) e de adenovírus de camundongos (Spindler *et al.*, 2010).

As proteínas Ly-6A e Ly-6C afetam o desenvolvimento de linfócitos, ativação, adesão e retorno ao local de origem (Cray *et al.*, 1990; Hanninen *et al.*, 1997; Flood *et al.*, 1990; Bamezai *et al.*, 1995). Além disso, a suprarregulação de proteínas Ly-6, em particular, Ly-6C, está ligada ao aumento de secreção de quimicinas (Flanagan *et al.* 2008). Finalmente, o antígeno humano de Ly-6, o E48 (altamente homologa ao Ly-6D de camundongos), regula a liberação de fatores

quimioatraentes de células endoteliais da veia umbilical que induz monócitos a migrar através de uma camada de células endoteliais (Eshel *et al.*, 2002).

2.7 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS NA DENGUE

A dengue tem um quadro clínico marcado pela sua variação fenotípica inter-individual, abrangendo desde uma infecção assintomática até uma infecção letal (Casanova e Abel, 2007), onde numa mesma área endêmica com similar exposição ao patógeno apresentam diferentes taxas de prevalência entre diferentes grupos étnicos (Beiguelman, 1968; Bucheton *et al.*, 2002; Dolo *et al.*, 2005). Este fato motiva os estudos de associação genética à doenças infecciosas.

Os estudos de associação objetivam encontrar uma associação significativa entre um fator (alelo) de exposição e um desfecho (forma clínica). Um dos principais desenhos de estudos de associação é o caso-controle (Pacheco e Moraes, 2009), seguindo duas principais metodologias: genes candidatos, onde o número de indivíduos e marcadores selecionados é bem modesto, ou estudo de associação em todo o genoma (GWAS, do inglês *Genome-wide association studies*), onde são genotipados um grande número de casos e controles para milhares de marcadores por todo o genoma (Marian, 2012).

Depois de escolhida a metodologia, é importante critérios seguros para a seleção dos representantes do grupo caso, bem como do grupo controle. Uma vez que, os casos devem ser diagnosticados corretamente, usando métodos de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade. Enquanto que, a escolha dos controles pode ser o passo mais difícil durante um estudo caso-controle. O ideal é que cada controle tenha sido exposto às mesmas condições que os casos diferindo apenas no fator que se busca a associação, nesse caso a doença. Além

disso, deve ser considerado o tamanho amostral, sendo feito cálculos a fim de se obter o número mínimo de casos e controles necessários para se encontrar uma associação consistente e estatisticamente significativa (Pacheco e Moraes, 2009).

Em seguida selecionam-se os genes candidatos, que podem estar tanto em regiões internas, quanto regiões flangeadoras do gene. Vários polimorfismos podem ser usados como marcadores genéticos, porém, na maioria das vezes os polimorfismos de base única (SNPs) são os preferidos devido a sua ampla distribuição no genoma e fácil genotipagem (Pacheco e Moraes, 2009).

Alguns genes apresentam um alto nível de polimorfismo, especialmente os relacionados à resposta imune. Um exemplo de variação genética do sistema imune é o complexo maior de histocompatibilidade (MHC), que inclui os genes do *locus* antígeno leucocitário humano (HLA), *locus* altamente polimórfico localizado próximo de muitos outros genes com importantes e conhecidas funções imunológicas, como por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF) e a linfotóxina- α (LTA). Logo, a diversidade genética do HLA pode ter surgido como uma estratégia do hospedeiro para conter a diversidade antigênica dos organismos infecciosos (Kwiatkowski *et al.*, 2000).

Dentre os critérios utilizados para a escolha dos SNPs estão a sua prévia associação em estudos anteriores com outras doenças ou com a doença em questão. Entretanto, pode-se fazer uso de buscas de *tags* SNPs em bancos repositórios de polimorfismos humanos como o Hapmap. Muitos SNPs ou haplótipos em genes de citocinas/mediadores já foram associados suscetibilidade/proteção a várias doenças, inclusive a dengue. (Xavier-Carvalho *et al.*, 2013). Tal como o SNP -308 A/G no gene TNF, cuja a forma a alélica do gene que contém o nucleotídeo adenina (A) possui maior afinidade a fatores de transcrição resultando em um aumento da sua atividade, quando comparado à

forma alélica que contém o nucleotídeo guanina (G) (Bayley *et al.*, 2004). No caso da dengue e malária, por exemplo, a variante alélica que contém a adenina foi associada à gravidade do quadro clínico (Bayley *et al.*, 2004; Fernandez-Mestre *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2010). Além dos SNP -308 A/G no gene TNF e do haplótipo contendo o SNP -819 C/T no gene da IL-10 (Fernandez-Mestre *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2010), vários outros SNPs presentes em genes como DC-SIGN (Sakuntabhai *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011), receptor de vitamina D (VDR) (Loke *et al.*, 2002), lectina ligadora de manose (MBL) (Acioli-Santos *et al.*, 2008), JAK1 (Silva *et al.*, 2010), transportador associado ao processamento antigênico (TAP-1) (Soundravally e Hoti, 2008), HLA (Appanna *et al.*, 2010; Falcon-Lezama *et al.*, 2009) foram associados ao desenvolvimento de formas graves de dengue.

2.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES

A identificação e classificação das espécies têm sido domínio dos taxonomistas, proporcionando a base da nomenclatura e um pré-requisito essencial para numerosos estudos biológicos. De fato, a sociedade de hoje tem de resolver muitas questões biológicas fundamentais, dentre as quais a necessidade de se manter a biodiversidade, para garantir biossegurança, proteger as espécies e evitar pandemias (Frézal e Leblois, 2008).

As seguintes limitações da taxonomia baseada na morfologia foram mencionadas por Hebert *et al.*, (2003):

- A plasticidade fenotípica nos caracteres empregados para reconhecimento de espécies levam a identificação incorreta;

- As espécies morfologicamente crípticas são frequentemente omitidas;
- Há uma falta de chaves taxonômicas para identificação de espécimes imaturos de muitas espécies;
- A taxonomia tradicional requer um alto nível de expertise em qualquer grupo, sendo restrito a especialistas.

Para ultrapassar estas limitações, Hebert *et al.* (2003) desenvolveram um marcador molecular universal para identificação de metazoários baseado em uma região do gene mitocondrial Citocromo Oxidase.

2.8.1 MARCADOR MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE

Desde 2003, esforços consideráveis tem sido direcionados para o desenvolvimento de um sistema de identificação de animais por meio do DNA, baseando-se nas análises de diversidade de sequências da região 5' do gene mitocondrial Citocromo C oxidase subunidade I – COI (Hebert *et al.*, 2003; Hebert e Gregory, 2005).

Hebert *et al.* (2003) focaram suas discussões em propor que um sistema de “código de barras de DNA” para a fauna poderia ser baseada em uma sequência que apresentasse diversidade dentro do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI). Eles observaram que a diversidade nas sequências de amino ácidos codificada na seção 5' deste gene mitocondrial foi suficiente para identificar categorias taxonômicas superiores (de Filo a ordens), além de encontrarem a diversidade de sequências de nucleotídeos que permitia a

discriminação de espécies próximas. Assim surgiu o marcador mitocondrial Barcode.

2.8.2 MARCADOR MITOCONDRIAL BARCODE

O Barcode baseia-se no postulado de que todas as espécies provavelmente teriam um código de barras de DNA único (de fato, há 4×10^{650} possíveis combinações de ATCG – em comparação com as cerca de 10 milhões de espécies remanescentes a serem descobertas (Wilson, 2004).

A identificação molecular através do Barcode tem sido aplicada para uma ampla variedade de táxons, inclusive insetos da família Culicidae (Shouche e Patole, 2000).

De acordo com os autores, as sequências do DNA barcode, por serem únicas para cada espécie, podem ser interpretadas como verdadeiros "códigos de barras" genéticos, tendo o potencial para resolver os problemas inerentes ao tipo de taxonomia praticado até então. Deste modo, as identificações são realizadas rapidamente e a baixo custo, muitas vezes não sendo necessária sequer a atuação de um taxonomista possibilitando a identificação dos indivíduos em qualquer fase de desenvolvimento.

O "barcoding" de DNA é um novo sistema desenvolvido para fornecer identificação de espécies de maneira automática, precisa e rápida pelo uso de uma curta região gênica padronizada como uma etiqueta interna das espécies. Como consequência, torna o sistema taxonômico Linneano mais acessível, trazendo benefícios para ecologistas, conservacionistas e para as agências que monitoram a diversidade em programas de controle de pestes, espécies invasoras

e segurança alimentar. Além disso, a nomeação de espécimes de espécies conhecidas é acelerada, pois um taxonomista descobre rapidamente o tipo do espécime e pelo destaque de taxóons divergentes que podem representar novas espécies ou auxiliando a revelar espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004a, 2004b).

O principal objetivo do “barcoding” de DNA é viabilizar, para a maioria dos biólogos não taxonomistas, o acesso à informação taxonômica diretamente enquanto permite os profissionais taxonomistas focar na geração de mais conhecimento. Apesar do “barcoding” de DNA não criar a “enciclopédia da vida”, ele gerará um índice e uma tabela de conteúdos, promovendo a visão de um inventário amplamente acessível da biodiversidade (Hebert e Gregory, 2005).

Primeiro, para identificar taxonomicamente organismos danificados ou fragmentos (*e.g.* bens, extractos alimentares e estômago). A ferramenta de “barcoding” DNA é potencialmente útil também na indústria de alimentos, análise de dieta, ciências forenses e na prevenção do tráfico e caça ilegal de espécies ameaçadas de extinção (*e.g.* pescado, árvores e de animais selvagens). Em segundo, a identificação de base molecular é necessária quando não existem meios óbvios para combinar com adultos imaturos (Frézal e Leblois, 2008).

2.9 MARCADORES IMUNOLÓGICOS DE RESISTÊNCIA/SUSCETIBILIDADE

Estudos de expressão gênica representam uma oportunidade para identificar novos marcadores ligados à imunidade e patogênese da doença, e uma oportunidade de classificar os pacientes com dengue de uma maneira que proporciona maior relevância biológica e utilidade clínica (Fink *et al.* 2007).

Atualmente, uma das questões mais relevantes para os cientistas em matéria de sintomatologia da dengue é determinar quais os fatores que têm

influência no desenvolvimento de FHD. É consenso que a gravidade da dengue está associada a aspectos multifatoriais, como carga viral e sorotipo, infecções sequenciais e aspectos genéticos do hospedeiro (Simmons *et al.* 2007).

O sistema sanguíneo ABO, assim como outros polimorfismos genéticos, são também conhecidos por estarem associados com a predisposição de alguns indivíduos a desenvolver FHD. O genótipo AB foi recentemente mostrado para ser associado com um aumento no risco de desenvolver FHD e uma infecção secundária de dengue (Kalayanaroj *et al.*, 2007) apoiando a hipótese de que polimorfismos genéticos do hospedeiro podem desempenhar papéis importantes na suscetibilidade de FHD (Acioli-Santos *et al.*, 2008).

As populações de origem africana (Goh e Yamazaki, 1987; Shekhar e Huat, 1992), assim como as de outros grupos étnicos (Wallace *et al.*, 1980; Goh e Yamazaki, 1987; Shekhar e Huat, 1992; Guha-Sapir e Schimmer, 2005) parecem ser relativamente resistentes. Estudos de associação genética tem também apontado associações com 10 múltiplos loci de HLA e, mais recentemente, com o polimorfismo no gene codificante CD209 (DC-SIGN) (Sakuntabhai *et al.*, 2005).

Além disso, os polimorfismos genéticos relacionados com a realização de eventos imunológicos podem ter um efeito significativo sobre a doença por causa da importância da imunidade do hospedeiro na patogênese do DENV (Fang *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Analisar a viabilidade do uso de métodos tradicionais e moleculares no estudo da epidemiologia da dengue no município de Serra Talhada, sertão de Pernambuco.

3.2 Específicos:

- Avaliar a relação entre número de casos confirmados, número de ovos e sua associação com o regime de chuvas e temperatura no período de 2012 a 2013;
- Desenvolver um método de extração de DNA de ovo único;
- Identificar os potenciais vetores de dengue que ocorrem em Serra Talhada por meio do DNAm (BARCODE);
- Avaliar a frequência de marcadores de resistência/suscetibilidade a dengue dos pacientes confirmados no período de 2010 a 2014.

CAPÍTULO I

VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA POR MEIO DE OVITRAMPAS EM CIDADE DO SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO, BRASIL.

Plinio Pereira Gomes Júnior¹; Sérgio Sá Leitão Paiva¹; Aron Lourenço de Araújo²; Valdir de Queiroz Balbino^{3*}

¹Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brasil

²Fundação Nacional de Saúde, Secretaria de Saúde, Serra Talhada, PE, Brasil.

³Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA POR MEIO DE OVITRAMPAS EM CIDADE DO SEMIÁRIDO DE PERNAMBUCO, BRASIL.

Plínio Pereira Gomes Júnior¹; Sérgio Sá Leitão Paiva¹; Aron Lourenço de Araújo²; Valdir de Queiroz Balbino^{3*}

¹Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brasil

²Fundação Nacional de Saúde, Secretaria de Saúde, Serra Talhada, PE, Brasil. ³Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

*Rua Professor Moraes Rêgo, s/nº

Resumo

A dengue é a arbovirose mais preocupante para a saúde pública no mundo transmitida pelo *Aedes aegypti*. Portanto é importante o monitoramento da população de culicídeos é importante para a manutenção do número de casos de dengue sobre controle. Para isso, lança-se mão de armadilhas de captura de adultos e de ovos. Esta última é conhecida como ovitrampa. Em Serra Talhada, sertão de Pernambuco de 2012 a 2013, os índices de infestação apresentaram uma média de 13%, acima dos níveis preconizados pelo Ministério da Saúde. Além disso, os 258 casos em 2012 caracterizou surto epidêmico, o mesmo não se repetiu no ano de 2013, devido a exposição e consequente imunização natural da população no ano anterior. No período estudado, houve uma correlação positiva entre o número de casos e o número de ovos do mês anterior para os oito primeiros meses do ano. Porém, o mesmo não ocorreu quando correlacionado a variável número de ovos com as variáveis climáticas, pluviosidade média e temperatura compensada média. Logo, o nível de domiciliação e a ineficiência dos recursos humanos empregados no monitoramento e controle de vetores, são os principais fatores para a ocorrência de surtos e altos níveis de infestação no município de Serra Talhada.

Palavras - Chave: *Aedes aegypti*, vetor, dengue.

Introdução

O vírus da dengue é transmitido para humanos pela picada do mosquito vetor infectado. A febre da dengue e suas formas mais severas, febre da dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue, são considerados o principal problema de saúde pública no mundo, com uma estimativa de 50 milhões de novos casos por ano (FARRAR et al. 2007), sendo a principal arbovirose relacionada a muitos casos de morbidade e mortalidade (KOURÍ et al. 2007). Os surtos de dengue são causados pela interação de fatores ecológicos e biológicos do patógeno (Vírus), hospedeiro (humano) e do vetor (GUZMÁN e KOURÍ, 2002; HALSTEAD, 2007).

Enquanto não há vacina efetiva contra os quatro sorotipos da dengue, o controle do seu principal vetor permanece a única forma de prevenir a transmissão desta doença (GUZMÁN e KOURÍ, 2002; DEEN, 2004; GUZMAN et al., 2004), pois estratégias efetivas de controle são importantes para reduzir surtos de dengue (TSUZUKI et al., 2013).

Para o desenvolvimento de tais estratégias, utilizam-se métodos convencionais de monitoramento e controle de *Aedes aegypti* L. Estas diferem na eficiência e esforço empregados, tais como aspirador costal (CLARK et al., 1994; MACIEL-DE-FREITAS e LOURENÇO-de-OLIVEIRA, 2009) e a armadilha BG-Sentinela (MACIEL-de-FREITAS et al., 2006), que fornecem amostras viáveis. No entanto, ambos requerem uma fonte de energia e são altamente laboriosos, gerando um trabalho que dura o dia inteiro para coletar mosquitos em áreas endêmicas (FACCHINELLI et al., 2007; FACCHINELLI et al., 2008).

Alternativamente, usa-se material adesivo para capturar as fêmeas durante a oviposição em ovitrampas adesivas (GAMA et al., 2007; FACCHINELLI et al., 2007; FACHINELLI et al., 2008) e armadilhas de palhetas duplas (RITCHIE et al., 2003; CHADEE e RITCHIE, 2010). Estas são baseadas nas ovitrampas, as quais são originalmente feitas de um vaso plástico preto para plantas, preenchidos com água e com um palheta de madeira na qual as fêmeas põem seus ovos (FAY e ELISON, 1966). As ovitrampas são baratas, simples de fazer e de manusear. Elas são amplamente usadas para obter informações derivados de número de ovos postos, e para avaliar a distribuição espaço-temporal de mosquitos (REITER, 2007; FACCHINELLI et al., 2008).

Além disso, a produção de mosquitos em diferentes containers é determinada por múltiplos processos que vai da perspectiva ecológica à antropológica (WHITEFORD 1997; BARRERA et al. 2006; PHUANUKOONNON et al. 2006). O uso de material reutilizável de baixo custo para construir armadilhas estimula o desenvolvimento de métodos de monitoramento de adultos de *A. aegypti* (de SANTOS et al., 2012). Este estudo objetivou avaliar através da vigilância entomológica por meio de ovitrampas, a relação entre *A. Aegypti* com o número de casos de dengue no período de dois anos, no município de Serra Talhada – PE.

Material e métodos

Área de estudo

O município de Serra Talhada está localizado na região do semiárido do Estado de Pernambuco (S 07°59'31"; W 38°17'54"), Nordeste do Brasil. Seu clima é semiárido quente, sua vegetação é a caatinga hiperxerófila, possui 79.241 habitantes e uma incidência de pobreza de aproximadamente 49.55 a 44.91% (IBGE, 2010). Possui 16 bairros com

diferentes índices de infraestrutura no que diz respeito a saneamento e coleta de resíduos sólidos.

Instalação das armadilhas

Os procedimentos de inspeção da vigilância entomológica foram realizados em conjunto com o Núcleo de Vigilância em Saúde (NVS) da Secretaria Municipal de Saúde de Serra Talhada. Durante as instalações, a metodologia do estudo foi verbalmente explicada para os moradores. Em seguida, um termo de consentimento livre esclarecido foi obtido dos residentes ou proprietários que autorizaram a instalação das ovitrampas em suas propriedades. Foram instaladas 1027 ovitrampas em local sombreado a 1,2 metros de altura no peridomicílio das casas (área de serviço, garagem aberta, etc) que foram monitoradas semanalmente no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2013. Após coleta das palhetas, as mesmas eram levadas para o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município para serem contados os ovos por meio de um microscópio estereoscópio.

Análise dos dados

Após dois anos de coleta os dados foram analisados pelo método de série temporal no programa R, versão livre, para o intervalo de um ano e meio, pois os seis primeiros meses haviam um menor número de ovitrampas o que geraria dificuldade para a análise estatística. Então, foi realizada a correlação de Pearson do número de ovos coletados, pluviosidade e temperatura média ao longo do tempo. Além da análise de correlação entre o número de ovos e número de casos confirmados de dengue por bairro no mesmo período.

Resultados

Desempenho das ovitrampas

Ao longo do estudo foi observado um alta dispersão de ovos de *Aedes* sp. (95% de ovitrampas positivas) e distribuição heterogênea do número de ovos de um a 3.439 ovos/ovitrampa (média = 441.2 ovos/ovitrampa).

Consequentemente, os moradores armazenam água em recipientes, que se tornam criadouros em virtude do manejo inadequado. Deste modo, os mosquitos se mantem no

entorno dos domicílios, sem depender de chuvas para novos criadouros ou altas temperaturas para o desenvolvimento rápido, uma vez que a temperatura média do período foi de 32,5 °C. O bairro do Centro, embora seja o mais saneado e que dispõe do melhor serviço de coleta de resíduos sólidos da cidade, apresenta caixas d'água abertas, associado ao alto número de residências, característica que o fez o terceiro mais (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição do quantitativo de ovos coletados por mês para cada bairro de julho de 2012 a dezembro de 2013 em Serra Talhada. Com média ponderada de ovos por bairro. S. Cris. – Bairro de São Cristovão, A. Conc. – Bairro do Alto da Conceição, Borb. – Bairro da Borborema, A.B.J. – Bairro do Alto do Bom Jesus, Cen. – Bairro do Centro, Malh. – Bairro da Malhada, Cx. Eco. – Bairro da Caixa Econômica, V. Mil. – Bairro da Vila Militar, BB. I – Bairro da Bomba I, BB. II – Bairro da Bomba II, Cax. – Bairro da Caxixola, Coh. – Bairro da Cohab, Mut. – Bairro do Mutirão. De acordo com os dados da Secretaria de Obras do Município, em vermelho os bairros com baixa qualidade de saneamento básico, em laranja os bairros de qualidade de saneamento intermediário e em azul, o bairro com saneamento adequado.

Bairro/Ano/Mês		S. Cris.	A. Con.	Borb.	Cagep	Ipsep	A.B.J.	Cen.	Malh.	Cx. Eco.	V. Mil.	BB. I	BB. II	AABB	Cax.	Coh.	Mut.
Nº de armadilhas		100	100	50	100	75	100	90	30	30	30	32	30	30	30	100	100
2012	Jul	2.488	1.731	192	786	955	387	2.363	-	164	639	882	16	1.402	518	445	1.590
	Ago	1.675	428	37	703	467	786	1.710	24	152	122	517	228	685	115	561	1.066
	Set	1.407	798	104	1.075	580	800	1.605	464	105	159	407	105	398	593	306	1.124
	Out	1.246	1.427	76	1.205	737	419	1.005	505	107	77	333	83	496	166	290	495
	Nov	2.019	1.816	12	1.607	316	861	1.495	1.138	338	117	438	146	165	480	390	186
	Dez	2.914	2.874	205	1.273	825	686	2.497	786	62	222	1.145	191	271	305	699	704
2013	Jan	764	896	175	389	245	336	1.327	300	124	198	398	229	-	293	261	325
	Fev	7.356	3.126	825	2.540	-	2.913	3.239	200	1.555	932	-	-	753	1.328	1.825	7.505
	Mar	2.471	1.012	463	1.388	420	1.449	1.410	369	1.570	688	1.031	708	321	1.280	1.056	2.702
	Abr	4.088	1.154	810	3.744	1.485	1.547	4.256	238	378	1.736	2.972	2.794	-	829	1.729	7.529
	Mai	8.394	629	2.560	2.617	402	1.553	2.693	249	-	1.713	2.934	826	187	674	3.027	13.472
	Jun	4.529	315	730	836	296	-	233	-	-	203	1.290	-	108	323	953	2.600
	Jul	-	1.246	316	560	1.544	3.294	2.793	223	215	109	1.380	1.322	-	312	777	3.034
	Ago	7.080	8.123	1.756	3.724	6.906	8.735	6.632	3.651	964	802	3.882	1.569	8	1.303	3.225	12.490
	Set	2.127	1.974	617	1.133	2.287	1.183	3.476	685	685	315	1.949	2.557	77	569	938	5.484
	Out	4.817	3.770	440	1.676	2.224	4.084	4.803	846	694	1.080	2.693	2.092	144	403	2.903	4.881
	Nov	3.795	3.715	310	1.880	3.721	2.940	3.894	1.474	1.215	1.827	2.273	1.291	69	625	3.232	7.943
	Dez	3.914	3.694	230	2.514	3.965	2.761	3.650	1.621	1.394	2.107	2.101	1.178	51	732	3.457	9.806
Total		61.084	38.728	9.858	29.650	27.375	34.734	49.081	12.773	9.722	13.046	26.625	15.335	5.135	10.948	26.074	82.936
Média mensal		3.593,2	2.151,5	547,6	1.647,2	1.610,2	2.043,2	2.726,7	798,3	607,6	724,7	1.566,2	958,4	342,3	608,2	1.448,5	4.607,5

Ao relacionarmos pluviosidade, temperatura compensada média e número total de ovos por mês (tabela 2), não encontramos correlação entre as variáveis envolvidas. Uma vez que, seria esperado um aumento no número de ovos em períodos com alta pluviosidade e temperatura, certamente pelo grande número de depósitos utilizados pelos moradores para armazenamento de água em virtude da forte estiagem. No entanto, o número total de ovos foi maior em meses que apresentaram baixa pluviosidade e temperaturas que variaram de 25,3 a 28,1 °C. Este fato pode ser explicado pelo alto nível de domiciliação do *A. aegypti*, que possui facilidade em se reproduzir em qualquer criadouro que disponibilize água parada. Deste modo, a população aumenta o número de reservatórios e consequentemente, maior número de potenciais criadouros.

Tabela 2. Relação de pluviosidade e temperatura compensada média com número total de ovos de julho de 2012 a dezembro 2013. Em destaque, os maiores valores das variáveis envolvidas.

DATA	Pluv. Total (mm ³)	Temp. Comp. Média (°C)	Nº DE OVOS
Julho/2012	5,6	24.44	6.587
Agosto/2012	4,6	24.34	4.096
Setembro/2012	1.4	26.45	4.399
Outubro/2012	0,3	27.63	5.110
Novembro/2012	0,5	29.27	6.631
Dezembro/2012	6,6	29.20	8.775
Janeiro/2013	141.3	27.74	6.260
Fevereiro/2013	1.1	28.76	34.097
Março/2013	49.9	28.67	18.338
Abril/2013	89	26.87	35.289
Maio/2013	13.3	26.70	41.930
Junho/2013	1.5	26.16	12.416
Julho/2013	30.5	24.62	17.125
Agosto/2013	0.3	25.30	70.850
Setembro/2013	0	26.94	26.056
Outubro/2013	0.4	28.17	37.550
Novembro/2013	2.7	28.47	32.694
Dezembro/2013	97.4	27.89	43.175

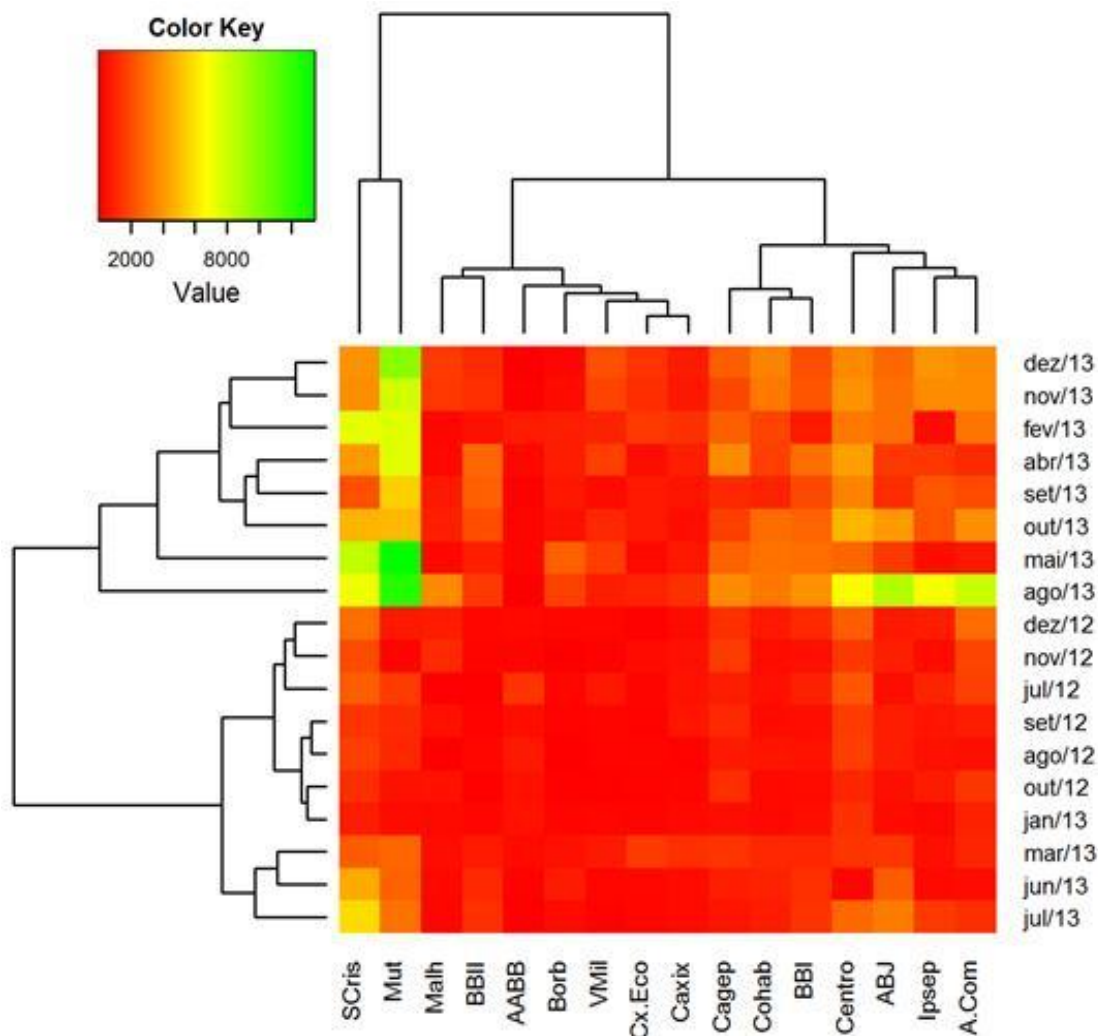


Figura 1. Heatmap gerado por meio da análise de série temporal pelo programa R, relacionando a média de ovos coletados ao longo do período de estudo para cada bairro. Quanto mais verde maior é o número de ovos.

Porém, por meio da análise do heatmap gerado pelo programa computacional R, os meses que apresentaram maiores correlações com os bairros foram janeiro/13, outubro/12 e agosto/12. Se observarmos do ponto de vista do bairro, aqueles que apresentaram menores infestações foram AABB, Borborema e Malhada (figura 1).

A avaliação de correlação entre o número de ovos e número de casos confirmados de dengue foi realizada relacionando no número de ovos do mês anterior com o número de casos confirmados de dengue do mês seguinte, pois consideramos o tempo do ciclo de vida do mosquito, o período de incubação e tempo de confirmação laboratorial do exame clínico. A análise de correlação apresenta valores que variaram de

zero a um, sendo mais forte quando mais próximo de um. Por meio desta avaliação, foram analisados os dados dos meses de janeiro a agosto, tanto do ano de 2012, como de 2013. Uma vez que, após o oitavo mês do ano o número de casos cai abruptamente em virtude da mudança climática, pois inicia-se o período quente e de maior estiagem. Para esta investigação, separamos os dados relacionados aos distritos e zonas rurais, dos dados relacionados à cidade de Serra Talhada. Porém, foram utilizados apenas os bairros que tiveram coleta de ovos realizada no mesmo intervalo de tempo, uma vez que alguns estavam sem Agentes de Combate a Endemias (ACE's). Neste período a correlação foi de 0,74 para cidade e 0,17 para zona rural nos primeiros oito meses de 2012. Enquanto que para o mesmo período de 2013, 0,52 para cidade e 0,15 para zona rural (dados não mostrados). Segundo a análise de correlação de Pearson, as diferenças entre as mesmas áreas, cidade e zona rural, no que diz respeito a relação número de casos e número de ovos, para os anos estudados não foram significativos ($p = 0,057$), para o intervalo de confiança de 95%.

Esta diferença de valores de correlação da cidade do ano de 2012 para o ano de 2013, pode ser explicada pelo aumento do número de ACE e redução do número de casos. Ao relacionarmos os valores de correlação da zona rural dos mesmos anos, não encontramos diferença significativa. Porém, quando comparados os valores de correlação da cidade com a zona rural do seu respectivo ano, observa-se uma diferença significativa. Esta diferença pode ser explicada pela subnotificação de registro de casos de dengue e a cobertura incompleta do monitoramento por ovitrampas.

Ao realizarmos o índice de positividade de ovitrampa, o bairro do Centro teve o maior índice de ovitrampa positiva (POI), no primeiro semestre, no período de julho a novembro de 2012. No segundo semestre, o bairro de São Cristovão, teve maior POI em três dos seis meses. E no terceiro semestre, o bairro do Mutirão, teve o maior POI de agosto a outubro de 2013 (tabela 3).

A partir do índice de densidade de ovos (EDI), o bairro da Malhada apresentou o maior EDI, no primeiro semestre de estudo, em outubro e novembro de 2012, enquanto Mutirão, no segundo semestre de estudo, em fevereiro e maio de 2013 e Mutirão e Bomba II no terceiro semestre (tabela 3).

Tabela 3. Bairros com maior índice de densidade de ovos (EDI) e maior índice de positividade de ovitrampa (POI) por mês de julho de 2012 a dezembro de 2013 em Serra Talhada. S. Cris. – Bairro de São Cristovão, A. Con. – Bairro do Alto da Conceição, A.B.J. – Bairro do Alto do Bom Jesus, Cent. – Bairro do Centro, Malh. – Bairro da Malhada, Cx. Eco. – Bairro da Caixa Econômica, V. Mil. – Bairro da Vila Militar, BB. I – Bairro da Bomba I, BB. II – Bairro da Bomba II, Cax. – Bairro da Caxixola, Mut. – Bairro do Mutirão

2º Semestre de 2012						
Índice	Jul	Ago	set	Out	Nov	Dez
EDI	V.Mil.	Mut.	Cax.	Malh.	Malh.	Cent.
POI	Cent.	Cent.	Cent.	Cent.	Cent.	A.con.
1º Semestre de 2013						
Índice	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun
EDI	Cent.	Mut.	Cx. Eco.	V.Mil.	Mut.	S.Cris.
POI	Cent.	S.Cris.	Cx. Eco.	S.Cris.	S.Cris.	BB i
2º Semestre de 2013						
Índice	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
EDI	BB II	A.B.J.	BB II	BB I	Mut.	Mut.
POI	Cent.	S.Cris./Mut.	Mut.	Mut.	BB I	BB I

Discussão

Pudemos notar que apesar de haver relação entre o nível de infraestrutura e infestação, bairros que apresentam saneamento e coleta de resíduos sólidos satisfatórios também podem apresentar uma alta infestação. Isto se deve ao fato de que o período de estudo coincidir com um período de seca prolongada e pluviosidade abaixo da média, o que consequentemente gera um racionamento de abastecimento de água potável à população. Estes resultados mostram que os vetores são mais abundantes nos bairros sem saneamento básico e que passam por longos intervalos de racionamento de água como Mutirão e São Cristovão. Isto pode ser explicado pelo alto nível de domiciliação do *A. aegypti*, que utiliza vários tipos de criadouros sendo menos atingidos pelas variações sazonais (WATTS et al., 1987), pois os moradores lançam mão de reservatórios inadequados como toneis e baldes, que por muitas vezes não são tampados adequadamente ou de estratégias de controle mecânico e químico. Logo, o comportamento dos moradores exerce pressão de seleção sobre a população do vetor no processo de domiciliação e dispersão (DONALÍSIO e GLASSER, 2002).

Segundo Souza et al. (2013), as taxas de infestação acima do limiar de 4% são usadas para direcionar as unidades de controle de vetor para instituir várias medidas de controle, somando-se aos esforços para mobilizar a comunidade para eliminar os

criadouros. Ambos os programas foram baseados no uso de larvicidas e adulticidas no intra e peri-domicílio. Atualmente a taxa de infestação do município de Serra Talhada esta em torno de 13% (dados não mostrados) e não diminui tanto pela falta de participação efetiva da população, como pela resistência aos larvicidas e adulticidas utilizados para o controle de vetores (ARAÚJO et al., 2013).

Em vários países, as ovitrampas são utilizadas mostrando-se mais eficientes que as pesquisas larvárias, principalmente em situações de índices de infestação predial abaixo de 5%, mas não fornece informações sobre a distribuição e tipos de criadouros predominantes (DONALÍSIO e GLASSER, 2002). Em nosso estudo, as ovitrampas feitas com garrafas PET, além de apresentar um baixo custo, demonstraram um bom desempenho no monitoramento de vetores, evitando que milhares de novos mosquitos nascessem. Embora, as ovitrampas não possam ser utilizadas como forma de controle, devemos avaliar a vigilância de casos de dengue, dispersão de vetores de dengue (REGIS et al., 2008; MACIEL-de-FREITAS e LOURENÇO-de-OLIVEIRA, 2009) e avaliação da efetividade de estratégias de monitoramento de vetores (HONÓRIO et al., 2009) nos serviços de saúde pública.

Em um estudo realizado em três cidades do estado da Bahia, todas as construções comerciais e residenciais foram visitadas pelo menos duas vezes no ano como parte de esforços de controle. Durante estas visitas, muitos criadouros potenciais foram ou eliminados ou tratados com larvicidas. Os proprietários ou responsáveis pela área foram orientados sobre os riscos de água estagnada e criadouros (SOUZA et al., 2013). Isto demonstra que a informação, quando bem transmitida se torna conhecimento, que por sua vez, quando posto em prática, contribui para a diminuição da infestação e conseqüentemente, ajuda a reduzir o número de casos de dengue.

Em nosso estudo, pudemos observar que nos oito primeiros meses dos anos avaliados, o número de casos confirmados de dengue apresentou uma forte correlação com o número de ovos do mês anterior (dados não mostrados). Este resultado é explicado pelo intervalo de tempo que envolvem fatores como período de ciclo de vida do vetor, da fase de ovo até a emergência do adulto; período de incubação viral após a infecção do hospedeiro e tempo de realização do exame laboratorial.

A manutenção da dengue e dos altos níveis de infestação em Serra Talhada, apresentam características semelhantes às de outras cidades do Brasil. Um dos fatores é

a escassez e o despreparo dos recursos humanos envolvidos no programa epidemiológico das secretarias de saúde municipais. Uma vez que, nos seis primeiros meses de 2012, muitos bairros e distritos não possuíam a cobertura adequada por falta de Agentes de Combate a Endemias (ACE). Além disso, a falta e o desinteresse por parte dos gestores com relação a cursos de reciclagem e atualização, tornam ineficiente o serviço prestado à população. De acordo com Halstead (1988), apesar de haver recursos destinados ao controle do vetor, a implementação do programa muitas vezes não alcança sucesso, em função de fatores como: busca de soluções fáceis, perda de habilidades técnicas e gerenciais pelo recurso humano disponível, aumento da dimensão do problema, desconsideração de experiências anteriores e expectativa de fracasso, espelhada em outras experiências mal sucedidas no controle de dengue, dentre outras doenças transmitidas por vetores.

Para avaliarmos a qualidade da nossa inferência, fizemos uma análise clássica de índice de densidade de ovos (EDI) e índice de ovitrampa positiva (POI). O EDI, não corroborou com as análises de correlação ou de série temporal, devido a relação do número de ovos por ovitrampa, que tende a ser maior nos bairros com menor número de ovitrampas. Enquanto que os resultados de POI, corroboram com os dados analisados pela análise de série temporal. Estes índices foram usados satisfatoriamente para análise de infestação em hospital em Cuiabá, Mato Grosso (CARVALHO-LEANDRO et al., 2010).

Portanto, a vigilância entomológica do município de Serra Talhada deve ser realizada de acordo com estratégias adequadas para o seu perfil epidemiológico e suas peculiaridades no que diz respeito à infestação. Logo, as análises realizadas, seja por correlação de número de casos com o número de ovos do mês anterior, bem como o método de série temporal contemplam, até então, as necessidades informacionais. Deste modo, deve-se levar em consideração o perfil de cada bairro para desenvolvimento de estratégias específicas.

Referências

Araújo, AP, Araujo-Diniz, DF, Helvecio, E, de Barros, RA, de Oliveira, CM, Ayres, CFJ, de Melo-Santos, MA, Regis, LN, Silva-Filha, MH. the susceptibility of aedes aegypti populations displaying temephos resistance to bacillus thuringiensis israelensis: a basis for management. *Parasites & Vectors* 2013, 6: 297.

Barrera R, Amador M, Clark GG. Ecological factors influencing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in artificial containers in Salinas, Puerto Rico. J. Med. Entomol. 2006a; 43:484–942.

Carvalho-Leandro D, Ribeiro ALM, Rodrigues JSV, Albuquerque CMR, Acel AM, Leal-Santos FA, Leite Jr DP, Miyazaki RD. Temporal distribution of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae), in a Hospital in Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia 54(4): 701–706, dezembro 2010

Chadee DD, Ritchie SA: Oviposition behaviour and parity rates of *Aedes aegypti* collected in sticky traps in Trinidad. West Indies. Acta Trop 2010, 116:212–216.

Clark GG, Seda H, Gubler DJ: Use of the “CDC backpack aspirator” for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. J Am Mosq Control Assoc 1994, 10:119–124.

de Santos, E M^a M., Melo-Santos, M^a A V., Oliveira, C M^a F., Correia, J C. e Albuquerque, C M^a R. Evaluation of a sticky trap (AedesTraP), made from disposable plastic bottles, as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations. Parasites & Vectors 2012, 5: 195.

Deen JL. The challenge of dengue vaccine development and introduction. Trop Med Int Health. 2004;9:1–3.

Donalisio M^a R e Glasser C M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. Rev. Bras. Epidemiol. 2002, 5(3): 259-272.

Facchinelli L, Valerio L, Pombi M, Reiter P, Costantini C, Della Torre A: Development of a novel sticky trap for container-breeding mosquitoes and evaluation of its sampling properties to monitor urban populations of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol 2007, 21: 183–195.

Facchinelli L, Koenraadt CJM, Fanello C, Kijchalao U, Valerio L, Jones JW, Scott TW, Della Torre A: Evaluation of a sticky trap for collecting *Aedes* (Stegomyia) adults in a dengue-endemic area in Thailand. Am J Trop Med Hyg 2008, 78: 904–909.

Farrar J, Focks D, Gubler D, Barrera R, Guzman MG, Simmons C, Kalayanarooj S, Lum L, McCall PJ, Lloyd L. Towards a global dengue research agenda. Trop. Med. Int. Health. 2007; 12: 695–699.

Fay RW, Elison DA: A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. Mosq News 1966, 26:531–535.

Gama RA, Silva EM, Silva IM, Resende MC, Eiras AE: Evaluation of the Sticky MosquiTRAP TM for Detecting *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) during the Dry Season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Neotrop Entomo 2007, 36: 294–302.

- Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2: 33–42.
- Guzman MG, Mune M, Kouri G. Dengue vaccine: priorities and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2004; 2: 895 – 911.
- Halstead S B. *Aedes aegypti*: why can t we control it? *Bull Soc Vector Ecol* 1988; 1113(2): 304-11.
- Halstead S. Dengue. *Lancet* 2007; 370: 1644-52.
- Honório NA, Codeço CT, Alves FC, Magalhães MAFM, Lourenço-de-Oliveira R: Temporal Distribution of *Aedes aegypti* in Different Districts of Rio De Janeiro, Brazil, Measured by Two Types of Traps. *J Med Entomol* 2009, 46:1001–1014.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo 2010. Disponível em <http://ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>. Acessado em janeiro de 2015.
- Kourí GI, Pelegrino JL, Munster BM, Guzmán MG. Sociedad, economía, inequidades y dengue. *Rev. Cubana Med. Trop*. 2007:59.
- Maciel-de-Freitas R, Lourenco-de-Oliveira R: Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saude Publica* 2009, 43:1–12.
- Maciel-de-Freitas R, Eiras AE, Lourenço-de-Oliveira R: Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101:321–325.
- Phuanukoonnon S, Brough M, Bryan JH. Folk knowledge about dengue mosquitoes and contributions of health belief model in dengue control promotion in Northeast Thailand. *Acta Trop*. 2006; 99:6– 14.
- Regis L, Monteiro AM, Melo-Santos MAV, Silveira JC Jr, Furtado AF, Acioli RV, Santos GM, Nakazawa M, Carvalho MS, Ribeiro PJ Jr, Souza WV: Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103:50–59.
- Reiter P: Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector Borne and Zoo Dis* 2007, 7:261–274.
- Ritchie SA, Long S, Hart A, Webb CE, Russell RC: An adulticidal sticky ovitrap for sampling container-breeding mosquitoes. *J Mosq Control Assoc* 2003, 19:235–242.
- Souza K R, Ribeiro Jr G, Santos C G S, Lima E C, Melo P R S, Reis M G, Blanton R E, Silva L K. Vector control measures failed to affect genetic structure of *Aedes aegypti* in a sentinel metropolitan area of Brazil. *Acta Tropica* 128 (2013) 598– 605

Tsuzuki, A., Sunahara, T., Duoc, V T., Le, N H., Higa, Y., Phong, T V. and Minakawa, N. Effect of housing factors on infestation by *Aedes aegypti* (l.) and *Aedes albopictus* skuse in urban hanoi city, vietnam. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2013; 44(6): 979 - 987.

Watts Dm, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE et al. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. Am J Trop Med Hyg 1987; 36(1): 143-152.

Whiteford LM. The ethnoecology of dengue fever. Med. Anthropol. Q. 1997; 11: 202–223.

CAPÍTULO II

Novel DNA extraction assay for molecular identification of *Aedes* spp eggs

M.T.S. Freitas¹, P.P. Gomes-Júnior^{1,2}, M.V.A. Batista⁵, T.C. Leal-Balbino³, A.L. Araujo⁴ and V.Q. Balbino¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brasil

³Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil

⁴Fundação Nacional de Saúde, Secretaria de Saúde, Serra Talhada, PE, Brasil

⁵Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH

Novel DNA extraction assay for molecular identification of *Aedes* spp eggs

M.T.S. Freitas¹, P.P. Gomes-Júnior^{1,2}, M.V.A. Batista⁵, T.C. Leal-Balbino³, A.L. Araujo⁴ and V.Q. Balbino¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brasil

³Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil

⁴Fundação Nacional de Saúde, Secretaria de Saúde, Serra Talhada, PE, Brasil

⁵Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil

ABSTRACT. *Aedes aegypti* and *A. albopictus* represent the two most important species of mosquitoes in relation to dengue virus transmission both in the Americas and Asia. However, the study of these species generally requires the establishment of a colony for the larvae to hatch, or waiting for the adult development to perform its taxonomic classification, which is time consuming. Thus, the establishment of new methods aimed at obtaining DNA directly from the mosquito eggs is relevant. Accordingly, we compared a new approach based on Chelex® 100 resin with the standard STE method to extract DNA from the eggs of *Aedes* spp to molecularly identify these vectors. The Chelex® 100 resin approach was very efficient, as satisfactory amounts of DNA were obtained, making it possible to amplify and sequence a mitochondrial DNA barcode region widely used to identify species. The STE protocol yielded substantial amounts of DNA, but the 260/280 optical density ratio indicated a low quality, precluding amplification. This new method proved quite effective in obtaining DNA from even a single mosquito egg, and it can thus be applied in population genetic studies of various vector insects to enhance monitoring programs.

Key words: Epidemiologic surveillance; Molecular identification; *Aedes* spp.

INTRODUCTION

Aedes aegypti and *A. albopictus* mosquitoes are of great importance regarding dengue transmission, a disease that affects more than 100 countries. In the Americas, in 2010, approximately 1.6 million cases were reported, of which 49,000 were considered severe. In addition, these insects are proven to be involved in the transmission of Chikungunya and yellow fever viruses (Gubler, 2006; Paupy et al., 2010).

Aedes spp are found mainly in urban areas, and they develop primarily in clean water reservoirs and small temporary pools (Nelson, 1986). Generally, it is necessary to use taxonomic keys that describe morphological characteristics of certain phases of the animal's life, especially the larval or adult phases, for the identification of the mosquitoes (Guedes, 2006). However, this process requires ideal water and temperature conditions and/or waiting for the larvae to reach an ideal stage for identification, which is time consuming (Cary, 1996). While the maintenance of the environmental conditions could be regulated, some eggs can exhibit a natural delay in their cycle, or even never hatch, making it necessary to use auxiliary techniques for larval release (Forattini, 1962; Charles, 1967; Swartz and Hebert, 1987; Gomes et al., 1995; Chung, 1997). Another possible approach would be the analysis of the morphological characteristics of the egg exochorion, which requires an expert in egg morphological analysis, and expensive equipment (Reinert, 1972).

In recent decades, researchers have been increasingly more likely to solve taxonomic problems in certain species using polymorphic genetic markers, also widely used in phylogenetic studies and population genetics (Yue and Orban, 2001; Aranishi and Okimoto, 2006). One of the most used genes is mitochondrial cytochrome oxidase I (COI), which has high phylogenetic signal and rapid evolutionary rate, which is important for characterizing populations, subspecies and species (Harrison, 1989). Therefore, Hebert et al. (2003) proposed that COI should serve as a barcode for metazoans, making it a universal system for species molecular taxonomy (Miller, 2007). Accordingly, this study aimed to compare a new method of DNA extraction of *Aedes* eggs based on the use of Chelex® 100 resin and the standard STE method to obtain genomic DNA. The resin method proved extremely efficient since satisfactory amounts of DNA were obtained, making it possible to amplify and sequence the DNA barcode.

MATERIAL AND METHODS

Egg achievement and DNA extraction

A total of 742 eggs of *Aedes* mosquitoes were used, of which 636 belonged to *Aedes aegypti* and 106 to *A. albopictus*. Initially, 318 *A. aegypti* unviable eggs (dry and open) were screened. The eggs were collected using ovitraps in the city of Serra Talhada (7°59'31"S, 38°17'54"W) following a protocol described elsewhere (Fantinatti et al., 2007). Serra Talhada is located in the semi-arid region of the state of Pernambuco, Northeast Brazil. Viable eggs of the Rockefeller lineage and *A. albopictus* were obtained from the insectary of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil. DNA was extracted with Chelex® 100 (BioRad, Berkeley, CA, USA) using viable and unviable *A. aegypti* eggs in triplicate, in the amounts of 1, 5, 10, 20, 30, and 40 eggs, providing 36 samples. In addition, 36 samples of *A. albopictus* were used without replicates.

The method used for individual or grouped eggs followed that of Walsh et al. (1991), with modifications. Briefly, the eggs were placed in 1.5-mL plastic tubes with 100 µL 5% Chelex® 100 resin. The eggs were then macerated with a pestle until homogenized, and allowed to stand for 1 h in water bath at 54°C. Subsequently, the mixture was transferred to a plastic tube and kept at 94°C for 30 min in a Multigene OptiMax Thermal Cycler TC 9610 (LABNET, Edison, NJ, USA). The solution was then centrifuged at 13,000 rpm for 6 min, and the supernatant was transferred to a 1.5-mL plastic tube, and stored at -20°C. In the STE protocol, viable eggs of *A. aegypti* were homogenized in STE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 100 mM NaCl), incubated for 10 min at 95°C and centrifuged at 13,000 rpm for 1 min. Finally, DNA quantification was carried out in NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Polymerase chain reaction

Cytochrome oxidase I mitochondrial gene, associated with a DNA barcode (Hebert and Gregory, 2005) was amplified using the primers HCO2198-L (5'-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3') and LCO1490-L (5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3') described by (Nelson et al., 2007). In general, 12.5 µL Mix Go Taq Colorless (Promega, Fitchburg, WI, USA), 7.5 µL

nuclease-free water, 1.5 mL each primer, and 2 μ L template DNA were used. The amplification reactions were carried out in a Multigene OptiMax Thermal Cycler TC 9610 with the following cycle: initial denaturation at 95°C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 44°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 7 min. The amplification products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis for 30 min at 100 V. The electrophoretic gel was stained with SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and visualized with a UV transilluminator.

Amplicon purification and sequencing

The amplicon purification was performed using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega), following manufacturer instructions. Subsequently, purified amplicon sequencing was carried out in an ABI 3500 automated sequencer (Applied Biosystems, Cleveland, OH, USA). The sequences were then evaluated using the programs Pregap4 v 1.5 and Gap4 incorporated into the Staden Package (Staden, 1996), using a Phred value of 30 as a quality cutoff. Similarity searches in GenBank were performed using Blastn (Altschul et al., 1990). The sequences were deposited at the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), under the following accession Nos. JX456411 to JX456417.

RESULTS AND DISCUSSION

The mean concentrations of DNA ranged from 6.8 to 192.9 ng/ μ L using Chelex® 100 resin (data not shown). The STE method, consisting of lysis and denaturation steps, is efficient in extracting genomic DNA. Thus, it is employed in many types of insect studies where the samples are adult diptera (Dobson and Rattanadechakul, 2001; Pinto et al., 2013). Using the STE method, the average DNA concentrations obtained using a single egg were higher (22.8- 92.2 ng/ μ L) than with the Chelex® 100 resin method, but DNA quality was significantly lower owing to the impurities not removed in this method, making the amplification step impossible. All samples obtained using Chelex® 100 resin, were amplified satisfactorily producing a fragment of approximately 708 bp (negative control was a reaction without DNA, to ensure no contamination) (Figure 1). These primers were defined for the identification of insects, from the amplification of the region of the COI gene proposed by Nelson (2003). All sequences showed 99 and 100% similarity with *A. aegypti* and *A. albopictus* sequences, respectively.

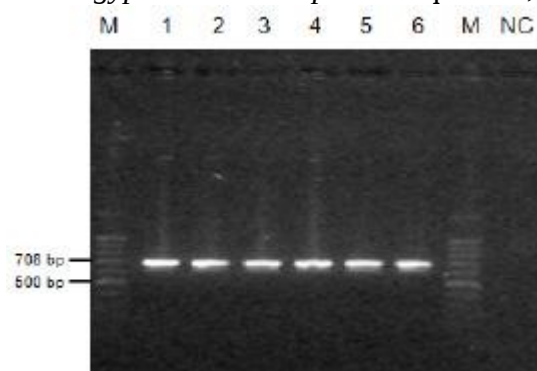


Figure 1. Electrophoresis gel showing the amplification product of *Aedes albopictus* DNA barcode region. Lane M = molecular weight; lane 1 = one single egg; lane 2 = 5 eggs; lane 3 = 10 eggs; lane 4 = 20 eggs; lane 5 = 30 eggs; lane 6 = 40 eggs; lane NC = negative control.

The results showed that DNA can be obtained from even one single egg of *Aedes* spp, regardless of their viability conditions because we also used eggs considered unviable for larval hatching in the laboratory. Thus, we developed a rapid, efficient and low-cost method that can be applied to the identification of vector mosquitoes. Traditionally, for the taxonomic identification of mosquitoes, a colony is necessary to obtain the larval or adult forms. However, there are a number of parameters that must be controlled, which otherwise can cause their natural cycle to slow down or even stop. This process could cause some viable eggs to never hatch under laboratory conditions. Moreover, a thorough analysis may be required in the egg excision, followed or not by the use of a larval whitening technique (Forattini, 1962; Charles, 1967; Swartz and Hebert, 1987; Gomes et al., 1995; Chung, 1997). Another way found for taxonomists to perform the identification of mosquito eggs is the use of existing morphological structures in the eggs, which have the potential to assist in the taxonomic identification of some species of medical interest. However, it is necessary to use a scanning electron microscope, which requires technical expertise in handling the equipment and in the analysis of the egg structures (Swartz and Hebert, 1987; Cary, 1996; Giangrande, 2003). Methods for nucleic acids extraction from samples with cell wall chitin have been proposed as an alternative to the classical taxonomy of species of medical importance. In previous studies, great difficulty in obtaining DNA from both eggs and larvae has been reported, due to the presence of lipids in these tissues, which hamper DNA recovery and PCR (Reinert, 1972). This problem is even more evident when the eggs are degraded (Briski et al., 2011). Thus, researchers choose to lyse the eggs for release of larvae prior to DNA extraction using heat shock (Traub et al., 2009), saline (Buathong et al., 2010), autoclave techniques (Stensvold et al., 2006; Duenngai et al., 2008; Umesha et al., 2008) or crushing (Sato et al., 2009). Using this new method based on Chelex® 100 resin described in this study, we could neutralize inhibitors, since regardless of the number of eggs, all samples were satisfactorily amplified. Furthermore, DNA concentrations and egg amounts used in this study were consistent. However, there is the possibility of variation in the DNA concentration due to manual maceration process, which is considered a critical step in the achievement of good quality DNA for PCR, as observed by other authors (Yue and Orban, 2001; Desloire et al., 2006). Another relevant point in our study was that we used the *COI* gene, since several studies have been conducted primarily to understand the genetic dynamics of this vector populations, which is an important aspect for establishing monitoring and control strategies. That way, the use of DNA barcode in this study was very important because we can provide the appropriate conditions to differentiate these two species of mosquitoes. According to Hebert et al. (2003), there must be at least 3% polymorphic sites between nucleotide sequences, along with the appropriate model of nucleotide substitution for this molecular marker, for any metazoan species to be distinguished. In this study, we observed approximately 67 polymorphic sites (Figure 2), representing approximately 10% of the complete sequence alignment.



Figure 2. Multiple sequence alignment of *Aedes aegypti* and *A. Albopictus* DNA barcode sequences. Two sequences obtained in this study and two reference sequences from GenBank are compared. The accession number is displayed. The outlined nucleotide bases are conserved.

Therefore, using an efficient, simple, safe and low-cost method of DNA extraction, we could obtain DNA from viable or unviable eggs in appropriate quantity and quality for a good amplification reaction. Associated with this, we suggest the use of this new tool to study the population dynamics of mosquitoes of medical importance, and possibly to implement this new approach in programs for monitoring insecticide resistance in natural populations.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by CNPq (#142216/2010-0, fellowship for M.V.A. Batista and #309124/2012-3 for V.Q. Balbino), FACEPE (#APQ-0651-2.02/10 for V.Q. Balbino), and Universidade Federal de Pernambuco.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, et al. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Aranishi F and Okimoto T (2006). A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle. *J. Appl. Genet.* 47: 251-254.
- Briski E, Cristescu ME, Bailey SA and MacIsaac HJ (2011). Use of DNA barcoding to detect invertebrate invasive species from diapausing eggs. *Biol. Invasions* 13: 1325-1340.
- Buathong S, Mungthin M, Tan-ariya P, Naaglor T, et al. (2010). PBS incubation, a simple technique to release miracidia of *Opisthorchis*-like eggs for DNA extraction. *Exp. Parasitol.* 124: 357-359.
- Cary SC (1996). PCR-based method for single egg and embryo identification in marine organisms. *Biotechniques* 21: 998-1000.
- Charles MM (1967). Identification and descriptions of *Aedes* eggs from California and Nevada (Diptera: Culicidae). *Can. Entomol.* 99: 795-806.
- Chung C (1997). A simple method for determining the identity of the eggs of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) by dissection (Diptera: Culicidae). *Chin. J. Entomol.* 17: 86-91.
- Desloire S, Valiente MC, Chauve C and Zenner L (2006). Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet. Res.* 37: 725-732.

- Dobson SL and Rattanadechakul W (2001). A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38: 844-849.
- Duenngai K, Sithithaworn P, Rudrappa UK, Iddya K, et al. (2008). Improvement of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in human stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 46: 366-368.
- Fantinatti ECS, Duque JEL, Silva AM and Silva-Navarro MA (2007). Abundância e agregação de ovos de *Aedes aegypti* L. e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no norte e noroeste do Paraná. *Neotrop. Entomol.* 36: 954-960.
- Forattini OP (1962). Entomologia Médica. Culicinea: *Culex*, *Aedes* e *Psorophora*. 1st edn. Edgard Blucher, São Paulo.
- Giangrande A (2003). Biodiversity, conservation, and the taxonomic impediment. *Aquatic Conserv. Mar. Freshwat. Ecosyst.* 13: 451-459.
- Gomes AC, Gotlieb SL, Marques CC, de Paula MB, et al. (1995). Duration of larval and pupal development stages of *Aedes albopictus* in natural and artificial containers. *Rev. Saude Publica* 29: 15-19.
- Gubler DJ (2006). Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found. Symp.* 277: 3-16.
- Guedes DRD (2006). Epidemiologia Molecular do *Aedes albopictus* (Díptera: Culicidae). Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Recife.
- Harrison RG (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4: 6-11.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL and deWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270: 313-321.
- Hebert PD and Gregory TR (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* 54: 852-859.
- Miller SE (2007). DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 4775-4776.
- Nelson MJ (1986). *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Pan American Health Organization, Washington.
- Nelson LA, Wallman JF and Dowton M (2007). Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med. Vet. Entomol.* 21: 44-52.
- Paupy C, Ollomo B, Kamgang B, Moutailler S, et al. (2010). Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonotic. Dis.* 10: 259-266.
- Pinto SB, Stainton K, Harris S, Kambris Z, et al. (2013). Transcriptional regulation of *Culex pipiens* mosquitoes by *Wolbachia* influences cytoplasmic incompatibility. *PLoS Pathog.* 9: e1003647.
- Reinert JF (1972). Description of the Egg of *Aedes* (Aedimorphus) *domesticus* (Theobald) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 4: 60-62.
- Sato M, Thaenkham U, Dekumyoy P and Waikagul J (2009). Discrimination of *O. viverrini*, *C. sinensis*, *H. pumilio* and *H. taichui* using nuclear DNA-based PCR targeting ribosomal DNA ITS regions. *Acta Trop.* 109: 81-83.
- Staden R (1996). The Staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5: 233-241.
- Stensvold CR, Saijuntha W, Sithithaworn P, Wongratanacheewin S, et al. (2006). Evaluation of PCR based coprodiagnosis of human opisthorchiasis. *Acta Trop.* 97: 26-30.
- Swartz SS and Hebert PDN (1987). Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Freshw. Biol.* 17: 373-379.
- Traub RJ, Macaranas J, Mungthin M, Leelayoova S, et al. (2009). A new PCR-based approach indicates the range of *Clonorchis sinensis* now extends to Central Thailand. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e367.
- Umesha KR, Kumar S, Parvathi A, Duenngai K, et al. (2008). *Opisthorchis viverrini*: detection by polymerase chain reaction (PCR) in human stool samples. *Exp. Parasitol.* 120: 353-356.
- Walsh PS, Metzger DA and Higuchi R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.
- Yue GH and Orban L (2001). Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. *Mar. Biotechnol.* 3: 199-204.

CAPÍTULO III**MOLECULAR TAXONOMY TO
ENTOMOLOGICAL SURVEILLANCE**

Plínio Pereira Gomes Júnior¹; Valdir Queiroz Balbino²

1 Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Serra Talhada, PE, Brasil

2 Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

**ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR
RESEARCH**

MOLECULAR TAXONOMY TO ENTOMOLOGICAL SURVEILLANCE

Plínio Pereira Gomes Júnior¹; Valdir Queiroz Balbino²

¹ Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brasil

² Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

ABSTRACT. *Aedes aegypti* and *A. albopictus* are the two most important mosquitoes in relation to dengue, chikungunya and zika virus transmission in the Americas. *Aedes albopictus* arrived in Brazil by trade activities of used tires from United States. In 2011, during monitoring of *Aedes aegypti* in Serra Talhada – PE, eggs had individual DNA extracted to following PCR and sequencing through BARCODE molecular marker. Three eggs of *A. albopictus* were confirmed by individual DNA extraction of these, PCR and sequencing through BARCODE molecular marker. Despite the occurrence of chikungunya, dengue and zika virus, entomological surveillance should use molecular taxonomy technique for effective actions to identify other medically important vector species, contributing to the development of better control and monitoring strategies.

Key-words: arboviruses, epidemic, vector.

INTRODUCTION

In recent decades, polymorphic genetic markers have been used to solve taxonomic problems in certain species, as soon as in phylogenetic studies and population genetics (Aranishi and Okimoto, 2006). According to Hebert et al. (2003) Cytochrome Oxidase I (COI) serves as a barcode for metazoans, making it a universal system for species molecular taxonomy.

Aedes aegypti arised in north of Africa, dispersing to worldwide by trade and slave trafic (Forattini and Brito, 2003). It is chikungunya, yellow fever, dengue and zika vírus vector in urban areas in Americas (Brasil, 2015a,b).

Arising from Southeast Asia, where is an important vector of arboviruses, *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) dispersed significantly worldwide since 1980 (Gomes et al., 1999). It appear to be introduced in Brazil by used tires trade from United States (Estrada-Franco and Craig, 1995), through Vitória harbour in Espírito Santo - ES. Although Consoli and Lourenço-de-Oliveira (1994), believe that has Japanese origin and dispersed by railway line at Vale do Rio Doce. Its first identification in Brazil was in the city of Rio de Janeiro in 1986 (Forattini, 1986). At same year, its occurrence was recorded in São Paulo State, in municipality of Areias (Vale do Paraíba) (Brito et al., 1986). Then, it was referred in municipality of Tremembé (Gomes and Marques, 1988) and in São Paulo city (Soubihe et al., 1992). This species has spread throughout Brazil, starting from the primarily infested area so that in 1997 have occurred in 14 states and in 1999, it was reported in Mato Grosso do Sul (Gomes et al., 1999) and Recife – PE (Albuquerque et al., 2000). Nowadays, *A. albopictus* is occurring in 24 of the 27 federal units (Carvalho et al., 2014).

Aedes aegypti and *Aedes albopictus* are vectors of dengue, yellow fever, chikungunya and Zika virus, justifying the concern of its dispersion to rural areas where autochthonous arboviruses occur (Figueiredo, 2007). In addition, it demonstrated competence to infection and transmission of *Aedes albopictus* to arbovirus 22 at laboratory conditions (Moore and Mitchell, 1997), turning its record epidemiologically important fact. Although it is still nuclear, the effect *A. albopictus* presence over transmission dynamics of arbovirus in Americas, its interaction with *A. aegypti* require attention, cause both species use similar artificial breeding sites to development in rural, urban and peri-urban environments (Johnson et al., 2002). Thus, the aim of this study was identify putative dengue vector by molecular taxonomy.

METODOLOGY

During the beginning of *Aedes aegypti* infestation surveillance, occurred in 2011 in the city of Serra Talhada – PE, 250 ovitraps made by disposable bottles were installed at peri-domicile four neighborhoods in the period from September to December. Palettes with eggs were taken to the Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE), UFPE. Of these, 1% were used for molecular identification. The procedures of individual DNA extraction, Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing of BARCODE molecular marker as made for Freitas et al., (2014).

RESULTS AND DISCUSSION

Among the procedures, were collected a total of 28.966 eggs, between them, three eggs of *A. albopictus* were found by BARCODE molecular marker. According to Hebert et al.(2003), Barcode is a mitochondrial molecular marker which was suggested to molecular taxonomy of metazoaries and has been applied to wide variety of taxa, including Culicidae.

The traditional taxonomy of mosquitoes, require a colony establishment to obtain the larval or adult forms. However, there are a number of parameters that must be controlled, which otherwise can cause their natural cycle to slow down, stop or cause some unviable eggs which never hatch under laboratory conditions. Moreover, a thorough analysis may be required in the egg excision, followed or not by the use of a larval whitening technique (Forattini, 1986; Chung, 1997).

To identify mosquito eggs, traditional taxonomists use of existing morphological structures in the eggs, which have the potential to assist in the taxonomic identification of some species of medical interest. Requiring a scanning electron microscope, which requires technical expertise in handling the equipment and in the analysis of the egg structures (Swartz and Hebert, 1987; Giangrande, 2003).

During the collection period the average temperature was at around 34 ° C, relative humidity of 46% (INMET, 2015) and the vegetation of Caatinga was drought and is not adequated to *A. albopictus* establishment, cause according to Estrada -Franco and Craig (1995), in a laboratory experiment, it prefers temperatures between 16 and 25 °C and relative humidity 60-70%. This species is known to prefer wild environments and forested urban areas. However, the eggs were in an ovitrap of São Cristóvão neighborhood.

Because of its geographical location, Serra Talhada is a very important city due to trade, it receives more than 100,000 people every month residents of the nearby towns or Bahia, Paraíba and Ceará States. Thus, it is necessary to monitor alertly way the *A. albopictus* presence to new environmental conditions which it is submitted, once it increases the urban epidemic risk, due to the increase in vector density, cause larger vectorial density and dispersion of this species in urban areas where dengue fever cases are confirmed. However, just now that the chikungunya virus is occurring in Pernambuco with ten confirmed cases, it has made a diligent entomological surveillance for *A. albopictus* when it was recorded in 36 municipalities in the state (DA Bandeira: personal communication, 2015).

A. albopictus and *A. aegypti* can live sympatrically, sharing the same breeding site. Reduction or populational displacement of resident species have been observed in many countries after *A. albopictus* introduction (Paupy *et al.*, 2009).

Thus, it is important to reflect about molecular taxonomy technique use to effective entomological surveillance that can detect the occurrence of other medically important vector species, contributing to the development of efficient control and monitoring strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to the Surveillance in Health Department of Serra Talhada – PE and Department of Entomology of CPqAM – FIOCRUZ, Recife, Brazil.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Albuquerque CMR, Melo-Santos M^{AV}, Bezerra MAS, Barbosa RMR, Silva DF, Silva E (2000). Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área da Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 34(3): 314-5.
- Aranishi F and Okimoto T (2006). A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle. *J. Appl. Genet*. 47: 251-254.
- Brasil (2015a) <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/17702-confirmacao-do-zika-virus-no-brasil>. Acessado em março de 2015.
- Brasil (2015b) <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/21367-saude-alerta-viajantes-para-eliminacao-dos-criadouros-do-aedes-aegypti>. Acessado em dezembro de 2015.
- Brito M, Marques GRAM, Marques CCAM, Tubaki RM (1986). Primeiro encontro de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 20: 489.
- Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109:787-796.
- Chung C (1997). A simple method for determining the identity of the eggs of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) by dissection (Diptera: Culicidae). *Chin. J. Entomol*. 17: 86-91.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R (1994). Principais Mosquitos de importância sanitária do Brasil. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. p 114-9.
- Estrada-Franco JG, Craig Jr, G.B (1995). Biology, disease relationship and control of *Aedes albopictus*. Organização Panamericana de Saúde, Washington, EUA, (Technic publication nº 12).

- Figueiredo LTM, (2007). Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40(2):224-229.
- Forattini OP (1986). Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 20: 244-5.
- Forattini OP, Brito M (2003). Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública*. 37: 676-7.
- Freitas MTS, Gomes-Júnior PP, Batista MVA, Leal-Balbino TC, Araujo AL, Balbino VQ (2014). Novel DNA extraction assay for molecular identification of *Aedes* spp eggs. *Gen Mol Res*. 13 (4): 8776-8782.
- Gomes AC, Bittencourt MD, Natal D, Pinto PLS, Mucci LF, Paula MB et al. (1999). *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. *Rev Saúde Pública*. 33: 95-7.
- Gomes AC, Marques GRAM (1988). Encontro de criadouro natural de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 22: 245.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc of Lond B Biol Sci*. 270:313–321.
- Instituto Nacional de Meteorologia – INMET, BDMET. Disponível em:
http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera_serie_txt_mensal. Acessado em 12 de março de 2015.
- Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Filippis AMB, Vilarinhos PTR, Resende MC et al. (2002). Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 96: 611-3.
- Moore CG, Mitchell CJ (1997). *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infectious Disease*. 3: 329-34.
- Soubihe V, Barata JMS, Natal D, da Costa AIP (1992). Presença de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) na cidade de São Paulo-SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 26: 57.

CAPÍTULO IV

Análise do polimorfismo de marcadores genéticos de resistência/suscetibilidade a dengue em pacientes de Serra Talhada – PE: dados parciais.

Plínio Pereira Gomes Júnior¹; Klaúdia Emanuela Ramos Tenório²; Aron Lourenço Araujo³; Valdir de Queiroz Balbino⁴

1 Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, PE, Brasil

2 Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

3 Núcleo de Vigilância em Saúde, Secretaria municipal de Serra Talhada, PE, Brasil

4 Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Análise do polimorfismo de marcadores genéticos de resistência/suscetibilidade a dengue em pacientes de dengue em Serra Talhada – PE: dados parciais.

Plínio Pereira Gomes Júnior¹; Klaúdia Emanuela Ramos Tenório²; Aron Lourenço Araujo³; Valdir de Queiroz Balbino⁴;

Resumo:

Background - A dengue é a principal arbovirose de importância médica no mundo, com quatro sorotipos distintos, colocando dois terços da população mundial sob risco de infecção e uma estimativa de 100 milhões de novos casos de dengue todos os anos.

Methods – Foram analisadas as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos marcadores moleculares CCR5 e dos SNP's de IL-4, IL-10, Ly-6 por meio da análise de associação de haplótipos com software SNPstat dos casos confirmados de dengue registrados de 2010 a 2014 na cidade de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.

Results – Todos os 101 voluntários tiveram febre da dengue, ao menos, uma vez. Sendo 70 mulheres e 31 homens, cuja maioria era: branca, faixa etária entre 42 e 65 anos, renda mensal média de até dois salários mínimos e escolaridade de ensino médio. Os marcadores IL-4 e IL-10, apresentaram desequilíbrio de ligação por meio do teste exato de Hardy-weinberg. Além disso, houveram diferenças significativas de frequência alélica e genotípica, quando comparadas a outras populações.

Conclusions – A baixa qualidade de informações a respeito dos pacientes gerou uma redução significativa dos potenciais voluntários. Além disso, a epidemia de vírus Zika e dengue, dificultou a coleta por um grupo controle, tornando os dados de nossa análise, parciais em relação ao nosso objetivo.

Keywords: SNP, Febre da dengue Hemorrágica, vírus.

INTRODUÇÃO

A dengue é um grande problema da Saúde Pública em zonas tropicais e subtropicais, tratando-se de uma antropozoonose viral, multifatorial, influenciada pela idade, doenças crônicas pré-existentes, sequência de infecções de um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV), sistema imunológico e fatores genéticos do indivíduo (Weiskopf et al., 2014). Clinicamente, esta patologia varia de um quadro assintomático, dengue clássica, dengue hemorrágica ou síndrome do choque da dengue (Seneviratne et al., 2006; Weiskopf et al., 2014). Esta diversidade clínica é influenciada pela resposta imune ao vírus da dengue na infecção primária ou secundária, onde indivíduos expostos à primeira vez ao vírus apresentam resposta primária com um discreto e lento aumento de anticorpos. Já em indivíduos pré-expostos a produção de anticorpos é rápida (Abe et al., 2012). Contudo, na segunda infecção viral há uma diminuição na eficácia do sistema

imune contra o vírus (Mongkolsapaya et al, 2003) e exposições múltiplas ao vírus geram produções em níveis diferentes de citocinas pelos linfócitos e contribuem para a maior gravidade da doença (Bashyam et al, 2006; Beaumier et al, 2008, Weiskopf et al., 2014).

Polimorfismos genéticos em genes envolvidos com a resposta imunológica podem ter um efeito significativo sobre o desenvolvimento clínico da dengue (Fang et al., 2012), pois o patrimônio genético de um indivíduo pode influenciar significativamente nos resultados de uma infecção viral e a identificação de genes envolvidos na susceptibilidade ou resistência ao vírus tem aumentado a compreensão de muitos processos de doenças virais (Brinton, 2002). Portanto, pesquisas sobre doenças infecciosas fornecem importantes informações a respeito da regulação genética do hospedeiro e a variabilidade fenotípica do quadro clínico (Chapman e Hill, 2012).

Os indivíduos que são homozigotos para o alelo mutante CCR5 são altamente resistentes à infecção pelo HIV-1. Embora a homozigosidade para a mutação CCR5 Δ 32 esteja claramente associada com a resistência à infecção por HIV-1 e tem sido relatada em pacientes hemofílicos (O'Brien et al., 1997). Segundo Stephens et al. (1998), uma possível pressão de seleção, exercida por patógenos como *Yersinia pestis* (o agente etiológico da peste bubônica), *Shigella*, *Salmonella*, e *Mycobacterium tuberculosis*, ou por alguma outra infecção tal como sífilis, varíola e gripe, justificaria a alta frequência de CCR5 Δ 32 encontrada em Europeus. Porém, não há estudos que associem este gene com proteção ao DENV ou piora do quadro clínico.

A Interleucina 4 (IL-4), tem um comprovado efeito hepatoprotetor durante a infecção por dengue (Iseki et al., 2012). Porém seu nível apresenta-se aumentado em pacientes diabéticos infectados com DENV (Lee et al., 2013). Em paciente infectados com HIV-1, o SNP de IL-4 rs2243250, localizado na região promotora, apresentou resultados inconclusivos em caucasianos (Fellay et al., 2009). Além disso, a relação da variação do gene de IL-4 com a suscetibilidade ou resistência ao DENV e suas formas clínicas não está clara, uma vez que não são encontrados estudos a respeito.

As baixas expressões do fator de transcrição Th1(T-bet) e maiores níveis de citocinas (interleucina-10, IL-10) em população do sul de Taiwan estão associados com a patogênese de febre hemorrágica da dengue (FHD) (Chen et al., 2005). Embora não se tenha estudos conclusivos sobre SNP no gene de IL-10 associado a sua participação no quadro clínico de pacientes com dengue.

Os genes Ly-6 são genes candidatos particularmente atrativos para a suscetibilidade, pois eles codificam uma proteína de superfície celular de GPI-ancorado (Bamezai, 2004), um grupo de aloantígenos relatados primeiramente em linfócitos de camundongos na década de 1970 (McKenzie et al., 1977). Um conjunto de dados gerados com anticorpos policlonais e monoclonais contra proteínas Ly-6 revelaram uma ampla expressão tecidual em células de origem hematopoiéticas. Além disso, a expressão de proteínas Ly-6 também tem sido observada em células não-hematopoiéticas (Halloran et al., 1981). Embora as proteínas Ly-6 tenham sido reconhecidas pelo seu uso como antígenos de diferenciação por um certo tempo, sua função na diferenciação celular ainda é emergente. Apesar de sua importância no sistema imunológico, não se tem informação, até então, de estudos que demonstrem a associação dos diversos genótipos de Ly-6 com a infecção do DENV.

Este estudo objetivou avaliar a relação entre os genótipos dos marcadores CCR5 e SNP's IL-4 (rs 2243250), IL-10 (rs 1800896) e Ly-6 (rs 2572886), com os casos de dengue clássica, associando-os a gênero, local de nascimento e raça declarada, na cidade de Serra Talhada, Pernambuco.

METODOLOGIA

Desenho de estudo e estratégia de pesquisa

Inicialmente foi feito um levantamento no banco de dados do Núcleo de Vigilância em Saúde (NVS) da Secretaria de Saúde de Serra Talhada – PE, onde foram identificados 518 casos de dengue confirmados como teste (Elisa IgM), no período de diagnóstico de 2010 a 2014.

Critério de inclusão

Os critérios de inclusão foram: Pessoas de ambos os sexos com sorologia positiva para dengue, faixa etária de 18 a 65 anos, onde apenas 256 indivíduos puderam ser enquadrados.

Questões éticas e coleta do material

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do centro de ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, parecer 870.891. Os indivíduos identificados foram convidados a participar, assinaram um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) e responderam um questionário sobre dados pessoais, socioeconômicos e estado de saúde, de abril a maio de 2015 e em seguida foi coletado 4 ml de sangue periférico com anticoagulante EDTA.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada seguindo a técnica de extração *Mini Salting out* (Miller *et al.*, 1988). Em seguida, o DNA foi quantificado com espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e diluído para a concentração mínima necessária para as reações de PCR.

Seleção dos SNP's

Em virtude de seus respectivos papéis na resposta imunológica a infecções virais e doenças autoimunes e contagiosas, foram selecionados os SNP dos genes Ly-6 (rs2572886), IL-4 (rs2243250) e IL-10 (rs1800896). O IL- 4 está localizado na região promotora -589C>T, IL-10 na -819C>T e Ly-6 na -1089A>G.

Reação em Cadeia Polimerase do gene CCR5

As reações de PCR para o gene CCR5 foram realizadas sob as seguintes condições: foram usados 12.5 µL de Mix Go Taq Colorless (Promega, Fitchburg, WI, USA), 9.5 µL de água livre de nuclease, 1 µM de cada primer (Forward 5'-

ATCACTTGGGTGGTGGCTGTGTTTGCCTC -3 ' e reverse 5'-

AGTAGCAGATGACCATGACAAGCAGCGG -3 ') e 1 µL de DNA molde com concentração

média de 50 ng. O volume final das reações era de 25 µL e foram realizadas em um termociclador Multigene OptiMax TC 9610 (LABNET, Edison, NJ, USA) com os seguintes ciclos: 1 ciclo com 94 °C por 5 minutos e 35 ciclos a 56° temperatura de anelamento por 30 segundos; 72 °C por 1 minuto, 72 °C por 7 minutos e por fim 4 °. Em seguida foi realizada a eletroforese com gel de agarose a 2,5%.

PCR em tempo real (qPCR)

Foram analisados os SNP's Ly-6, IL-4 e IL-10 em um termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. As reações foram realizadas segundo o fabricante do equipamento com adaptações, utilizando 0,5 µL da sonda, 3,5 µL de água livre de DNA, 4,5 de Master mix taqman e 1 µL de DNA molde (50 ng).

Análise Estatística

Os dados da genotipagem dos pacientes foram utilizados para análise de comparação dos pacientes “caso” nascido em Serra Talhada e os nascidos em outras cidades, tanto para o marcador CCR5 como para os SNP's.

Análise de CCR5

Após as corridas eletroforéticas as amostras foram classificadas fenotipicamente de acordo com as bandas apresentadas. Ao apresentar uma única banda de 193 pares de base (pb), foram considerados selvagens (wtccr5/wtccr5), quando apresentaram uma banda de 193 e outra de 161 pb heterozigotos (wtccr5/CCR5Δ32) e ao apresentar uma única banda de 161 pb homozigoto mutante CCR5Δ32.

Em seguida, as frequências alélicas, genotípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram calculadas através do programa *online* GENEPOP.

Análise de SNP's

Para a análise de comparação dos dados dos SNPs para IL-4, IL-10 e Ly-6, também foram analisados frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas, além da correlação com a variável local de nascimento e sexo, utilizando os programas *online* SNPStats (Solé *et al.*, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o banco de dados do Núcleo de Vigilância em Saúde (NVS) de Serra Talhada, de 2010 a 2014, foram confirmados, na cidade, 288 casos de dengue com pessoas que estariam entre 18 e 65 anos de idade no momento da coleta. Destes, 73 tinham informações pessoais incompletas (bairro, logradouro, número da residência, etc) e por isso não puderam ser localizados, 71 haviam se mudado e 114 foram encontrados. No entanto, 13 pessoas se recusaram a participar e apenas 101 voluntários foram incluídos na pesquisa, os quais residiam em 12 bairros (figura 1). Devido limitação logística, os casos registrados nos distritos e zonas rurais não foram incluídos.

A ausência de casos de Febre da Dengue Hemorrágica (FDH), no banco de dados do NVS, gerou dificuldade na análise dos dados. Pois apenas uma pessoa, menor de idade, estava presente na planilha. No entanto, encontramos dois casos por comunicação verbal de outros envolvidos na pesquisa. Isto se dá em virtude da falta de infraestrutura e preparo técnico dos profissionais de saúde que atuam no município, que gera transferência dos casos mais graves para outros municípios. Além disso, fatores como: estar enfrentando uma hiperepidemia de dengue e vírus Zika, falta de kit diagnósticos a partir do mês de março de 2015 e alto nível de subnotificação, dificultaram a busca por controles negativos (pessoas que nunca tiveram dengue). Ademais, dentre os indivíduos amostrados, apenas três tiveram dengue comprovadamente mais de uma vez. Deste modo, retirou-nos a possibilidade de comparar

peessoas com infecções primárias e pessoas com infecções secundárias ou terciárias. Portanto, apenas análises descritivas foram realizadas na população global e em duas subpopulações.

Infecções secundárias permitem uma maior viremia no soro e um maior risco de doença severa comparada com as infecções primárias sugerindo fortemente que a imunidade pré-existente (não necessariamente anticorpo) para DENV é um fator de risco para dengue severa (Wahala et al., 2011).

Em 2010 foram estimados 96 milhões de casos sintomáticos e 293 milhões assintomáticos no mundo (Murray et al., 2013; Bhatt et al., 2013). No entanto, o número real de casos não poderia ser identificado, uma vez que, ocorrem sub/super-notificações ou erros de diagnóstico dos casos (Bhatt et al., 2013; Messina et al., 2014). Existem também outros elementos, relacionados como os determinantes sociais de saúde (DSS's), os quais são fatores individuais, sociais ou relacionados aos sistemas de saúde que influenciam no status de saúde de indivíduos e da sociedade (Solar e Irwin, 2010; Marmot e Wilkinson, 2003; CSDH, 2008).

Menos de 3% de pacientes de dengue desenvolvem as formas severas (FDH) após uma fase aguda normal, caracterizada pelo aumento na permeabilidade capilar e resultando em extravasamento de plasma que pode levar ao choque circulatório e morte (Oliveira-Pinto et al., 2012).

A etnia, o gênero e a capacidade de pagar pelo serviço de saúde também são conhecidos por desempenhar um papel na presença e manutenção da dengue (Guzman e Kouri, 2002; Blas e Kurup, 2010; Carabali e Hendrickx, 2012; Khun e Manderson, 2008). No entanto, as informações sobre o papel que poderia desempenhar a síndrome de choque da dengue (SCD) na mortalidade é muito limitada (Carabali et al., 2015). Em nossos estudos, a maioria são mulheres, se declaram brancas, possuem renda média de até dois salários mínimos e ensino médio. Não havendo diferença significativa do número de casos para estas variáveis entre os bairros da cidade de Serra Talhada.

Por meio da análise de associação dos genótipos e o local de nascimento, ambos os critérios apontaram os mesmos modelos para os loci de SNP estudados, tanto o critério de informação de Akaike (AIC), como o critério de informação Bayseana (BIC).

Nove haplótipos foram formados para os marcadores utilizados neste estudo, onde o p-valor, tanto para a associação global, como para a associação dos haplótipos com o sexo, não foi estatisticamente significativo. Portanto, não é um caráter ligado nem influenciado pelo sexo.



Figura 1. Mapa da cidade de Serra Talhada mostrando os bairros de acordo com a Secretaria de Obras do Município. Contornados em vermelho, bairros com situação de saneamento básico precário, em laranja situação de saneamento básico regular e em azul situação satisfatória.

Caracterização da amostra

Dentre os 101 indivíduos, 31 eram homens e 70 mulheres; Declararam-se 65 (0,644) indivíduos brancos, 29 (0,287) pardos e 7 (0,069) negros. Considerando as subpopulações: Serra Talhada: brancos 42 (0,65), pardos 19 (0,29) e negros 3 (0,04); nascidos em outras cidades: brancos 23 (0,62), pardos 10 (0,27) e negros 4 (0,11), a maioria tinha de 42 a 65 anos de idade, com escolaridade prevalente do ensino médio e renda média de até dois salários mínimos (tabela 1). Os critérios de classificação em relação a raça declarada e a renda, seguiram o modelo utilizado pelo censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

VARIÁVEIS x BAIRRO	Centro (26)	A. Conc. (08)	Cagepe (08)	S. Crist. (08)	Caxix. (02)	Bomba (01)	Mut. (02)	Borb. (04)	Cohab (09)	A.B.J. (08)	AABB (15)	IPSEP (10)	Total (101)
GÊNERO													
Masculino (31)	6	2	1	2	2	-	2	-	2	3	5	6	31
Feminino (70)	20	6	7	6	-	1	-	4	7	5	10	4	70
RAÇA DECLARADA													
Branços	21	3	1	7	1	1	1	2	8	5	11	4	65
Pardos	4	3	5	1	1	-	1	2	1	3	3	5	29
Negros	1	2	2	-	-	-	-	-	-	-	1	1	7
FAIXA ETÁRIA													
18 a 41	10	1	4	3	2	1	2	3	5	5	8	5	49
42 a 65	16	7	4	5	-	-	-	1	4	3	7	5	52
ESCOLARIDADE													
Analfabeto	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2
Fundamental	1	2	4	4	1	-	1	1	4	4	2	3	27
Ensino Médio	12	2	4	3	1	1	1	2	3	3	4	4	40
Superior	11	3	-	1	-	-	-	1	-	1	4	2	23
Pós-graduado	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	9
RENDA													
Nenhuma	2	1	1	4	-	-	-	2	4	1	2	2	19
Até 2 SM	10	4	7	2	2	1	1	2	4	4	3	2	42
De 2 a 4 SM	8	2	-	1	-	-	1	-	1	3	5	5	26
Mais de 4 SM	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Outro	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	13

Tabela 1. Caracterização do grupo caso relacionando os bairros com as variáveis: gênero, raça declarada, faixa etária, escolaridade e renda. A. Conc. – Bairro do Alto da Conceição; S.Crist. - Bairro de São Cristovão; Mut. - Bairro do Mutirão; Borb. - Bairro da Borborema; A.B.J. - Bairro do Alto do Bom Jesus; Centro – Bairro do Centro; Caxix. – Bairro da Caxixola; Bomba – Bairro da Bomba; Cohab – Bairro da Cohab; AABB – Bairro da AABB; IPSEP – Bairro do IPSEP; Cagepe – Bairro do Cagepe.

De acordo com a tabela 1, podemos observar que o Bairro do Centro foi o que apresentou o maior número de casos coletados (26), enquanto que os Bairros do Mutirão e Caxixola, apresentaram o menor número, ambos com dois casos coletados. Estes bairros, também foram os únicos a apresentar só indivíduos do sexo masculino. Com exceção dos Bairros do IPSEP e Cagepe, que apresentaram maior número de indivíduos pardos, todos os outros apresentaram maior ou igual proporção de brancos. Em relação a faixa etária, a distribuição de indivíduos não apresentou diferença significativa. No entanto, no que diz respeito a escolaridade, o Bairro do Centro e o da AABB, foram os que apresentaram maior número de indivíduos com ensino superior e pós-graduação, consequentemente as maiores rendas médias.

Análise de CCR5

Após a corrida eletroforética, os fenótipos foram identificados como 99,98% do tipo 193/193 (wtccr5/wtccr5) homozigoto para o alelo selvagem, 0,02% do tipo 193/161 (wtccr5/CCR5 Δ 32) heterozigoto e não foram encontrados indivíduos homozigotos para CCR5 Δ 32 (161/161).

A análise de frequência genotípica de CCR5 pelo software *online*, GENEPOP 1.2 concluiu que o locus está em equilíbrio de acordo com Hardy-Weinberg (HW), apresentando p-valor igual a 1 (Tabela 2).

CCR5 (n=101)			
	193/193	193/161	161/161
Obs	99	2	0
Esp	99,005	1,99	0,005
P-valor = 1			

Tabela 2. Teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg.
Obs. – observado; e Esp. - esperado

Dentre os 101 indivíduos amostrados para análise, 70 mulheres e 31 homens, apenas dois são heterozigotos para este locus, apresentando alelos com a deleção CCR5 Δ 32 (Tabela 3). Destes, um homem nascido em Serra Talhada, que desenvolveu febre de dengue hemorrágica (FHD) e uma mulher nascida em Santa Cruz da Baixa Verde - PE (Tabela 4).

CCR5 (n=101)						
Grupo caso			Outras cidades		Serra Talhada	
Alelo	Quantidade	Proporção	Quantidade	Proporção	Quantidade	Proporção
193	200	0.99	73	0.99	127	0.99
161	2	0.01	1	0.01	1	0.01
Genótipo						
193/161	2	0.02	1	0.03	1	0.02
193/193	99	0.98	36	0.97	63	0.98

Tabela 3. Frequência alélica e genotípica para CCR5.

Por meio da análise de interação entre o local de nascimento e sexo, observa-se que não há diferença significativa para os genótipos para estas variáveis (p-valor = 0,13).

CCR5 (n=101)						
	F			M		
	Outras cidades	Serra Talhada	OR (95% IC)	Outras cidades	Serra Talhada	OR (95% IC)
193/193	27	42	1.00	9	21	1.50 (0.60-3.76)
193/161	1	0	0.00	0	1	---
P-valor da interação: 0.13						

Tabela 4. Análise de interação por classificação cruzada de CCR5 e SEXO. F – fêmea; M – macho; OR – Odds Ratio; e IC – intervalo de confiança.

Outros estudos epidemiológicos realizados no Brasil, com base no banco de dados do sistema de Saúde Pública, têm mostrado uma maior incidência global de dengue em mulheres, quando todas as formas clínicas são consideradas (de Mattos Almeida et al., 2007; Teixeira et al., 2002; Nunes-Araújo et al., 2003; Montenegro et al., 2002; Duarte e França, 2006). Portanto, é possível que as desigualdades de sexo em cuidados médicos sejam a fonte da tendência para o aumento do diagnóstico de dengue em mulheres da população de baixa renda, bem como o êxodo de homens no período de longa estiagem e a proporção naturalmente maior de mulheres. A razão para a maior incidência de dengue hemorrágica em mulheres nesta coorte precisa ser mais estudada (Cordeiro et al., 2007).

Ank et al. (2005), estudando infecção experimental com vírus da herpes simples tipo 2 (HSV-2), utilizando ratos CCR5 Δ 32/ CCR5 Δ 32, que apresentaram maior titulações no cérebro do que os controle tipo selvagem, mas foram capazes de limpar a infecção. Lim et al. (2008), obtiveram resultados similares em estudos de coorte em pacientes infectados por vírus do oeste do Nilo, no qual mostrou um risco aumentado de infecções sintomáticas no homozigoto da CCR5 Δ 32. Segundo Telenti (2009), outras infecções por *flavivirus*, tais como a encefalite do carrapato, uma infecção endêmica da Europa e Ásia, foram encontradas por estar associadas com os alelos delta 32. Em nossos estudos, até então, não foram encontrados associação entre os genótipos e a ocorrência de dengue, seja na forma clássica, seja nas formas mais graves em virtude do pequeno número de indivíduos com FHD.

Análise de SNP's

De acordo com a análise dos *loci* IL-4 e IL-10, houve desequilíbrio para a população global, bem como para a subpopulação de Serra Talhada, segundo o teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). O que pode ser explicado pela ausência de uma população controle e/ou número pequeno de amostras. Segundo Clarke et al. (2011), para uma associação seria necessário um grupo controle, pois ocorrem problemas de qualidade de dados ou de amostragem estatística, ou por causa de confusão pela estratificação da população ou da mistura. No entanto, para Ly-6 o mesmo não ocorreu. Certamente pelo fato de se tratar de uma família de genes, levando ao aumento da chance de encontrar um dos *loci*, os alelos analisados.

IL-4 (n=101)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-valor
Grupo caso	36	58	7	130	72	0.017
Outras cidades	12	21	4	45	29	0.32
Serra Talhada	24	37	3	85	43	0.025
IL-10 (n=100)						
Grupo caso	47	36	17	130	70	0.047
Outras cidades	15	15	6	45	27	0.49
Serra Talhada	32	21	11	85	43	0.047
Ly-6 (n=96)						
Grupo caso	70	25	1	165	27	0.69
Outras cidades	25	9	1	59	11	1
Serra Talhada	45	16	0	106	16	0.58

Tabela 5. Teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg

A título de referência, comparamos os nossos resultados com as populações globais, para observarmos semelhanças e diferenças com a mesma; ibérica, em virtude a contribuição de nossos ancestrais vindos desta região da Europa; africana, devido à contribuição dos escravos oriundos da África e que aqui ficaram, contribuindo para a nossa miscigenação; e peruana, por causa de sua composição étnica semelhante a nossa. No entanto, não foi possível utilizarmos dados sobre ameríndios, uma vez que esta informação ainda não se encontra disponível.

Ao analisarmos as frequências dos alelos, T e C para o SNP IL-4, observamos uma diferença

proporcionalmente significativa em relação às populações global, ibérica, peruana e africana. Porém o mesmo não ocorre para os mesmos alelos em SNP IL-10. Para o SNP Ly-6, as frequências das bases A e G, são semelhantes em relação à população global, mas apresenta diferença significativa para populações ibérica, peruana e africana (tabela 6).

No que tange às frequências genotípicas, em IL-4 o genótipo CC apresentou valores similares apenas em relação às populações globais e peruanas. Enquanto que para os genótipos CT e TT, as diferenças foram proporcionalmente significativas em relação a todas as populações utilizadas como referência. Em IL-10, apenas para o Genótipo TT houve diferença significativa quando comparada à população Ibérica, que interessante, foi a única que apresentou valores semelhantes para os demais genótipos deste *locus*. Para Ly-6 a frequência do genótipo GG foi proporcionalmente significativamente diferente em relação à população africana. Porém, os genótipos AG e AA apresentaram frequências proporcionalmente significativa diferentes em relação às populações Ibérica, Peruana e Africana (tabela 6).

Marcador	Global *	Ibéricos *	Peruanos *	Africanos *	Grupo caso	Serra Talhada	Outras cidades
IL-4							
Alelo							
T	0,47	0,14	0,48	0,73	0,36	0,34	0,39
C	0,53	0,86	0,52	0,27	0,64	0,66	0,61
Genótipo							
CC	0,361	0,702	0,327	0,076	0,36	0,375	0,324
CT	0,339	0,260	0,490	0,389	0,57	0,578	0,568
TT	0,300	0,038	0,184	0,536	0,07	0,047	0,108
IL-10							
Alelo							
T	0,73	0,58	0,75	0,69	0,65	0,66	0,625
C	0,27	0,42	0,25	0,31	0,35	0,34	0,375
Genótipo							
TT	0,554	0,355	0,576	0,464	0,47	0,500	0,42
CT	0,348	0,458	0,353	0,446	0,36	0,328	0,42
CC	0,098	0,187	0,071	0,089	0,17	0,172	0,16
Ly-6							
Alelo							
A	0,15	0,04	0,09	0,223	0,14	0,13	0,16
G	0,85	0,96	0,91	0,777	0,86	0,87	0,84
Genótipo							
GG	0,732	0,925	0,823	0,054	0,73	0,74	0,71
AG	0,238	0,065	0,177	0,607	0,26	0,26	0,26
AA	0,03	0,009	-	0,339	0,01	-	0,03

Tabela 6. Comparação das frequências alélicas e genotípicas entre: população Global, população da península ibérica, população Peruana, População Africana, Grupo caso, sub-população de Serra Talhada e sub-população dos indivíduos nascidos em outras cidades.

*Fonte: 1000 genomes Project, disponível em: www.1000genomes.org/Browser.

Conforme apresentado na tabela 7, nenhum dos genótipos apresentaram valores significativos para os modelos que melhor representa a análise de associação dos genótipos e o local de nascimento. Para estes critérios os *loci* IL-4 e Ly-6 são melhores representados pelo modelo recessivo, enquanto que IL-10, pelo modelo sobredominante.

IL-4 (n=101)				
Modelo	Genótipo	Outras cidades	Serra Talhada	P-valor
Codominante	C/C	12 (32.4%)	24 (37.5%)	0.5
	C/T	21 (56.8%)	37 (57.8%)	
	T/T	4 (10.8%)	3 (4.7%)	
Dominante	C/C	12 (32.4%)	24 (37.5%)	0.61
	C/T-T/T	25 (67.6%)	40 (62.5%)	
Recessivo	C/C-C/T	33 (89.2%)	61 (95.3%)	0.25
	T/T	4 (10.8%)	3 (4.7%)	
Sobredominante	C/C-T/T	16 (43.2%)	27 (42.2%)	0.92
	C/T	21 (56.8%)	37 (57.8%)	
Log-aditivo	---	---	---	0.35
IL-10 (n=100)				
Modelo	Genótipo	Outras cidades	Serra Talhada	P-valor
Codominante	T/T	15 (41.7%)	32 (50%)	0.66
	T/C	15 (41.7%)	21 (32.8%)	
	C/C	6 (16.7%)	11 (17.2%)	
Dominante	T/T	15 (41.7%)	32 (50%)	0.42
	T/C-C/C	21 (58.3%)	32 (50%)	
Recessivo	T/T-T/C	30 (83.3%)	53 (82.8%)	0.95
	C/C	6 (16.7%)	11 (17.2%)	
Sobredominante	T/T-C/C	21 (58.3%)	43 (67.2%)	0.38
	T/C	15 (41.7%)	21 (32.8%)	
Log-aditivo	---	---	---	0.61
Ly-6 (n=96)				
Modelo	Genótipo	Outras cidades	Serra Talhada	P-valor
Codominante	G/G	25 (71.4%)	45 (73.8%)	0.36
	A/G	9 (25.7%)	16 (26.2%)	
	A/A	1 (2.9%)	0 (0%)	
Dominante	G/G	25 (71.4%)	45 (73.8%)	0.8
	A/G-A/A	10 (28.6%)	16 (26.2%)	
Recessivo	G/G-A/G	34 (97.1%)	61 (100%)	0.15
	A/A	1 (2.9%)	0 (0%)	
Sobredominante	G/G-A/A	26 (74.3%)	45 (73.8%)	0.96
	A/G	9 (25.7%)	16 (26.2%)	
Log-aditivo	---	---	---	0.61

Tabela 7. Distribuição de genótipos conforme análise dos SNP's com local de nascimento.

De acordo com a estimativa de formação de haplótipos para os marcadores CCR5, IL-4, IL-10 e Ly-6, obtivemos nove combinações. Segundo a análise de associação global de haplótipos, as diferenças entre as frequências não foi significativa (p -valor= 0,73). Assim como a associação dos haplótipos com o sexo (p -valor = 0,18) (dados não mostrados). A análise de associação dos genótipos e sexo, não apresentou diferença significativa (tabela 8)

Quando analisado o desequilíbrio de ligação, o parâmetro D' (normalização de D), não apresentou valores significativos. Todavia, para o parâmetro r (coeficiente de correção), mostrou valores significativos, embora o p -valor não o tenha ratificado.

IL-4 (n= 101)				
Sexo	Genótipos	Outras cidades	Serra Talhada	OR (95% I. C.)
F	C/C	10	14	1.00
	C/T	17	26	1.09 (0.40-3.02)
	T/T	1	2	1.43 (0.11-18.00)
M	C/C	2	10	1.00
	C/T	4	11	0.55 (0.08-3.68)
	T/T	3	1	0.07 (0.00-1.02)
Teste para interação na tendência: 0.24				
IL-10 (n= 100)				
Sexo	Genótipos	Outras cidades	Serra Talhada	OR (95% I. C.)
F	T/T	11	21	1.00
	T/C	12	15	0.65 (0.23-1.88)
	C/C	4	6	0.79 (0.18-3.38)
M	T/T	4	11	1.00
	T/C	3	6	0.73 (0.12-4.39)
	C/C	2	5	0.91 (0.12-6.72)
Teste para interação na tendência: 0.99				
Ly-6 (n= 96)				
Sexo	Genótipos	Outras cidades	Serra Talhada	OR (95% I. C.)
F	G/G	18	31	1.00
	A/G	7	9	0.75 (0.24-2.35)
	A/A	1	0	0.00
M	G/G	7	14	1.00
	A/G	2	7	1.75 (0.29-10.74)
	A/A	0	0	---
Teste para interação na tendência: 0.43				

Tabela 8. Análise de associação de genótipos de SNP's entre sexos.

IL-4

As funções efectoras de IL-4 são importantes na resposta immune para uma variedade de infecções e estão também claramente implicados na patogênese de doenças atópicas (Abbas *et al.*, 1996).

Segundo Fraser et al. (2008), o SNP IL-4 -590 (C>T) apresenta uma marcada tendência a associação com pré-eclampsia ($x^2 = 5.87$, $P = 0.055$), em mulheres do Reino Unido, com maior proporção de mulheres homozigotas para o genótipo TT no grupo pré-eclampsia (95% IC), estando todos os genótipos investigados em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Chinoy et al. (2007), observou que IL-4 confere suscetibilidade à miopatia idiopática inflamatória (MII), em populações do Reino Unido, encontrando um forte desequilíbrio de ligação entre os SNPs, onde a região codificante para IL-4 não apresentou associação significativa com suscetibilidade (MII).

No entanto, os estudos citados anteriormente não utilizaram o mesmo SNP que nós usamos, o IL-4 rs 2243250 , posição -589 (C>T). Além disso, não há estudos, até o momento, que relacione este marcador à infecção por outro arborivirus, como o DENV.

Em um estudo de meta-análise, Cui et al (2013) sugeriram que os SNP's de IL-4 rs2243250, rs2070874 e rs2227284 podem desempenhar um importante papel na resposta à vacina de hepatite B, especialmente em populações asiáticas. Segundo Lu et al. (2014), o genótipo CC do SNP rs2243250, está associado com hepatite B crônica.

Durante nossos estudos, não foram encontrados indivíduos asiáticos ou com hepatite. Além disso, não foi possível afirmar correlação de nenhum dos genótipos com os casos de FD em virtude da ausência de um grupo controle ou com FHD.

No entanto, ao compararmos as frequências alélicas e genotípicas de IL-4 com outras populações, observamos uma diferença significativa em relação às populações global, ibérica, peruana e africana para ambos os alelos. Além disso, o genótipo CC apresentou valores similares apenas em relação às populações globais e peruanas, ocorrendo o contrário para os demais.

IL-10

Amre et al. (2009), avaliaram a associação de SNPs IL-10, que estavam em alto desequilíbrio de ligação (DL) ($r^2 \geq 0.80$) com outros SNPs e que eram frequentes (alelo de menor

frequência $\geq 10\%$), utilizando os dados de genótipos disponíveis para populações caucasianas de descendência Europeia. O teste de associação alélica revelou que dois SNPs, rs2222202 e rs1800871 foram significativamente associados com a doença de Crohn (P-valor 0,03 e 0,05 respectivamente). Para a análise de haplótipos, dos mesmos marcadores, o teste global foi significativo (P = 0,04) e dois haplótipos (TC e CT) foram significativamente associados com doença de Crohn. O haplótipo TC foi relacionado por conferir risco, enquanto que o haplótipo CT foi protetor.

Ainda não é bem compreendida a função da produção de IL-10 no complexo imunológico em relação a evolução clínica da forma severa da infecção por DENV, mas pode ser responsável pela mudança observada de linfócito T helper 1 (Th1) para Th2 na FDH (Chaturvedi et al., 1999). Além disso, pontos de mutação nos promotores de IL-10, na posição -1082 A/G, -819 C/T, e -592 C/A, resulta no polimorfismo que diferencia os monócitos em altos, intermediários e baixos produtores de IL-10, respectivamente. A correlação destes fenótipos com a severidade da doença requer mais investigações. Embora seja o mesmo gene, não se trata do mesmo SNP utilizado em nosso estudo.

Truelove et al. (2008), encontrou uma associação significativa (P=0,02) do genótipo CC com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes com infecção crônica do vírus da hepatite tipo B em Afroamericanos nos Estados unidos para o SNP rs1800896. Enquanto que Vidal et al. (2012), estudando o mesmo SNP em pacientes HIV coinfectados com o vírus da hepatite C em caucasianos da Espanha, não encontraram nenhuma associação.

Para Perez et al. (2010), é possível que uma expressão insuficiente de IL-10 durante a infecção secundária de dengue, pelo menos na sequência de DENV-1/DENV-2, poderia ser associada com uma regulação imune ineficiente.

Omrani et al. (2010), baseados nos achados de um estudo de associação com rejeição de transplantados renais, concluiu que o polimorfismo do gene da citocina IL-10, dentre outros

SNPs não atua na principal função de sobrevivência de transplantados renais, e outros fatores genéticos potenciais deveriam ser considerados.

De acordo com Turner et al. (1997), vários estudos tem mostrado que a capacidade para a produção de IL-10 em indivíduos parece ser influenciados pelo patrimônio genético, o que explicaria o fato de que algumas células tumorais produzam IL-10. Ademais, vários grupos tem proposto IL-10 como um gene candidato para suscetibilidade a câncer para o genótipo CC (Zoodsma et al., 2005).

Torres-Poveda et al. (2012), analisando a associação de SNP e o risco aumentado de desenvolvimento de lesão cervical por papilomavirus humano (HPV), mostrou que os indivíduos que são portadores do polimorfismo heterozigoto de IL-10 -592 C/A tinham o dobro do risco de desenvolver lesão cervical (95% I.C.), $p = 0.007$, quando comparados com o grupo controle, e que portar duas cópias do alelo A confere o risco aumentado em duas vezes de desenvolver lesão cervical (95% CI), $p = 0.02$. O SNP – 592 C/A do promotor de IL-10 pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de lesão de HPV em mulheres mexicanas, potencialmente associados com a produção de altos níveis de IL-10 em nível sistêmico e cervical, o que favorece a persistência viral e o desenvolvimento de lesão cervical.

Pacientes com FHD tem níveis reduzidos de óxido nítrico (NO) e níveis aumentados de IL-10 no sangue, quando comparados com os pacientes acometidos com a forma branda. Em outros estudos, durante a fase aguda da forma severa, são notados produção aumentada de IL-10 e baixa regulação de múltiplos genes regulatórios de IFN (Nguyen et al., 2004; Chen et al, 2006; Simmons et al., 2007).

Ama et al. (2005), estudando populações japonesas, avaliou a associação de IL-10 819 T/C com relação a idade ou gênero com a distribuição dos genótipos de cada SNP por um teste quiquadrado convencional, que permaneceu significativo após a análise de regressão logística multivariada. Para ademais avaliações de associações de IL-10 819 T/T com a idade, os autores dividiram a população em quatro grupos (duas décadas cada) como segue: 19-40 anos; 41-60

anos; 61-80 anos; 81-100 anos e a frequência de IL-10 819 T/T foi comparado entre estes quatro grupos. E foi aparentemente aumentada nos grupos de faixa etária mais alta (61–80 e 81–100) comparada com grupos de faixa etária menor (19–40 e 41–60).

Em relação à comparação da frequência alélica de IL-10 de nossos estudos e das populações utilizadas como referência, não houve diferença significativa. Porém, na comparação das frequências genotípicas, apenas TT apresentou diferença significativa quando comparada à população Ibérica, que interessante, foi a única que apresentou valores semelhantes para os demais genótipos.

Apesar do alelo IFN- γ (-874) T em combinação com a produção baixa do genótipo TGF- β 1 ou haplótipo IL-10, também mostraram associação significativa com FHD (Mangada et al., 2002). Similarmente, os baixos níveis de IL-10/TGF- β também pode predispor um indivíduo produtos de IFN- γ para FHD. A análise de interação entre diferentes genes estariam indicando que uma resposta exagerada pró-inflamatórias, sem uma regulação anti-inflamatório suficiente oportuna e está envolvida no desenvolvimento de doença grave. Vários distúrbios de um único gene têm sido envolvidos na propensão alterada a sofrer doenças infecciosas. Dengue, como outras doenças complexas, é provavelmente influenciado por mudanças sutis em vários genes. Nossos resultados fornecem novas evidências sobre a função de citocinas TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 na dengue (Perez et al., 2010).

Ly-6

Os genes Ly-6 são candidatos particularmente atrativos para os estudos de suscetibilidade, pois eles codificam uma proteína de superfície celular de GPI-ancorado (Bamezai, 2004). Os membros da família Ly-6 também tem sido identificados como fatores importantes do hospedeiro, podendo influenciar na replicação viral em vários tipos de vírus causadores de encefalite (Kenzy et al., 1973; Turtle et al, 2012; Wiley et al., 1991; Mims, 1957). Em camundongos, quatro genes de Ly-6 são mais altamente superregulados durante a infecção por linhagens altamente neuroinvasivas pelo arbovírus do oeste do Nilo do que por linhagens que

são menos neuroinvasivas (Venter et al., 2005). Mais recentemente, o Ly-6E humano foi demonstrado por afetar a infecção do vírus do Oeste do Nilo (Krishnan et al., 2008).

Além disso, o Ly-6E humano aumenta a replicação viral de outros flavivirus, como o vírus da febre amarela (Schoggins et al., 2011) e também foram implicados em duas análises separadas para fatores de suscetibilidade para HIV (Loeuillet et al., 2008; Brass et al., 2008). Estes resultados indicam que os genes Ly-6 são fatores de suscetibilidade para diversos vírus de RNA e DNA (Hsu et al., 2012).

Para o SNP Ly-6, as frequências das bases A e G, são semelhantes em relação à população global, mas apresenta diferença significativa para as demais populações referenciadas. Mas em relação à frequência genotípica, o genótipo GG foi significativamente diferente em relação à população Africana. Enquanto que os genótipos AG e AA apresentaram frequências significativamente diferentes em relação às populações Ibérica, Peruana e Africana.

Um estudo retrospectivo baseado em hospitais foi conduzido no qual a presença de sangramento espontâneo, hepatomegalia, sinais de rompimento capilar tais como ascite e efusão pleural, leucopenia $< 4.000 \text{ mm}^3$ e idade menor que cinco anos foram encontrados como sendo um significativo fator de risco de síndrome de choque da dengue (SCD) em pacientes pediátricos com FHD (Gupta et al. 2011).

A aparente baixa taxa de pacientes infectados na faixa etária < 15 anos também tem sido relatado em outros estudos no Brasil (Teixeira et al., 2002; Nunes-Araújo et al., 2003; Montenegro et al., 2002) e provavelmente espelha a subestimação de casos de dengue em crianças, em quem é mais branda e frequentemente confundida com outras doenças exantemáticas, de acordo com nossos dados de soroprevalência preliminares obtidos nessa faixa etária (Cordeiro et al., 2007).

Segundo Cordeiro et al. (2007), quando comparada aos casos de FHD na Ásia, a taxa equilibrada entre a infecção primária e secundária encontrada em crianças e adolescentes até 15 anos de idade com FHD sugere que, neste grupo, algum outro mecanismo, que não seja

dependente de anticorpo-realce ou infecção sequencial, pode desempenhar um papel modulador das respostas imunes em alguns pacientes e levar ao desenvolvimento da forma mais grave da doença. Entre outras razões, essas diferenças podem ser causadas pelas características epidemiológicas distintas de infecções de dengue no Brasil.

A razão para a presença de baixos índices de casos de FHD/SCD no Brasil ainda precisa ser mais estudada, considerando a possibilidade de uma alta prevalência de genes de resistência a dengue FHD na população brasileira (Cordeiro et al., 2007).

Finalmente, em epidemiologia genética, o grande número de marcadores genéticos e abundância de características clínicas em que estes podem estar relacionados pode ser tratada corretamente somente por meta-análise estatística que fornece uma abordagem quantitativa para combinar os resultados de vários estudos sobre o mesmo tema, e para estimar e explicar a sua diversidade (Ioannidis et al., 2001).

Conclusão

A dengue é uma arbovirose endêmica em Serra Talhada, se beneficiando da falta de infraestrutura urbana, de saneamento e despreparo dos recursos humanos envolvidos nos setores responsáveis pelo controle de doenças. Sendo a má qualidade da informação coletada a respeito dos pacientes e estratégias equivocadas de controle de vetores, as principais causas dos surtos epidêmicos nos últimos cinco anos.

A desproporção de casos de dengue entre mulheres e homens, pode ser explicada por questões ocupacionais, maior proporção na população geral, questão cultural e exodo rural por parte dos homens. Além disso, a maioria dos voluntários se declarou branco e possuíam renda média de até dois salários mínimos.

Devido ao surto recente de dengue e vírus Zika, não foi possível garantir um grupo controle que pudesse ter sua genotipagem comparada, uma vez que, seria necessário o uso do teste ELISA IgG. Este teste pode detectar no sangue dos voluntários, infecções ocorridas até dez anos atrás, mas não pode ser realizada por falta de recursos. Além disso, como não houve

registro de pessoas com FDH no banco de dados do NVS, na faixa etária do estudo, também não foi possível criar um grupo de pacientes com FDH para comparação com os pacientes com FD.

O desequilíbrio encontrado em IL-4 e IL-10, por meio do teste exato de Hardy-Weinberg, pode ser resultado da pequena amostragem encontrada e não deve ser tomado como definitivo enquanto não houver uma comparação com outro grupo de estudo, seja ele de controle negativo, de grupo de assintomáticos ou de grupo de FDH. Portanto, junto com Ly-6 e CCR5, os resultados devem ser encarados como parciais. Logo, a frequência alélica e genotípica encontrada em nossos estudos podem sofrer alterações para os SNP's estudados, após o acréscimo de um grupo comparativo do mesmo local de estudo.

Lista de abreviações

CCR5 – Quimiorreceptor de citocina 5;
 DENV – vírus dengue;
 FD – Febre da dengue;
 FDH – Febre da dengue hemorrágica;
 HIV – human immunodeficiency virus;
 HPV – human papiloma virus;
 HW – Hardy-weinberg;
 IFN – Interferon fator necrosis;
 IL-4 – Interleucina 4;
 IL- 10 – Interleucina 10;
 Ly-6 – Antígeno de linfócito 6;
 NO – óxido nítrico;
 NVS – Núcleo de vigilância em saúde;
 SCD – Síndrome de choque da dengue;
 SNP – single nucleotide polymorphism;
 TGF – Tumor growth fator;
 Th – linfócito T helper;

Conflito de interesses

The authors declare there is no conflict of interest.

Contribuição dos autores

PP contributed to design of study, data collection, analysis, interpretation and drafting of the manuscript. KE contributed to design of study, data collection and analysis and review of manuscript. VQ contributed to design of study, data analysis and review of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Informação sobre os autores

¹Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil; ^{2 e 3} Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

Agradecimentos

The authors thank to the Surveillance in Health Department of Serra Talhada – PE

REFERÊNCIAS

- 1000 genomes – A deep catalog of human genetic variation. 2008.
<http://www.1000genomes.org/Browser/population> variation. Acessado em: agosto de 2015.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996. 383:787.
- Abe AHM, Marques SM, Costa PSS. Dengue em crianças: da notificação ao óbito. *Rev Paul Pediatr* 2012. 30(2):263-71.
- Ama NO, Hamanaka Y, Suehiro Y, Hasui Y, Nakamura J, Hinoda Y. Association of Interleukin-10 Promoter Single Nucleotide Polymorphisms 819 T/C and 592 A/C With Aging. *Journal of Gerontology* 2005. 60(12): 1525–1529.
- Amre DK, Mack DR, Morgan K, Israel – D, Lambrette P, Costea I, et al. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn’s disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009. 29: 1025–1031.
- Ank, N.; Petersen, K.; Malmgaard, L.; Mogensen, S.C.; Paludan, S.R. Age-dependent role for CCR5 in antiviral host defense against herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* 2005. 79: 9831-9841.
- Bamezai A. Mouse Ly-6 proteins and their extended family: markers of cell differentiation and regulators of cell signaling. *Arch. Immunol. Ther. Exp* 2004. (Warsz.) 52: 255–266.
- Bashyam HS, Green S, Rothman AL. Dengue virus-reactive CD8₊ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J. Immunol* 2006; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2817>.
- Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, Rothman AL. Crossreactive memory CD8₍₊₎ T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *J. Infect. Dis* 2008; <http://dx.doi.org/10.1086/526790>.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013. 496:504–7.
- Blas E, Kurup AS. Equity, social determinants and public health programmes. Geneva: World Health Organization; 2010.

- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 2008. 319: 921–926.
- Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 2002. 56:371-402.
- Carabalí JM, Hendrickx D. Dengue and health care access: the role of social determinants of health in dengue surveillance in Colombia. *Glob Health Promot.* 2012. 19(4):45–50.
- Carabali M, Hernandez LM, Arauz MJ, Villar LA, Ridde V. Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. *BMC Infectious disease* 2015; doi 10.1186/s12879-015-1058-x
- Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2012. doi: 10.1038/nrg3114.
- Chaturvedi UC, Raghupathy R, Pasca AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al.. Shift from a Th1-type response to Th-type in dengue haemorrhagic fever. *Curr. Sci* 1999. 76:63–69.
- Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, et al. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005. 44: 43–50.
- Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2006. 74:142–147.
- Chinoy H, Salway FI, John S, Fertig N, Tait B D, Oddis CV, et al. Interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms in Caucasian idiopathic inflammatory myopathy patients in UK. *Ann Rheum Dis* 2007; doi: 10.1136/ard.2006.06885
- Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Protocol* 2011; doi:10.1038/nprot.2010.182
- Commission on Social Determinants of Health-CSDH. Closing the gap in a generation: health equity through action on the social determinants of health. Final report of the Commission on Social Determinants of Health. Geneva: World Health Organization; 2008. p. 256. http://www.who.int/social_determinants/final_report/en/. Acessado em agosto de 2015.
- Cordeiro MT, Silva AM, Brito CA, Nascimento E, Magalhães MC, Guimarães GF, et al. Characterization of dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2007. 77: 1128-1134.
- Cui W, Sun CM, Deng BC, Liu P. Association of polymorphisms in the interleukin-4 gene with response to hepatitis B vaccine and susceptibility to hepatitis B virus infection: a meta-analysis. *Gene.* 2013; doi:10.1016/j.gene.2013.04.065.
- de Mattos Almeida MC, Caiaffa WT, Assunção RM, Proietti FA. Spatial vulnerability to dengue in a Brazilian urban area during a 7-year surveillance. *J Urban Health* 2007. 84: 334–345.

- De-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setúbal S, et al. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/ IP-10, CCL4/MIP-1b and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012. 107: 48–56.
- Duarte HH, França EB. Data quality of dengue epidemiological surveillance in Belo Horizonte, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 2006. 40: 134–142
- Fang X, Hu Z, Shang W, Zhu J, Xu C, Rao X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012. 66: 134–146.
- Fellay J, Ge D, Shianna KV, Colombo S, Ledergerber B, Cirulli ET, et al. Common Genetic Variation and the Control of HIV-1 in Humans 2009. 5(12)| e1000791.
- Fraser R, Walker JJ, Ekbote UV, Martin KL, McShane P, Orsi NM. Interleukin-4 2590 (C>T), toll-like receptor-2 12258 (G>A) and matrix metalloproteinase-9 21562 (C>T) polymorphisms in pre-eclampsia. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. P 2008; doi: 10.1111/j . 1471 - 0528.2008.01771.x
- Forte G I, Scola L, Misiano G, Milano S, Mansueto P, Vitale G, et al. Relevance of Gamma Interferon, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin-10 Gene Polymorphisms to Susceptibility to Mediterranean Spotted Fever. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; doi:10.1128/CVI.00121-09
- Guzmán MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002. 2(1):33–42.
- Gupta V, Yadav TP, Pandey RM, Singh A, Gupta M, Kanaujiya P, et al. Risk factors of dengue shock syndrome in children. *J Trop Pediatr* 2011. 57: 451-456.
- Halloran PF, Richards RR, Stubbs M, Gidon M. Evidence for expression of Ly-6.2 on non-bone marrow-derived cells in kidney, skin and connective tissues. *J. Immunogenet*. 1981. 8: 323–334.
- Hsu T-H, Althaus IW, Foreman O, Spindler KR. Contribution of a Single Host Genetic Locus to Mouse Adenovirus Type 1 Infection and Encephalitis. *mbio.asm.org*. 2012 3(3) e00131-12.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo 2010. Disponível em <http://ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>. Acessado em janeiro de 2015.
- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat. Genet*. 2001. 29: 306–309.
- Iseki M, Omori-Miyake M, Xu W, Sun X, Takaki S, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B-cell activation and autoimmunity are mediated by CD4 + T cells and IL-4. *Int Immunol* 2012. 24: 183–195.
- Kenzy SG, Cho BR, Kim Y. Oncogenic Marek’s disease herpesvirus in avian encephalitis (temporary paralysis). *J. Natl. Cancer Inst*. 1973. 51: 977–982.
- Khun S, Manderson L. Poverty, user fees and ability to pay for health care for children with suspected dengue in rural Cambodia. *Int J Equity in Health*. 2008.7(1):10.

Krishnan MN, Aylwin Ng, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, Sultana H, et al.. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 2008. 455:242–245.

Lee I-K, Hsieh C-J, Chen R-F, Yang Z-S, Wang L, Chen C-M, et al. Increased Production of Interleukin-4, Interleukin-10, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Type 2 Diabetes' Mononuclear Cells Infected with Dengue Virus, but Not Increased Intracellular Viral Multiplication. *BioMed Research International* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/965853>

Loeuillet C, Deutsch S, Ciuffi A, Robyr D, Taffé P, Muñoz M, et al. *In vitro* whole-genome analysis identifies a susceptibility locus for HIV-1. *PLoS Biol* 2008. 6:e32.

Mallya M, Campbell RD, Aguado B. Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex: five genes with many splice forms. *Genomics* 2002. 80:113-123.

Mallya M, Campbell RD, Aguado B. Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands. *Protein Sci* 2006. 15:2244-2256.

Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* 2002. 185:1697–703.

Marmot M, Wilkinson R. Social determinants of health: the solid facts. 2nd ed. Copenhagen: World Health Organization; 2003.

McKenzie IF, Gardiner J, Cherry M, Snell GD. Lymphocyte antigens: Ly-4, Ly-6, and Ly-7. *Transplant. Proc.* 1977. 9, 667–669.

Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 2014. 22(3):138–46

Miller S A,.Dykes D.D,.Polesky H.F. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells.” *Nucleic Acids Res.* 1988. Vol. 16, p. 1215.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al.. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat. Med* 2003; <http://dx.doi.org/10.1038/nm887>.

Montenegro D, Lacerda HR, Lira TM, Oliveira DS, Lima AA, Guimarães MJ, et al. Clinical and epidemiological aspects of the dengue epidemic in Recife, PE, 2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006. 39: 9–13.

Mims CA. The invasion of the brain by yellow fever virus present in the blood of mice. *Br. J. Exp. Pathol* 1957. 38:329 –338.

Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* 2013. 5:299.

Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J. Infect. Dis* 2004. 189:221–232.

Nunes-Araújo FR, Ferreira MS, Nishioka SD. Dengue fever in Brazilian adults and children: assessment of clinical findings and their validity for diagnosis. *Ann Trop Med Parasitol* 2003. 97: 415–419.

O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael NL, et al. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32 [letter] [see comments]. *Lancet* 1997. 349(9060):1219.

Omran MD, Mokhtari M-R, Bagheri M, Ahmadpoor P. Association of Interleukin-10, Interferon-gamma, Transforming Growth Factor-beta, and Tumor Necrosis Factor-alpha Gene Polymorphisms With Long-Term Kidney Allograft Survival. *Iran J Kid Dis* 2010. 4 (2):141-146.

Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-b1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 2010. 71: 1135–1140.

Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011. 472:481– 485.

Seneviratne S, Malavige G, De Silva H. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006. 100 (7): 608-614.

Simmons CP, Popper S, Dolocek C, Chau TN, Griffiths M, Dung NT, et al. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis* 2007. 195:1097–1107.

Solar O, Irwin A. A conceptual framework for action on the social determinants of health. In: Discussion Paper Series on Social Determinants of Health, No 2. Geneva: World Health Organization; 2010.

Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies 2005. doi:10.1093/bioinformatics/bti283.

Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, et al.. Dating the origin of the CCR5-del32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *American Journal of Human Genetics* 1998. 62: 1507- 1515.

Telenti, A. Safety concerns about CCR5 as an antiviral target. *Curr. Opin. HIV AIDS* 2009. 4:131-135.

Teixeira MdG, Barreto ML, Costa MdC N, Ferreira LDA, Vasconcelos PF, Cairncross S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health* 2002. 7: 757–762.

Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Cruz M, Martínez-Nava GA, Bahena-Román M, Ortiz-Flores E, et al. The SNP at – 592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. *Inf Ag Can* 2012. 7:32-40.

Truelove AL, Oleksyk TK, Shrestha S, Thio CL, Goedert JJ, Donfield SM, et al. Evaluation of *IL10*, *IL19*, and *IL20* gene polymorphisms and chronic hepatitis B infection outcome. *Int J Immunogenet*. 2008; doi:10.1111/j.1744-313X.2008.00770.x.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV: An investigation of polymorphism in the interleukin- 10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997. 24:1 –8.

Turtle L, Griffiths MJ, Solomon T. Encephalitis caused by flaviviruses. *QJM* 2012. 105:219 – 223.

Vidal F, López-Dupla M, Laguno M, Veloso S, Mallolas J, Murillas J, et al. Pharmacogenetics of Efficacy and Safety of HCV Treatment in HCV - HIV Coinfected Patients: Significant Associations with *IL28B* and *SOCS3* Gene Variants 2012. 7(11): e47725.

Venter M, Myers TG, Wilson MA, Kindt TJ, Paweska JT, Burt FJ, et al. Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence. *Virology* 2005. 342:119 – 140.

Wahala MPB. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* 2011; doi:10.3390/v3122374.

Weiskopf D, Angelo MA, Sidney J, Peters B, Shrestha S, Sette A. Immunodominance changes as a function of the infecting dengue virus serotype and primary versus secondary infection. *J Virol*. 2014; doi: 10.1128/JVI.01108-14.

Wiley CA, Schrier RD, Morey M, Achim C, Venable JC, Nelson JA. Pathogenesis of HIV encephalitis. *Acta Pathol. Jpn* 1991. 41:192–196.

Zoodma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG, et al: Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer* 2005. 15:282–290.

DISCUSSÃO GERAL

Vários tipos de armadilhas são utilizadas para monitoramento de populações de culicídeos. Porém, as ovitrampas são utilizadas em diversos países, mostrando-se eficientes, principalmente em situações de índices de infestação predial abaixo de 5%, apesar de não forneçam dados sobre distribuição e tipos de criadouros (Donalísio e Glasser, 2002). Em nosso estudo, 1027 ovitrampas feitas com garrafas PET, apresentaram um bom desempenho no monitoramento, evitando que milhares de novos mosquitos emergessem, embora, as ovitrampas não possam ser utilizadas como forma de controle (Regis *et al.*, 2008; Maciel-de-Freitas e Lourenço-de-Oliveira, 2009)

De acordo com o estudo de Souza *et al.* (2013), a vigilância entomológica deve ser realizada visitando todas as construções comerciais e residenciais pelo menos duas vezes no ano como parte de esforços de controle. Durante as visitas, muitos criadouros potenciais são ou eliminados ou tratados com larvicidas. Os proprietários ou responsáveis pela área devem ser orientados sobre os riscos de água estagnada e criadouros. Assim sendo, a informação, quando bem transmitida se torna conhecimento, que por sua vez, quando posto em prática, contribui para a diminuição da infestação e conseqüentemente, ajuda a reduzir o número de casos de dengue.

Em nossas observações de vigilância entomológica, o número de casos confirmados de dengue apresentou uma forte correlação com o número de ovos do mês anterior. Pois deve-se levar em consideração o intervalo de tempo que envolve fatores como período de ciclo de vida do vetor, da fase de ovo até a emergência do adulto; período de incubação viral após a infecção do hospedeiro e tempo de realização do exame laboratorial.

A manutenção dos altos números de casos de dengue e dos altos níveis de infestação em Serra Talhada, apresentam características comuns à maioria das 5.585 cidades do Brasil. Pois a escassez e o despreparo dos recursos humanos envolvidos no programa epidemiológico das secretarias de saúdes municipais, são fatores apontados por diversos estudos de epidemiologia da dengue (Lenzi *et al.*, 2000). Uma vez que, nos seis primeiros meses de 2012, muitos bairros e distritos não possuíam a cobertura adequada por falta de Agentes de Combate a Endemias (ACE). Ademais, o desinteresse por parte dos gestores com relação a cursos de reciclagem e atualização, tornam ineficiente o serviço oferecido aos contribuintes. Para Halstead (1988), apesar

de haver recursos, a implementação dos programas de controle muitas vezes não alcança sucesso, devido a: busca de soluções fáceis, perda de capacidades técnicas e gerenciais pelo recurso humano disponível, aumento da dimensão do problema, desconsideração de experiências anteriores e expectativa de fracasso, espelhada em outras experiências mal sucedidas no controle de dengue.

Depois do estudo de vigilância entomológica, desenvolvemos um método de extração de DNA de ovo único, uma vez que não dispunhamos de insetário para seguir o processo de taxinomia clássica conforme os métodos convencionais baseados nos instares larvais. Nossos resultados mostram que as médias de concentrações de DNA variou de 6.8 a 192.9 ng/ μ L usando resina Chelex® 100 (dados não mostrados). Já o método STE, é eficiente na extração de DNA genômico, sendo empregado em muitos estudos de insetos adultos (Dobson e Rattanadechakul, 2001; Pinto *et al.*, 2013). Porém, a qualidade do DNA é inferior devido às impurezas não removidas, tornando a etapa de amplificação impossível. Para avaliar a qualidade do método de extração com a resina Chelex® 100, primers do gene *COI* foram utilizados, amplificando um fragmento de aproximadamente 708 bp (o controle negativo foi uma reação sem DNA, para ter certeza que não houve contaminação) (Nelson *et al.*, 2007). Em seguida à etapa de sequenciamento as sequências, compararamo-nas ao banco de dados do Genbank, demonstrando 99 e 100% de similaridade com sequencias de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente.

Os resultados demonstraram que o DNA pode ser obtido até mesmo de um ovo único de *Aedes* spp, seja com ovos viáveis ou inviáveis (secos ou abertos). Enquanto que para a identificação taxonômica de mosquitos, é necessária uma colônia para obter as formas larvais e adultas, o método por nós desenvolvido é rápido, eficiente e de baixo custo, podendo ser aplicado para identificação de mosquitos vetores. Tradicionalmente a identificação de ovos de mosquitos é por meio do uso de estruturas morfológicas existentes nos ovos, as quais tem o potencial de auxiliar na identificação taxonômica de algumas espécies de interesse médico. No entanto, é necessário o uso de um microscópio eletrônico, o qual requer um especialista técnico para o manuseio do equipamento e na análise das estruturas dos ovos (Swartz e Hebert, 1987; Cary, 1996).

Usando este novo método baseado na resina Chelex® 100 descrito neste estudo, nós poderíamos neutralizar inibidores, independente do número de ovos, todas as amostras amplificaram satisfatoriamente. Além disso, as concentrações de DNA e

quantidade de ovos usados neste estudo foram consistentes. Embora, haja a possibilidade de variação na concentração de DNA devido ao processo manual de maceração, o qual é crítico para uma boa qualidade de DNA para PCR, com observado por outros autores (Yue e Orban, 2001; Desloire *et al.*, 2006).

Outro ponto relevante em nosso estudo foi que nós usamos o gene *COI*, pois vários estudos tem sido realizados para entender a dinâmica genética de populações de vetores, o qual é um aspecto importante para estabelecer estratégias de controle e monitoramento. Logo, o uso de DNA barcode neste estudo forneceu condições apropriadas para diferenciar espécies de mosquito que segundo Hebert *et al.* (2003), deve apresentar, pelo menos, 3% de sítios polimórficos entre sequências de nucleotídeos. Neste estudo, nós observamos aproximadamente 67 sítios polimórficos sites, representando aproximadamente de 10% do alinhamento completo da sequencia. Portanto, usando um método eficiente, simples, seguro e de baixo custo para extração de DNA, nós obtivemos DNA de ovos viáveis e inviáveis em quantidade e qualidade apropriada para uma boa reação de amplificação.

Durante o monitoramento de infestação por *Aedes aegypti* no ano de 2011, na cidade de Serra Talhada - PE, foram instaladas 250 ovitrampas confeccionadas com garrafas PET no peri-domicílio de residências de quatro bairros, no período de setembro a dezembro, as paletas eram contadas semanalmente no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), recolhendo um total de 28.966 ovos. As paletas com ovos foram levadas para o Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE), UFPE. Destes, 1% foram utilizados para a identificação molecular, encontrando três ovos de *A. albopictus* confirmados após a extração de DNA individual dos mesmos, com subsequente sequenciamento por meio do marcador molecular BARCODE, segundo Freitas *et al.* (2014).

O município de Serra Talhada é muito importante, localmente, devido ao comércio, recebe mais de 100 mil pessoas todos os meses residentes das cidades próximas ou até dos Estados da Paraíba, Ceará e Bahia. Dessa forma, faz-se necessário que se acompanhe de maneira vigilante a evolução da presença de *A. albopictus* às novas condições em que está submetido, pois aumenta o risco de uma epidemia urbana. Infelizmente, somente agora que o vírus chikungunya está ocorrendo em Pernambuco com dez casos confirmados, se tem feito uma vigilância entomológica assídua para *A. albopictus*, já sendo registrado em 36 municípios do estado (Bandeira, 2015 – comunicação pessoal).

Portanto, é importante refletir sobre o uso da técnica de taxonomia molecular para uma vigilância entomológica efetiva que possa detectar a ocorrência de outras espécies de vetores de importância médica e possivelmente utilizar esta abordagem nos programas de monitoramento de resistência a inseticida em populações naturais.

Em virtude da falta de casos de Febre de Dengue Hemorrágica no banco de dados do NVS, tivemos dificuldade na análise de dados. Uma vez que, apenas uma pessoa, menor de idade, estava presente na planilha. No entanto, encontramos dois casos por comunicação verbal de outros envolvidos na pesquisa. Esta situação, se dá em virtude da falta de infraestrutura e preparo técnico dos profissionais de saúde, que gera transferência dos casos mais graves para outros municípios, retirando seus nomes do sistema. Ademais, durante o processo de amostragem, a cidade enfrentava uma hiperepidemia de dengue e vírus Zika, que por falta de kit diagnóstico gerou alto nível de subnotificação, dificultaram a busca por controles negativos (pessoas que nunca tiveram dengue). Todavia, dentre os indivíduos amostrados, apenas três tiveram dengue comprovadamente mais de uma vez, fator que poderia ser usado na análise genotípica dentro do grupo caso. Portanto, apenas análises descritivas foram realizadas na população global e em duas subpopulações.

Infecções secundárias permitem uma maior viremia no soro e um maior risco de doença severa comparada com as infecções primárias sugerindo fortemente que a imunidade pré-existente (não necessariamente anticorpo) para DENV é um fator de risco para dengue severa (Wahala *et al.*, 2011).

Em 2010 foram estimados 96 milhões de casos sintomáticos e 293 milhões assintomáticos no mundo (Murray *et al.*, 2013; Bhatt *et al.*, 2013). No entanto, o número real de casos não poderia ser identificado, uma vez que, ocorrem sub/super-notificações ou erros de diagnóstico dos casos (Bhatt *et al.*, 2013; Messina *et al.*, 2014).

Existem também outros elementos, relacionados como os determinantes sociais de saúde (DSS's), os quais são fatores individuais, sociais ou relacionados aos sistemas de saúde que influenciam no status de saúde de indivíduos e da sociedade (Solar e Irwin, 2010; Marmot e Wilkinson, 2003; CSDH, 2008). Menos de 3% de pacientes de dengue desenvolvem as formas severas (FHD) após uma fase aguda normal, caracterizada pelo aumento na permeabilidade capilar e resultando em extravasamento de plasma que pode levar ao choque circulatório e morte (Oliveira-Pinto *et al.*, 2012).

Por meio da análise dos genótipos e o local de nascimento, ambos os critérios apontaram os mesmos modelos para os loci de SNP estudados. tanto o AIC, como BIC. Enquanto que a análise de associação formou nove haplótipos para os marcadores utilizados neste estudo, onde o p-valor, tanto para a associação global, como para a associação dos haplótipos com o sexo, não foi estatisticamente significativo.

A etnia, o gênero e a capacidade de pagar pelo serviço de saúde também são conhecidos por desempenhar um papel na presença e manutenção da dengue (Guzman e Kouri, 2002; Blas e Kurup, 2010; Carabali e Hendrickx, 2012; Khun e Manderson, 2008). No entanto, as informações sobre o papel que poderia desempenhar a síndrome de choque da dengue (SCD) na mortalidade é muito limitada (Carabali *et al.*, 2015). Em nossos estudos, a maioria são mulheres, se declaram brancos, possuem renda média de até dois salários mínimos e ensino médio. Não havendo diferença significativa do número de casos para estas variáveis entre os bairros da cidade de Serra Talhada.

Outros estudos epidemiológicos realizados no Brasil, com base no banco de dados do sistema de saúde pública, têm mostrado uma maior incidência global de dengue em mulheres, quando todas as formas clínicas são consideradas (Teixeira *et al.*, 2002; Montenegro *et al.*, 2002; Nunes-Araújo *et al.*, 2003; Duarte e França, 2006; de Mattos Almeida *et al.*, 2007;).

Portanto, é possível que as desigualdades de sexo em cuidados médicos sejam a fonte da tendência para o aumento do diagnóstico de dengue em mulheres da população de baixa renda. A razão para a maior incidência de dengue hemorrágica em mulheres nesta coorte precisa ser mais estudada (Cordeiro *et al.*, 2007).

Ank *et al.* (2005), estudando infecção experimental com vírus da herpes simples tipo 2 (HSV-2), utilizando ratos CCR5 Δ 32/ CCR5 Δ 32, que apresentaram maior titulações no cérebro do que os controle tipo selvagem, mas foram capazes de limpar a infecção. Lim *et al.* (2008), obtiveram resultados similares em estudos de coorte em pacientes infectados por vírus do oeste do Nilo, no qual mostrou um risco aumentado de infecções sintomáticas no homozigoto da CCR5 Δ 32. Segundo Telenti (2009), outras infecções por flavivirus, tais como a encefalite do carrapato, uma infecção endêmica da Europa e Ásia, foram encontradas por estar associadas com os alelos delta 32. O que não foi possível concluir em nossos estudos com casos positivos de dengue.

De acordo com a análise dos *loci* IL-4 e IL-10, houve desequilíbrio para a população global, bem como para a subpopulação de Serra Talhada, segundo o teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg. O que pode ser explicado pela ausência de uma população controle e/ou número pequeno de amostras. Segundo Clarke *et al.* (2011), associações espúrias podem ocorrer como consequência de problemas de qualidade de dados ou de amostragem estatística, ou por causa de confusão pela estratificação da população ou da mistura. No entanto, para Ly-6 o mesmo não ocorreu. Certamente pelo fato de se tratar de uma família de genes, levando ao aumento da chance de encontrar um dos *loci* dos alelos analisados.

Como referência, comparamos os nossos resultados com as populações globais, para observarmos semelhanças e diferenças com a mesma; ibérica, em virtude a contribuição de nossos ancestrais vindos desta região da Europa; africana, devido à contribuição dos escravos oriundos da África e que aqui ficaram, contribuindo para a nossa miscigenação; e peruana, por causa de sua composição étnica semelhante a nossa. No entanto, não foi possível utilizarmos dados sobre ameríndios, uma vez que esta informação ainda não se encontra disponível.

De acordo com os nossos resultados para o SNP IL-4, as frequências das bases, T e C, apresentaram uma diferença significativa em relação às populações global, ibérica, peruana e africana. O mesmo não ocorre para as mesmas bases no SNP IL-10. Para o SNP Ly-6, as frequências das bases A e G, foram semelhantes em relação à população global, mas apresenta diferença significativa para populações ibérica, peruana e africana.

A respeito das frequências genotípicas, em IL-4 o genótipo CC apresentou valores similares apenas em relação às populações globais e peruanas. Enquanto que para os genótipos CT e TT, as diferenças foram significativas em relação a todas as populações utilizadas como referência. Em IL-10, apenas para o Genótipo TT houve diferença significativa quando comparada à população Ibérica, que interessantemente, foi a única que apresentou valores semelhantes para os demais genótipos deste *locus*. Para Ly-6 a frequência do genótipo GG foi significativamente diferente em relação à população africana. Porém, os genótipos AG e AA apresentaram frequências significativamente diferentes em relação às populações Ibérica, Peruana e Africana.

A IL-4 tem funções efetoras importantes na resposta imune para uma variedade de infecções e estão também claramente implicados na patogênese de doenças atópicas (Abbas *et al.*, 1996).

Para Fraser *et al.* (2008), o SNP IL-4 -590 (C>T) apresenta uma marcada tendência a associação com pré-eclampsia ($\chi^2 = 5.87$, $P = 0.055$), em mulheres do Reino Unido, com maior proporção de mulheres homozigotas para o genótipo TT no grupo pré-eclampsia (95% IC), estando todos os genótipos investigados em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Segundo Chinoy *et al.* (2007), observou que IL-4 confere suscetibilidade à miopatia idiopática inflamatória (MII), em populações do Reino Unido, encontrando um forte disequilíbrio de ligação entre os SNPs, onde a região codificante para IL-4 não apresentou associação significativa com suscetibilidade (MII).

Porém, os estudos citados anteriormente não utilizaram o mesmo SNP que nós usamos, o IL-4 rs 2243250 , posição -589 (C>T). Além disso, não há estudos, até o momento, que relacione este marcador à infecção por outro arborivirus, como o DENV.

De acordo com Cui *et al.* (2013), os SNP's de IL-4 rs2243250, rs2070874 e rs2227284 podem desempenhar um importante papel na resposta à vacina de hepatite B, especialmente em populações asiáticas. Segundo Lu *et al.* (2014), o genótipo CC do SNP rs2243250, está associado com hepatite B crônica.

Durante nossos estudos, não foram encontrados indivíduos asiáticos ou com hepatite. Além disso, não pudemos avaliar correlação de nenhum dos genótipos com os casos de FD devido a ausência de um grupo controle ou grupo comparativo (FHD ou infecção secundária). Quando compararmos as frequências alélicas e genotípicas de IL-4, observamos uma diferença significativa em relação às populações global, ibérica, peruana e africana para ambos os alelos. Enquanto que o genótipo CC apresentou valores similares apenas em relação às populações globais e peruanas, ocorrendo o contrário para os demais.

Em relação a IL-10, Amre *et al.* (2009), avaliaram a associação de SNPs, com alto disequilíbrio de ligação (DL) ($r^2 \geq 0.80$) com outros SNPs e que eram frequentes (alelo de menor frequência $\geq 10\%$), utilizando os dados de genótipos disponíveis para populações caucasianas de descendência Europeia. O teste de associação alélica revelou que dois SNPs, rs2222202 e rs1800871 foram significativamente associados com a doença de Crohn (P-valor 0,03 e 0,05 respectivamente). Para a análise de haplótipos, dos mesmos marcadores, o teste global foi significativo ($P = 0,04$) e dois haplótipos (TC e CT) foram significativamente associados com doença de Crohn. O haplótipo TC foi relacionado por conferir risco, enquanto que o haplótipo CT foi protetor.

Para Chaturvedi *et al.* (1999), ainda não é bem compreendida a função da produção de IL-10 no complexo imunológico em relação a evolução clínica da forma severa da infecção por DENV, mas pode ser responsável pela mudança observada de linfócito T helper 1 (Th1) para Th2 na FHD. Além disso, pontos de mutação nos promotores de IL-10, na posição -1082 A/G, -819 C/T, e -592 C/A, resultam no polimorfismo que diferencia os monócitos em altos, intermediários e baixos produtores de IL-10, respectivamente. A correlação destes fenótipos com a severidade da doença requer mais investigações. Embora seja o mesmo gene, não se trata do mesmo SNP utilizado em nosso estudo.

Segundo estudos realizados por Truelove *et al.* (2008), há associação significativa ($p=0,02$) do genótipo CC com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes com infecção crônica do vírus da hepatite tipo B em Afroamericanos nos Estados Unidos para o SNP rs1800896. Já Vidal *et al.* (2012), estudando o mesmo SNP em pacientes HIV coinfectados com o vírus da hepatite C em caucasianos da Espanha, não encontraram nenhuma associação.

De acordo com Forte *et al.* (2009), nenhum dos genótipos estudados de IL-10 teria associação com infecção por *Rickettsia*, em caucasianos na Itália.

Para Perez *et al.* (2010), é possível que uma expressão insuficiente de IL-10 durante a infecção secundária de dengue, pelo menos na sequência de DENV-1/DENV-2, poderia ser associada com uma regulação imune ineficiente.

Turner *et al.* (1997), salienta que vários estudos tem mostrado que a capacidade para a produção de IL-10 em indivíduos parece ser influenciados pelo patrimônio genético, o que explicaria o fato de que algumas células tumorais produzam IL-10. Além disso, vários grupos tem proposto IL-10 como um gene candidato para suscetibilidade a câncer para o genótipo CC (Zoodsma *et al.*, 2005).

Em uma análise de associação de SNP e o risco aumentado de desenvolvimento de lesão cervical por papilomavirus humano (HPV), Torres-Poveda *et al.* (2012), mostrou que os indivíduos que são portadores do polimorfismo heterozigoto de IL-10 -592 C/A tinham o dobro do risco de desenvolver lesão cervical (95% I.C.), $p = 0.007$, quando comparados com o grupo controle, e que portar duas cópias do alelo A confere o risco aumentado em duas vezes de desenvolver lesão cervical (95% IC), $p = 0.02$. O SNP -592 C/A do promotor de IL-10 pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de lesão de HPV em mulheres mexicanas, potencialmente

associados com a produção de altos níveis de IL-10 em nível sistêmico e cervical, o que favorece a persistência viral e o desenvolvimento de lesão cervical.

Pacientes com FHD tem níveis reduzidos de óxido nítrico (NO) e níveis aumentados de IL-10 no sangue, quando comparados com os pacientes acometidos com a forma branda. Em outros estudos, durante a fase aguda da forma severa, são notados produção aumentada de IL-10 e baixa regulação de múltiplos genes regulatórios de IFN (Nguyen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2007).

Em relação à comparação da frequência alélica de IL-10 de nossos estudos e das populações utilizadas como referência, não houveram diferenças significativas. Porém, na comparação das frequências genotípicas, apenas TT apresentou diferença significativa quando comparada à população Ibérica, que interessantemente, foi a única que apresentou valores semelhantes para os demais genótipos.

De acordo com Bamezai (2004), os genes Ly-6 são candidatos particularmente atrativos para o estudos de suscetibilidade, pois eles codificam uma proteína de superfície celular de GPI-ancorado. Além disso, os membros da família Ly-6 também tem sido identificados como fatores importantes do hospedeiro, podendo influenciar na replicação viral em vários tipos de vírus causadores de encefalite (Kenzy *et al.*, 1973; Turtle *et al.*, 2012; Wiley *et al.*, 1991; Mims, 1957). Estudos realizados em camundongos, descobriu quatro genes de Ly-6 altamente superregulados durante a infecção por linhagens altamente neuroinvasivas pelo arbovírus do oeste do Nilo (Venter *et al.*, 2005). Mais recentemente, o Ly-6E humano foi demonstrado por afetar a infecção do vírus do Oeste do Nilo (Krishnan *et al.*, 2008).

Além disso, o Ly-6E humano aumenta a replicação viral de outros flavivirus, como o vírus da febre amarela (Schoggins *et al.*, 2011) e também foram implicados em duas análises separadas para fatores de suscetibilidade para HIV (Loeuillet *et al.*, 2008; Brass *et al.*, 2008). Estes resultados indicam que os genes Ly-6 são fatores de suscetibilidde para diversos vírus de RNA e DNA (Hsu *et al.*, 2012).

Para o SNP Ly-6, as frequências das bases A e G, são semelhantes em relação à população global, mas apresenta diferença significativa para as demais populações referenciadas. Mas em relação à frequência genotípica, o genótipo GG foi significativamente diferente em relação à população Africana. Enquanto que os genótipos AG e AA apresentaram frequências significativamente diferentes em relação às populações Ibérica, Peruana e Africana.

Um estudo retrospectivo baseado em hospitais foi conduzido no qual a presença de sangramento espontâneo, hepatomegalia, sinais de rompimento capilar tais como ascite e efusão pleural, leucopenia $< 4.000 \text{ mm}^3$ e idade menor que cinco anos foram encontrados como sendo um significativo fator de risco de síndrome de choque da dengue (SCD) em pacientes pediátricos com febre hemorrágica da dengue (FHD) (Gupta *et al.* 2011).

A aparente baixa taxa de pacientes infectados na faixa etária < 15 anos também tem sido relatado em outros estudos no Brasil (Teixeira *et al.*, 2002; Nunes-Araújo *et al.*, 2003; Montenegro *et al.*, 2002) e provavelmente espelha a subestimação de casos de dengue em crianças, em quem é mais branda e frequentemente confundida com outras doenças exantemáticas, de acordo com nossos dados de soroprevalência preliminares obtidos nessa faixa etária (Cordeiro *et al.*, 2007).

Segundo Cordeiro *et al.* (2007), quando comparada aos casos de FHD na Ásia, a taxa equilibrada entre a infecção primária e secundária encontrada em crianças e adolescentes até 15 anos de idade com FHD sugere que, neste grupo, algum outro mecanismo, que não seja dependente de anticorpo-realce ou infecção sequencial, pode desempenhar um papel modulador das respostas imunes em alguns pacientes e levar ao desenvolvimento da forma mais grave da doença. Entre outras razões, essas diferenças podem ser causadas pelas características epidemiológicas distintas de infecções de dengue no Brasil.

A razão para a presença de baixos índices de casos de FHD/SCD no Brasil ainda precisa ser mais estudada, considerando a possibilidade de uma alta prevalência de genes de resistência a dengue FHD na população brasileira (Cordeiro *et al.*, 2007).

Finalmente, em epidemiologia genética, o grande número de marcadores genéticos e abundância de características clínicas relacionadas pode ser tratada corretamente somente por meta-análise estatística que forneça uma abordagem quantitativa para combinar os resultados de vários estudos sobre o mesmo tema, e para estimar e explicar a sua diversidade (Ioannidis *et al.*, 2001).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nos quatro capítulos, concluímos que:

Os índices de infestação não variaram, significativamente, conforme as variáveis climáticas (temperatura e pluviosidade), em virtude do alto nível de domiciliação;

O número de casos estava relacionado com o número de ovos do mês anterior no mesmo bairro, nos oito primeiros meses do período de 2012 a 2013;

No município de Serra Talhada, apenas *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* tiveram, até então, suas ocorrências relatadas;

O método desenvolvido para a identificação de culicídeos por meio de extração de DNA de ovo único, associado ao marcador BARCODE, pode contribuir para uma vigilância entomológica mais eficiente;

A dengue é uma arbovirose endêmica em Serra Talhada, se beneficiando da falta de infraestrutura urbana, de saneamento e despreparo dos recursos humanos envolvidos nos setores responsáveis pelo controle de doenças;

A má qualidade da informação coletada a respeito dos pacientes e estratégias equivocadas de controle de vetores, são as principais causas dos surtos epidêmicos nos últimos cinco anos;

A desproporção de casos de dengue entre mulheres e homens, pode ser explicada em virtude da ocupação, hábito relacionado ao gênero, maior proporção na população e exodo rural por parte dos homens;

A maioria dos voluntários se declarou branca, que segundo a literatura tem quatro vezes mais suscetibilidade a dengue do que negros;

O grupo caso estudado possuía renda média de até dois salários mínimos, mas como não houve um grupo controle, não podemos afirmar se em Serra Talhada, estas variáveis tem uma correlação positiva;

Devido ao surto recente de dengue e vírus Zika, não foi possível garantir um grupo controle que pudesse ter sua genotipagem comparada, uma vez que, seria necessário o uso do teste ELISA IgG;

O desequilíbrio encontrado em IL-4 e IL-10, por meio do teste exato de Hardy-Weinberg, deve ser resultante da pequena amostragem encontrada.

Os resultados relativos aos marcadores de resistência/ susceptibilidade, não devem ser tomados como definitivos enquanto não houver uma comparação com outro grupo de estudo, seja ele de controle negativo, de grupo de assintomáticos ou de grupo de FHD;

Logo, a frequência alélica e genotípica encontrada em nossos estudos podem sofrer alterações para os SNP's estudados, após o acréscimo de um grupo comparativo do mesmo local de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787.

Acioli-Santos B, Segat L, Dhalia R, Brito CAA, Braga-Neto UM, Marques ETA, Crovella S (2008). *MBL2* Gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Human Immunology*. 69, 122–128.

Alencar CHM (2008). Infestação pelo *Aedes albopictus* (Skuse), em criadouros naturais e artificiais encontrados em áreas verdes na cidade de Fortaleza-CE5. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará.

Appanna R, Ponnampalavanar S, Lum Chai See L, Sekaran SD (2010). Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS One* 5.

Apostolopoulos J, McKenzie IF, Sandrin MS. (2000): Ly6d-L, a cell surface ligand for mouse Ly6d. *Immunity*, 12, 223–232.

Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, et al. (1997). Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *Aids*;11(10):67–71.

Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, Beatty PR, Harris E. (2009). Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80:416–424.

Bamezai A, Palliser D, Berezovskaya A, McGrew J, Higgins K, Lacy E, Rock KL. (1995): Regulated expression of Ly-6A.2 is important for T cell development. *J. Immunol.*, 154, 4233–4239.

Bamezai A, Rock KL. (1995): Overexpressed Ly-6A.2 mediates cell-cell adhesion by binding a ligand expressed on lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4294–4298.

Bamezai A, (2004). Mouse Ly-6 proteins and their extended family: markers of cell differentiation and regulators of cell signaling. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 52: 255–266.

Barata EAM, DE F Costa AIP, Chiaravalloti-Neto F, Glasser CM, Barata JMS, Natal D (2001) Populações de *Aedes aegypti* (L) em área endêmicas de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Públ* 35: 237-242.

Bar-Zeev M, (1958) The effect of temperature on the growth rate and survival of the immature stages of *Aedes aegypti*. *Bull of Entomol Res* 49,157–163

Bayley JP, Ottenhoff TH, e Verweij CL (2004). Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 5, 315-329.

Beiguelman B (1968). Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 17, 584-594.

Bellan SE (2010) The Importance of age dependent mortality and the extrinsic incubation period in models of mosquito-borne disease transmission and control. *PLoS ONE* 5, e10165, <<http://dxdoiorg/101371/journalpone0010165>>

Bentley MD, Day JF, (1989). Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition *Ann Rev of Entom* 34, 401–421.

Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, Cardoso MJ, White N J, Kwiatkowski D (1998). Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 177:778–782.

Bhamarapravati N, Toochinda P, Boonyapaknavik V (1968). Pathology of Thailand hemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann. trop. Med. Parasit*, 61, 500-510.

Biti R, Ffrench R, Young J, et al. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele [letter; comment]. *Nature Medicine*.3(3):252–253.

Blanpain C, Migeotte I, Lee B, et al. (1999). CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood*. 94(6):1899–1905.

Bolling BG, Eisen L, Moore CG, Blair CD (2011). Insect-Specific Flaviviruses from *Culex* Mosquitoes in Colorado, with Evidence of Vertical Transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 85(1): 169–177. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0474.

Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, Porter K, Rudiman IF, Yuwono D, Puthavathana P, Marovich MA. (2008). Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Virol.* 82:3939–3951.

Brakenhoff RH, Gerretsen M, Knippels EM, van Dijk M, van Essen H, Weghuis DO, Sinke RJ, Snow GB, van Dongen G A. (1995). The human E48 antigen, highly homologous to the murine Ly-6 antigen ThB, is a GPI-anchored molecule apparently involved in keratinocyte cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.*, 129,1677–1689.

Brasil (2005). Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil – LIRAA, Seria A normas e manuais técnicos Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, pp 60.

_____(2007). Plano de Desenvolvimento Territorial Sustentável para o Arquipélago do Marajó: resumo executivo da versão preliminar para discussão nas consultas públicas. Governo Federal, Grupo Executivo Interministerial, Brasília. Editora do Ministério da Saúde, Brasília.

_____(2009). Ministério da Saúde. Diretrizes Nacionais para a prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Brasília: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde.

_____(2015) <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/17702-confirmacao-do-zika-virus-no-brasil>. Acessado em março de 2015.

_____(2016) <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/svs-institucional> informe epidemiológico nº 07 – semana epidemiológica 52/2015. monitoramento dos casos de microcefalias no brasil. Acessado em Janeiro de 2016.

Brass AL, et al. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319:921–926.

Brinton MA, (1997). Host susceptibility to viral disease. In *Viral Pathogenesis*. N. Nathanson, R. Ahmed, R. Gonzalez-Scarano, D. E. Griffin, K. V. Holmes, F. A. Murphy, and H. L. Robinson, eds. Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 303–328.

Bucheton B, Kheir MM, El-Safi SH, Hammad A, Mergani A, Mary C, Abel L, Dessein A (2002). The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Microbes Infect* 4, 1449-1457.

Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM, (1988). A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 38: 172.

Calcinaro FG, Gambelunghe, Lafferty KJ, (1997). Protection from autoimmune diabetes by adjuvant therapy in the non-obese diabetic mouse: the role of interleukin-4 and interleukin-10. *Immunol. Cell Biol.* 75:467.

Callaway E (2007). Dengue fever climbs the social ladder. *Nature*, 448:734–735.

Cary SC (1996). PCR-based method for single egg and embryo identification in marine organisms. *Biotechniques* 21: 998-1000.

Casanova JL e Abel L (2007). Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J* 26, 915-922.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2002). Laboratory-acquired West Nile virus infections – United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.51, p.1133-1135.

Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P, Bistoni F, (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide– dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 23:1034-1038.

Chadee DD, (2009). Oviposition strategies adopted by gravid *Aedes aegypti*(L) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies(2002–2006) *Acta Tropica* 111, 279–283, <http://dxdoiorg/101016/j.actatropica200905012>, ISSN: 0001-706X

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:649–688.

- Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, Cheng JT & Yang KD (2005) Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 43–50.
- Chevalier V, Pépin M, Plée L, Lancelot R. (2010). Rift Valley fever - a threat for Europe? *EuroSurveillance*, 15(10): pii=19506.
- Choi SJ, Devlin RD, Menaa C, Chung H, Roodman GD, Reddy SV, (1998). Cloning and identification of human Sca as a novel inhibitor of osteoclast formation and bone resorption. *J. Clin. Invest.*, 102, 1360–1368.
- Chou JH, Bargmann CI, Sengupta P, (2001): The *Caenorhabditis elegans* odr-2 gene encodes a novel Ly-6-related protein required for olfaction. *Genetics*, 157, 211–224.
- Christophers R, (1960). *Aedes aegypti* (L), The Yellow Fever Mosquito Cambridge Univ Press, Cambridge.
- Classon BJ, Boyd RL, (1998). Thymic-shared antigen-1 (TSA- -1). A lymphostromal cell membrane Ly-6 superfamily molecule with a putative role in cellularadhesion. *Dev. Immunol.*, 6, 149–156.
- Clerici M, Butto S, Lukwiya M, et al. (2000). Immune activation in Africa is environmentally-driven and is associated with upregulation of CCR5. Italian-Ugandan AIDS Project. *Aids*. 14, 2083-2092.
- Coffey LL, Mertens E, Brehin AC, Fernandez-Garcia MD, Amara A, Després P, Sakuntabhai A, (2009). Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes Infect.* 11:143–156.
- Cohen SN, Halstead SB, (1966). Shock associated with dengue infection. I. Clinical and physiologic manifestations of dengue hemorrhagic fever in Thailand, 1964. *J. Pediatr.* 68:448–456.
- Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM, (1996). Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J Leukoc Biol.* 60(1):147–152.
- Consoli RAGB, Oliveira LR 1998. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228p.
- Cordeiro MT, Silva AM, Brito CA, Nascimento E, Magalhães MC, Guimarães GF, Lucena-Silva N, de Carvalho EM, Marques ET Jr, (2007). Characterization of dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 77: 1128-1134.
- Cordeiro MT, Freese E, Schatzmayr H, Nogueira RMR. Vinte anos de evolução da dengue no Estado de Pernambuco. Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 17-18, 2008.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 180:5771–5777.

Cray C, Keane RW, Malek TR, Levy RB. (1990). Regulation and selective expression of Ly-6A/E, a lymphocyte activation molecule, in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 8: 9–15.

Dalen AGN-V, Van Dongen GAMS, Smeets SJ, Nieuwenhuis EJC, Walsun MS-v, Snow GB, Brakehoffs RH, (2003). Characterization of the human ly-6 antigens, the newly annotated member ly-6k included, as molecular markers for head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*: 103, 768–774.

De-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setúbal S, Kubelka CF, Cruz OG, Oliveira SA (2012). Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/ IP-10, CCL4/MIP-1b and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 48–56.

Davies JD, Martin G, Phillips J, Marshall SE, Cobbold SP, Waldmann H, (1996). T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J. Immunol.* 157:529.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S, (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150:353.

de la C Sierra B, García G, Pérez AB, Morier L, Alvarez M, Kourí G, Guzmán MG (2006). Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. *Viral Immunol.* 19: 662–668.

de Waal MR, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE, (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 174:915- 924.

de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE, (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 174:1209-1220.

Dengue Vaccine Initiative. 2012. Disease burden. <http://www.denguevaccines.org/disease-burden>.

Desloire S, Valiente MC, Chauve C and Zenner L (2006). Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet. Res.* 37: 725-732.

Deubel V, Kinney RM, Trent DW, (1988). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology* 165:234–244.

Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris, E. (2000). Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol* 74, 4957–4966.

Dibo MR, Menezes RMT, Ghirardelli CP, Mendonça AL, Chiaravalloti Neto F, (2011). Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, p.496-503. doi: 10.1590/S0037-86822011000400019

Dobson SL and Rattanadechakul W (2001). A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38: 844-849.

Doc. eletrônico (internet): OIE. World Organisation for Animal Health. 2014. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014. 20 p. Disponível em: http://www.oie.int/fi_leadadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.14_RVF.pdf [Acessado em 08/2014].

Dolo A, Modiano D, Maiga B, Daou M, Dolo G, Guindo H, Ba M, Maiga H, Coulibaly D, Perlman H, *et al.* (2005). Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 72, 243-248.

Donalisio MR, Freitas ARR, (2015). Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Rev Bras Epidemiol.* 18(1): 283-5 DOI: 10.1590/1980-5497201500010022.

Donckier V, Wissing M, Bruyns C, Abramowicz D, Lybin M, Vanderhaeghen ML, Goldman M, (1995). Critical role of interleukin 4 in the induction of neonatal transplantation tolerance. *Transplantation* 59:1571.

Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A, Harris E, (2008). Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* 376:429–435.

Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R, (2011). Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V.106, p.346– 352.

English A, Kosoy R, Pawlinski R, Bamezai A, (2000). A monoclonal antibody against the 66-kDa protein expressed in mouse spleen and thymus inhibits Ly-6A.2-dependent cell-cell adhesion. *J. Immunol.*, 165, 3763–3771.

Enk AH, Katz SI, (1992). Identification and induction of keratinocyte derived IL-10. *J. Immunol.* 149:92.

Eshel R, Zanin A, Sagi-Assif O, Meshel T, Smorodinsky NI, Dwir O, Alon R, Brakenhoff R, van Dongen G, Witz IP, (2000). The GPI-linked Ly-6 antigen E48 regulates expression levels of the FX enzyme and of E-selectin ligands on head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem.* 275:12833– 40.

Eshel R, Zanin A, Kapon D, Sagi-Assif O, Brakenhoff R, van Dongen G, Witz IP (2002). Human Ly-6 antigen E48 (Ly-6D) regulates important interaction parameters between endothelial cells and head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer.* 98:803– 10.

Falcon-Lezama JA, Ramos C, Zuniga J, Juarez-Palma L, Rangel-Flores H, Garcia-Trejo AR, Acunha-Alonzo V, Granados J, Vargas-Alarcon G (2009). HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. *Acta Trop* 112, 193-197.

Fang X, Hu Z, Shang W, Zhu J, Xu C, Rao X, (2012). Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66: 134–146.

Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z (2004). TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 64, 469-472.

Figueiredo LTM, (2007). Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40(2):224-229.

Fink J, Gu F, Ling L, Tolfvenstam T, Olfat F, Chin KC, Aw P, George J, Kuznetsov VA, Schreiber M, Vasudevan SG, Hibberd ML, (2007). Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 1(2): e86.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR, (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081.

Fischer DB, Halstead SB (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. V. Examination of age specific sequential infection rates using a mathematical model. *Yale J. Biol. Med.* 42(5): 329–349.

Fischer J, Bouadjar B, Heilig R, Huber M, Lefevre C, Jobard F, Macari F, Bakija-Konsuo A, Ait-Belkacem F, Weissenbach J, Lathrop M, Hohl D, Prud'homme JF, (2001). Mutations in the gene encoding SLURP-1 in Mal de Meleda. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 875–880.

Flanagan K, Modrusan Z, Cornelius J, Chavali A, Kasman I, Komuves L, Mo L, Diehl L. (2008). Intestinal epithelial cell up-regulation of LY6 molecules during colitis results in enhanced chemokine secretion. *J. Immunol.* 180:3874 –3881.

Flood PM, Dougherty JP, Ron Y, (1990). Inhibition of Ly-6A antigen expression prevents T cell activation. *J. Exp. Med.* 172:115–120.

Flores EF, Weiblen R. (2008) O vírus do Nilo Ocidental *Ciência Rural*, Santa Maria, Online ISSN 0103-8478.

Forattini OP, (1965) - Entomologia médica Culicini: *Culex*, *Aedes* e *Psorophora* v 2, São Paulo, Ed da Universidade de São Paulo.

Forattini OP, Brito M (2003). Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Rev Saúde Pública.* 37: 676-7.

Freitas MTS, Gomes-Júnior PP, Batista MVA, Leal-Balbino T., Araujo AL, Balbino VQ. (2014). Novel DNA extraction assay for molecular identification of *Aedes* spp eggs. *Gen Mol Res* 13 (4): 8776-8782.

Frézal L, Leblois R (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect Genet Evol.* 8(5):727-36. doi: 10.1016/j.meegid.2008.05.005.

Galler R, Pugachev KV, Santos CLS, Ochran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, Marchevsky RS, Freire MS, Almeida LFC, Cruz ACR, Yamamura AMY, Rocco IM, Rosa EST, Souza LTM, Vasconcelos PFC, Guirakhoo F, Monath TP (2001). Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology* 290:309-319.

Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, Chen M, Albino AP, H. Bander N, (1993). Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int. J. Cancer* 55:96.

Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A, (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* 148:1792-1796.

Genetics Home Reference. Disponível em <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CCR5>. Acessado em julho de 2015.

Goh KT, Yamazaki S (1987). Serological survey on dengue virus infection in Singapore. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81: 687–689.

Gómez-Dantés H, Willoquet JR (2009). Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 25 Sup 1:S19-S31.

Gorry PR, Zhang C, Wu S, et al. (2002) Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5D32 allele. *Lancet.* 359(9320):1832–1834.

Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S et al. (1999). Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis.* 179(4):755–62.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Devries JE, Roncarolo MG, (1997). A CD4(1) T-Cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737.

Gubler DJ (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.

Gubler D, Kuno G (1997). Dengue and dengue hemorrhagic fever. London, CAB International.

Guedes DR et al (2010). Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *Journal of vector borne diseases*, 47(2): 67-75.

Guha-Sapir D, Schimmer B (2005). Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol.* 2: 1.

Gunther VJ, Putnak R, Eckels KH, Mammen MP, Scherer JM, Lyons A, Sztein MB, Sun W (2011). A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine* 29: 3895–3904.

Guzman MG, Kouri G (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2: 33–42.

Halloran PF, Richards RR, Stubbs M, Gidon M, (1981): Evidence for expression of Ly-6.2 on non-bone marrow-derived cells in kidney, skin and connective tissues. *J. Immunogenet.*, 8, 323–334.

Hänninen A, Jaakkola I, Salmi M, Simell O, Jalkanen S, (1997). Ly-6C regulates endothelial adhesion and homing of CD8(+) T cells by activating integrin-dependent adhesion pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:6898–6903.

Halstead SB, (1965). Dengue and hemorrhagic fevers of Southeast Asia, *Yale J. Biol. Med.* 37: 434-451.

Halstead SB. (1970). Observations related to pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. VI. Hypotheses and \$w-~\$n. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 42,

Halstead SB (1981). The pathogenesis of dengue. *Molecular epidemiology in infectious disease.* *Am J Epidemiol.* 114: 632–648.

Halstead SB, (1982). Immune enhancement of viral infection. *Prog. Allergy* 31:301–364.

Halstead SB, (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239:476–481.

Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, Kanesa-Thanan N, Hayes CG, Watts DM (2001). Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 65(3):180-3.

Halstead SB (2007). Dengue. *Lancet* 370:1644–52.

Hayes EB. et al. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases.* v.11, p.1167-1173.

Hayes EB (2009). Zika virus outside Africa. *Emerging Infectious Diseases.* www.cdc.gov/eid 15(9).

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL and deWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270: 313-321.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS.* 101(41): 14812–14817.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. 2(10) e312

Hebert PDN, Gregory TR (2005). The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5):852–859.

Henderson S. C., Kamdar M. M. and Bamezai A. (2002). Ly-6A.2 expression regulates antigen-specific CD4+ T cell proliferation and cytokine production. *J. Immunol.*, 168, 118–126.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL e Waard JR de (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:313–321.

Hogan CM, Hammer SM, (2001). Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 134, 978-996.

Hsu T-H, Althaus IW, Foreman O, and Spindler KR, (2012). Contribution of a Single Host Genetic Locus to Mouse Adenovirus Type 1 Infection and Encephalitis. *mbio.asm.org.* 3(3) e00131-12.

Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM (2000). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* 63: 71–75.

Hughes JH, Porter JE (1956). Dispersal of mosquitoes through transportation with particular reference to immature stage. *Mosquitoes News.* 16(2): 106-11.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O’Garra A, Murphy KM, (1993). Development of Th1 CD41 T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science (Wash. DC).* 260:547–549.

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT, (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in site hybridization. *J. Infect. Dis.* 189:1411–1418.

Jung M, Sabat R, Kratzschmar J, et al. (2004). Expression profiling of IL-10 -regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur J Immunol* 34:481–493.

Kalayanaroj S, Gibbons RV, Vaughn D, et al. (2007). Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *J Infect Dis* 195:1014.

Kenzy SG, Cho BR, Kim Y. (1973). Oncogenic Marek’s disease herpesvirus in avian encephalitis (temporary paralysis). *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 977–982.

Kimman TG, Cornelissen L A, Moormann RJ, Rebel JM, Stockhofe-Zurwieden N, (2009). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27:3704–3718.

Kotait I., Brandão PE., Carrieri ML. (2006). Vigilância Epidemiológica das Encefalites Equinas. Instituto Pasteur, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, IP/CCD/SES-SP, Ano 3, Número 29.

Krishnan MN, Aylwin Ng, Sukumaran B, et al. (2008). RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455:242–245.

Kliks SC; Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS, (1989). Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 444–451.

Kosasih H, Yusuf H, Sudjana P, et al. (2006). Report of four volunteers with primary, secondary and tertiary dengue infections during a prospective cohort study. *Dengue Bulletin*. 30, 87–92.

Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, Laferte' J, Delgado J, Cabrera MV (1998). Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 4: 89–92.

Kuipers H, Workman C, Dyer W, et al. (1999). An HIV-1-infected individual homozygous for the CCR-5 delta32 allele and the SDF-1 3'A allele. *Aids* 13(3):433–434.

Kwiatkowski D (2000). Science, medicine, and the future: susceptibility to infection. *BMJ* 321, 1061-1065.

Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells. *J. Exp. Med.* 172: 921–929.

Lenzi M F, Camillo-Coura L, Gault C E, do Val M B (2000). Estudo do dengue em área urbana favelizada do Rio de Janeiro: considerações iniciais *Cad. Saúde Pública*, 16(3):851-856.

Leyssen P, Clercq ED, Neyts J (2000). Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:67–82.

Libert F, Cochaux P, Beckman G et al. (1998). The *deltacr5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics*, 7: 399-406.

Libraty DH, Endy TP, Houn H S et al. (2002). Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 185:1213–1221.

Lindebach BD, Rice CM. (2001). *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe, DM, Howley PM. *Fundamental virology*. 4.ed. Philadelphia: LW&W. p.589-640.

Liu R, Paxton WA, Choe S et al. (1996). Homozygous defect in HIV- 1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86: 367-377.

Liu HC, Niikura M, Fulton JE, Cheng HH, (2003). Identification of chicken lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E, alias SCA2) as a putative Marek's disease resistance gene via a virus–host protein interaction screen. *Cytogenet.*

Genome Res. 102, 304–308.

Livdahl TP, Edgerly JS, (1987) Egg hatching inhibition: field evidence for population regulation in a treehole mosquito. *Ecol Entom* 12:395–399.

Loeuillet C, Deutsch S, Ciuffi A, Robyr D, Taffé P, Muñoz M, Beckmann JS, Antonarakis SE, Telenti A (2008). *In vitro* whole-genome analysis identifies a susceptibility locus for HIV-1. *PLoS Biol.* 6:e32.

Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, Hill A (2002). Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg* 67, 102-106.

Lorente E, Infantes S, Barnea E et al. (2012) Multiple viral ligands naturally presented by different class I molecules in transporter antigen processing-deficient vaccinia virusinfected cells. *J Virol* 86: 527–541.

Luz KG, Santos GIV, Vieira RM. Febre pelo vírus Zika. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 24(4):785-788, out-dez 2015. doi: 10.5123/S1679-49742015000400021

Mallya M, Campbell RD, Aguado B (2002). Transcriptional analysis of a novel cluster of LY-6 family members in the human and mouse major histocompatibility complex: five genes with many splice forms. *Genomics* 80:113-123.

Mallya M, Campbell RD, Aguado B (2006). Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands. *Protein Sci* 2006, 15:2244-2256.

Marian AJ (2012). Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res* 159: 64-79.

Marques CCA, Miranda C (1992). Influência de extratos de formas evolutivas sobre atividades de oviposição de fêmeas de *Aedes (S) albopictus* (Skuse). *Rev Saúde Pública* 26: 269-71.

Martins VEP, Alencar CH, Kamimura MT, Araújo FMC de, Simone SG de, Fireman R, Izabel DM, Guedes F (2012). Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Plos One*. 7: 1-9.

Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB, (1997). Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat. Genet.* 16, 100–103.

Mathew A, Rothman AL (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev* 225: 300–313.

Mercado-Curiel RF, Black IV WC, Muñoz ML (2008). A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology*. 8:118 doi:10.1186/1471-2180-8-118.

McCall PJ, Cameron MM, (1995) Oviposition pheromones in insect vectors. *Para-s. Tod.* 11:352–355.

McKenzie I. F., Gardiner J., Cherry M. and Snell G. D. (1977): Lymphocyte antigens: Ly-4, Ly-6, and Ly-7. *Transplant. Proc.*, 9, 667–669.

Milner CM, Campbell RD (2001). Genetic organization of the human MHC class III region. *Front Biosci* 6:D914-926.

Mims CA (1957). The invasion of the brain by yellow fever virus present in the blood of mice. *Br. J. Exp. Pathol.* 38:329 –338.

Ministério da Saúde (2014). Disponível em http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=15000&catid=11&Itemid=1030. Acessado em Janeiro de 2015.

Miwa JM, Ibanez-Tallon I, Crabtree GW, Sanchez R, Sali A, Role LW, Heintz N. (1999): lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron*, 23,105–114.

Moncayo AC, Fernandez Z, Ortiz D, Diallo M, Sall A, Hartman S, Davis CT, Coffey L, Mathiot C C, Tesh RB et al (2004) Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. *Emerg Infect Dis* 10:1790-1796.

Moore CC, Fisher RB, (1969) Competition in mosquitoes: density and speciesratio effect on growth, mortality, fecundity and production of growth retardant *Ann Entom Soc Am* 62: 1325–1331.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-190.

Mueller R, Bradley LM, Krah T, Sarvetnick N, (1997). Mechanism underlying counterregulation of autoimmune diabetes by IL-4. *Immunity* 7:411.

Mueller R, Krah T, Sarvetnick N (1996). Pancreatic expression of interleukin- 4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.* 184:1093.

Mulla MS (1979). Chemical ecology of mosquitoes auto and transpacific regulating chemicals in nature In: *Proc Calif Mosq Control Assoc*, 47:65–68.

Myers RM, Varkey MJ (1971) A note on sequential dengue infection, presumptive and proved, with report of an instance of a third proved attack in one individual. *Indian J. Med. Res.* 1971, 59, 1231–1236.

Nelson LA, Wallman JF and Downton M (2007). Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med. Vet. Entomol.* 21: 44-52.

O'Brien SJ, Moore JP, (2000). The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS.[In Process Citation]. *Immunol Rev* 177:99–111.

O'Brien TR, Winkler C, Dean M, et al. (1997). HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32 [letter] [see comments]. *Lancet* 349(9060):1219.

O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* 22:711.

OPAS, (2014). Alerta Epidemiológica. Fiebre por chikungunya y dengue en las Américas. Disponível em http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=27048&Itemid=&lang=es

Pacheco AG, Moraes MO (2009). Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* 27, 173-186.

Paul WE, Seder RA (1994). Lymphocyte response and cytokines. *Cell.* 76:241–251.

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

Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, Sanchez L, Valdes L, Volk HD, Guzman MG (2010). Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 71, 1135-1140.

Pflugh DL, Maher SE, Bothwell AL (2002). Ly-6 superfamily members Ly-6A/E, Ly-6C, and Ly-6I recognize two potential ligands expressed by B lymphocytes. *J. Immunol.*, 169, 5130–5136.

Pinto SB, Stainton K, Harris S, Kambris Z, et al. (2013). Transcriptional regulation of *Culex pipiens* mosquitoes by *Wolbachia* influences cytoplasmic incompatibility. *PLoS Pathog.* 9: e1003647.

Portal Brasil (2014). Disponível em <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/12/ministerio-da-saude-confirma-primeiro-caso-de-febre-do-nilo>. Acessado em Janeiro de 2015.

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC, Power RF, Rajotte RV (1995). Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice: analysis of cytokine mRNA expression in the graft. *Transplantation* 60:368.

Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL. (1993). Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 178:87.

Reynes, J.; Portales, P.; Segondy, M. et al. (2000). CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 181, 927-932.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229:726–733.

Rico-Hesse R, (2007). Dengue virus evolution and virulence models. *Clin. Infect. Dis.* 44:1462–1466.

Rothman AL, (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113:946–51.

Rothman AL, (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11:532–543.

Rothman AL, Ennis F A, (1999). Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257:1–6.

Rueda LM, Patel KJ, Axtell RC, Stinner RE, (1990). Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 27:892–898.

Samson M, Labbe O, Mollereau C, et al. (1996). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35(11):3362–3367.

Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I et al (2005). A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37: 507–513.

Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472:481– 485.

Schrijvers AHGJ, Gerretsen M, Fritz JM, van Walsum M, Quak JJ, Snow GB, van Dongen GAMS (1991). Evidence for a role of the monoclonal antibody E48 defined antigen in cell– cell adhesion in squamous epithelia and head and neck squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 196:264 –9.

Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, 2011. Notificação/investigação Dengue: Frequência segundo classificação. Disponível em: <[http:// aplicacao.saude.gov.br](http://aplicacao.saude.gov.br)> Acesso em: 20 nov. 2013.

Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (2015). Chikungunya – Informe epidemiológico SE 52. Dados consolidados em janeiro de 2016.

Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (2015). Dengue – Informe epidemiológico SE 52. Dados consolidados em janeiro de 2016.

Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (2015). Zika – Informe epidemiológico SE 52. Dados consolidados em janeiro de 2016.

- Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (2015) <http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/zika-virus-pe-confirma-4-casos>. Acessado em julho de 2015.
- Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE, (1993). IL-12 acts directly on CD41 T cells to enhance priming for IFN γ production and diminish IL-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:10188–10192.
- Serufo JC, Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC (1993). Isolation of dengue type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in the Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*; 88: 503-504.
- Shekhar KC, Huat OL (1992). Epidemiology of dengue/dengue hemorrhagic fever in Malaysia – a retrospective epidemiological study. 1973–1987. Part II: dengue fever (DF). *Asia Pac J Public Health* 6: 126–133.
- Sheppard HW, Celum C, Michael NL, et al. (2002). HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/ Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29(3):307–313.
- Shouche YS, Patole MS, (2000). Sequence analysis of mitochondrial 16S ribosomalRNA gene fragment from seven mosquito species. *J. Biosci.* 25, 361–366.
- Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, et al. (2010). Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur Jour Hum Gen* 18, 1221–1227.
- Silva MLCR, Galiza GJN, Dantas AFM, et al. (2011). Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(3):570-575.
- Silva EB, Nóbrega PRC (2012). Dengue: reflexões sobre a incidência da doença no município de Palmares, Pernambuco no pós-enchente (2010, 2011). *J Manag Prim Health Care*. 3 (2):106-113.
- Simmons CP, Popper S, Dolocek C, et al. (2007). Patterns of Host Genome–Wide Gene Transcript Abundance in the Peripheral Blood of Patients with Acute Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases* 195:1097–107.
- Soundravally R, Hoti SL (2008). Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. *Scand J Immunol* 67, 618-625.
- Southwood TRE, Murdie G, Yasuno M, et al. (1972) Studies on the life budget of *Aedes aegypti* in wat samphaya bangkok Thailand. *Bulletin of the World Health Organization* 46: 211–226.
- Shresta S, (2012). Role of Complement in Dengue Virus Infection: Protection or Pathogenesis? *mbio.asm.org* 3(1) e00003-12.
- Spindler KR, Welton AR, Lim ES, Duvvuru S, Althaus IW, Imperiale JE, Daoud AI, Chesler EJ (2010). The major locus for mouse adenovirus susceptibility maps to genes of the hematopoietic cell surface-expressed LY6 family. *J. Immunol.* 184, 3055–3062.

Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB et al. (1998). Dating the origin of the CCR5-del32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *American Journal of Human Genetics*, 62: 1507- 1515.

Stanford WL, Haque S, Alexander R, Liu X, Latour AM, Snodgrass HR, Koller BH, Flood PM. (1997). Altered proliferative response by T lymphocytes of Ly-6A (Sca-1) null mice. *J. Exp. Med.*, 186, 705–717.

Strizki JM, Xu S, Wagner NE, et al. (2001) SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**:12718–12723.

Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M (2004). CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *J Transl Med* 2:8.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G.(1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145:3796–3806.

Swartz SS and Hebert PDN (1987). Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Freshw. Biol.* 17: 373-379.

Tauil PL (2002). Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro 18(3):867-871.

Tauil PL (2010). Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Saúde Pública*. Disponível em <http://www.scielo.org/pdf/rsp/2010nahead/1665.pdf>. Acessado em dezembro de 2014.

Teixeira Md G, Barreto ML, Costa MdC N, Ferreira LDA, Vasconcelos PF, Cairncross S (2002). Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health* 7: 757–762.

Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, et al. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group [letter]. *Lancet* 349(9060):1219–1220.

Tirado SM, Yoon KJ (2003). Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.* 16:69–86.

Tominaga Y M, Nagata H, Yasuda N, Okamoto K, Arisawa H, Moriyama M, Miki K, Yokono M, Kasuga. (1998). Administration of IL-4 prevents autoimmune diabetes but enhances pancreatic insulinitis in NOD mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86:209.

Turtle L, Griffiths MJ, Solomon T. (2012). Encephalitis caused by flaviviruses. *QJM* 105:219 –223.

Umareddy I, Tang KF, Vasudevan SG, Devi S, Hibberd ML, Gu F (2008). Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. *Journal of General Virology* 89, 3052–3062.

Vasconcelos PFC. Febre amarela. Sociedade Brasileira de Pediatria, Rio de Janeiro, 2000.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181:2–9.

Venter M, Myers TG, Wilson MA, Kindt TJ, Paweska JT, Burt FJ, Leman PA, Swanepoel R. (2005). Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence. *Virology* 342:119–140.

Wahala MPB, (2011). Wahala and Aravinda M. de Silva The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* 3, 2374-2395; doi:10.3390/v3122374.

Wallace HG, Lim TW, Rudnick A, Knudsen AB, Cheong WH, Chew V (1980). Dengue hemorrhagic fever in Malaysia: the 1973 epidemic. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 11: 1–13.

Wang L, Chen RF, Liu JW, Lee IK, Lee CP, Kuo HC, Huang SK, Yang KD (2011). DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e934.

Wiley CA, Schrier RD, Morey M, Achim C, Venable JC, Nelson JA. (1991). Pathogenesis of HIV encephalitis. *Acta Pathol. Jpn.* 41:192–196.

Wilson EO, (2004). Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.359, p.739.

Wilson EB, (2011). Brooks DG: The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 350:39–65.

World Health Organization (1997). *Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva.

World Health Organization (2010) - Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - Dengue and dengue haemorrhagic fever (http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR_ISR_2000_1/en/) Acesso em 24/07/2011

World Health Organization (2014). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/>. Acessado em Janeiro de 2015.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, et al. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat. Med.* 6:816–820.

Xavier-Carvalho C , Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, Santos RS, Cruz OG, Oliveira SA, Carvalho MS, Pacheco AG., Kubelka CF, Moraes MO (2013). Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case–control, functional and meta-analysis study. *Infection, Genetics and Evolution*. 20: 197–205.

Xiao-Xia G, Xiao-Juan Z, Chun-Xiao L, Yan-De D, Ying-Mei Z, Dan X, Rui-De X, Cheng-Feng Q E, Tong-Yan Z, (2013) Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) for Den 2-43 and New Guinea C virus strains of dengue 2 virus. *Acta Tropica* 128, 566-570.

Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S, Campbell RD, Hood L (2003). Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res* 13:2621-2636.

Xu F, Liu D, Nunes MR, et al. (2007). Antigenic and genetic relationships among Rift Valley fever virus and other selected members of the genus *Phlebovirus* (Bunyaviridae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 76(6):1194-200.

Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S (2009) A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 182: 4865–4873.

Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ, Hill HT, Platt KB. (1996). Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol*. 9:51– 63.

Yue GH and Orban L (2001). Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. *Mar. Biotechnol*. 3: 199-204.

Zahiri N, Rau ME, (1998). Oviposition attraction and repellency of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to waters from conspecific larvae subjected to crowd-ing, confinement, starvation, or infection. *J Med Entom* 35:782–787.

Zanluca C, Melo VCA, Mosimann ALP, Santos GIV, Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 jun;110(4):569-72.

ANEXO I - NORMAS DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Escopo e política

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz é uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão somente através de convite. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos em inglês. Inglês de baixa qualidade é a principal causa de atraso na publicação; então, sugerimos aos autores que tenham inglês como língua estrangeira submeterem seus manuscritos à verificação de alguém com o inglês como língua nativa e, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às *Memórias* requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação do material.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos no seguinte

link: <http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

Com este serviço, você poderá submeter manuscritos e verificar o conteúdo de sua submissão. Os arquivos eletrônicos serão usados para avaliação editorial e arbitragem online. Além disso, a decisão editorial do manuscrito será comunicada diretamente a você.

Usando o serviço de submissão eletrônica, você vai garantir rapidez e segurança no envio de seu manuscrito e agilizar o processo de avaliação.

Produtos naturais

Enfatizamos que artigos sobre [Produtos Naturais](#) e Investigações farmacológicas devem satisfazer os seguintes requisitos.

1. Qualquer extrato natural, fração ou composto deve ser totalmente caracterizado e a informação relacionada a origem, localização e período/ano que foi coletado, deve ser fornecida. Especialmente, o extrato em estudo, deve ser fracionado e as substâncias ativas deste produto natural devem ser identificadas.
2. Técnicas de isolamento e purificação devem ser descritas em detalhes.

Autores devem declarar em seus artigos que o material em estudo é livre de endotoxinas.

3. Ensaios de Citotoxicidade com células normais devem ser apresentados
4. Materiais de plantas (assim como de outros organismos) devem ser devidamente identificados. O nome científico deve aparecer (em itálico), o autor deste nome e o nome de família devem ser fornecidos; mencionar quem identificou o material. O manuscrito deve incluir referências aos espécimes da planta (depositada em herbário regional) ou ao material examinado;
5. Artigos que tratam de vigilância biológica de séries de extratos descaracterizados de plantas ou outros organismos não serão considerados para publicação nas Memórias.
6. Investigações farmacológicas de extratos requerem detalhamento na caracterização do extrato. O perfil cromatográfico (e.g., HPLC com de sinais identificados) deve ser realizado, ou a informação qualitativa e quantitativa em componentes ativos e típicos deve ser fornecida;
7. Artigos meramente descritivos não serão aceitos. As Memórias só consideram manuscritos em que conclusões são baseadas em estatísticas adequadas. Em cada caso os controles positivos (substâncias ativas de referência) devem ser utilizados e a dependência da dose/atividade devem ser demonstrada;
8. Qualquer estudo envolvendo indivíduos deve ser apresentado Aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número de protocolo deve ser informado;
9. Trabalhos experimentais com animais, referências devem ser feitas aos princípios de cuidados com os animais de laboratório ou regulamentos semelhantes e a aprovação do comitê de ética local;
10. Estudos que envolvem plantas da Biodiversidade brasileira devem ter autorização para acesso a recursos genéticos, e se for o caso, acesso também a associação de conhecimento tradicional. O número da autorização deve ser informado.

Submissão de Sequencias

Informações sobre sequencias genéticas relacionadas no manuscrito, devem ter seu número de acesso GeneBank mencionadas no manuscrito.

O manuscrito deve ser preparado de acordo com as instruções aos autores.

Os autores que submetem um manuscrito à apreciação compreendem que, se aceito para publicação, transferem o direito exclusivo do manuscrito às Memórias, incluindo o de reprodução em todas as formas e meios de comunicação. A revista não recusará aos autores solicitação razoável de permissão para reproduzir qualquer contribuição.

- No caso de ensaios clínicos a obrigatoriedade de informar o número do registro na Plataforma REBEC.
- Informamos que os trabalhos submetidos às Memórias são encaminhados a uma triagem para detecção de Plágio através do uso de um software. Ferramenta utilizada na prevenção de plágio profissional e outras formas de má conduta acadêmica.
- Todos os autores devem assegurar e garantir que as pesquisas relatadas não são resultados de má conduta tais como dados produzidos, falsificação, plágio ou duplicidade. No caso de confirmação de má conduta na pesquisa, emitiremos uma notificação de retratação para corrigir o registro científico. Favor consultar o Singapore
- Trabalhos que envolvem animais experimentais devem fazer referência aos princípios de cuidados com animais de laboratório, ou regulamentos semelhantes e aprovação do comitê de ética local.

- Manuscritos submetidos as Memórias serão submetidos a revisão de Inglês “Premium Editing” pela empresa Ameican Journal Experts que propõem sugestões.
- Declaração de que os dados/resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados em qualquer outro meio previamente.
- Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou consultar a home-page (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>) ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2562.1222), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)
- Statement em: <http://www.singaporestatement.org/statement.html>.
- Todos os estudos que envolvem seres humanos de ter a aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número do Protocolo deve ser fornecido.

Formato e estilo

O manuscrito deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado, figuras legendadas e referências. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidas juntas em único arquivo. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O MANUSCRITO DEVE SER ORGANIZADO NA SEGUINTE ORDEM:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: nome do autor, seção, departamento, laboratório, instituição e localização geográfica (cidade, estado e país); endereço completo somente do autor correspondente.

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Fonte de financiamento: Indicar as fontes de apoio financeiro e a mudança de endereço.

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, além de especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética, de acordo com o **sobrenome do primeiro autor**.

NO TEXTO USE O SOBRENOME DOS AUTORES E A DATA:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910)

Com dois autores, é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912)

Quando há mais de dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

Ao final do trabalho, use os seguintes estilos de referências:

REVISTAS

1. Artigo de periódico padrão

1.1. Impresso

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: 284-287.

1.2. On line

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: e12140307.

1.3. DOI

Zhang M, Holman CD, Price SD, Sanfilippo FM, Preen DB, Bulsara MK 2009. Comorbidity and repeat admission to hospital for adverse drug reactions in older adults: retrospective cohort study. *BMJ* doi: 10.1136/bmj.a2752.

2. Organização como autor

Diabetes Prevention Program Research Group 2002. Hypertension, insulin and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 40: 679-686.

3. Autores pessoais e organização como autor

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ, Alf-One Study Group 2003. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 169: 2257-2261.

4. Volume com suplemento

Geraud G, Spierings EL, Keywood C 2002. Tolerability and safety of frovatriptan with short and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 42 (Suppl. 2): S93-S99.

5. Artigo com errata publicada

Malinowski JM, Bolesta S 2000. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* 22: 1151-1168. Erratum in *Clin Ther* 2001 23: 309.

6. Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK 2002. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* Nov 15 100: 3828-3831. Epub 2002 Jul 5.

LIVROS E OUTRAS MONOGRAFIAS

1. Autor pessoal

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA 2002. *Medical microbiology*, 4th ed., Mosby, St. Louis, 255 pp.

2. Capítulo em um livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM 2002. Chromosome alterations in human solid tumors. In B Vogelstein, KW Kinzler (eds.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, p. 93-113.

3. Anais de Conferências

Harnden P, Joffe JK, Jones WG 2002. Germ cell tumours. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference, 2001 Sep 13-15, Leeds, UK, Springer, New York, 102 pp.

4. Dissertação e Tese

Borkowski MM 2002. *Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans*, PhD Thesis, Central Michigan University, Michigan, 78 pp.

MATERIAIS NÃO PUBLICADOS

1. No prelo

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M 2002. Signature of balancing selection in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.

2. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB 2002. Anderson's electronic atlas of haematology [CD-ROM]. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

3. Artigo de periódico na Internet

Abood S 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [Internet] [cited 2002 Aug 12] 102. Available from: nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle.

ILUSTRAÇÕES

figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) como na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Como uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

Tabelas devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

OUTROS FORMATOS E ESTILOS DE ARTIGOS

Notas Técnicas: Notas Técnicas devem comunicar sucintamente novas técnicas individuais ou avanços técnicos originais. A nota inteira deve ocupar no máximo três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas (que significa em torno de 10 laudas em espaço duplo). O texto não deve ser dividido em seções. Assim, o estado da arte deve ser muito brevemente apresentado e resultados devem ser ligeiramente apresentados e discutidos ao mesmo tempo. Tabelas e figuras complementares poderão ser publicadas como dados complementares. Referências devem ser limitadas às essenciais e citadas no final da nota, com o mesmo formato, como em artigos completos. Devem ser apresentados um resumo breve e três palavras-chave.

Comunicações breves: devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, com o mesmo formato usado em artigos completos. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

No caso de ensaios clínicos, é obrigatório informar o número de inscrição da plataforma REBEC.

Os autores também devem fornecer uma declaração de que os dados/resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados anteriormente.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

1. uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista e assinada por todos

os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;

2. uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor correspondente;

3. **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação;

4. **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

ANEXO II - NORMAS DA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH

Genetics and Molecular Research (GMR) publica revisão de livro, nota breve, relato de caso, Comentário, Correção, Errata, Homenagem, *In Memoriam*, Carta ao Editor, metodologia, mini-revisão, Obituário, conclusões, Ponto de vista de Investigação, retração, revisão, Artigo, Comunicação Curta e Tese abstrato, no que diz respeito à genética, evolução, biologia molecular e bioinformática. Os artigos de revisão são normalmente recebidos somente pelo convite. Se você gostaria de enviar um artigo de revisão, por favor, consultar o editor em primeiro lugar; enviar uma proposta de título, uma breve descrição e uma lista de documentos relevantes para a revisão publicada pelo autor (es). GMR é uma revista exclusivamente online.

A revista é mantida pela fundação científica sem fins lucrativos Ribeirão Preto

Fundação de Pesquisa Científica (FUNPEC-RP) e os artigos são de acesso aberto. **A**

taxa por apresentação aceito é de R \$ 1.780,00 para autores brasileiros e US \$ 1.060,00 para autores de outros países. O montante em dólar reflete a atual aproximada taxa de câmbio e estão sujeitas a alterações. Esta taxa cobre parte das despesas para língua final e revisão técnica, para configuração de página, e para a publicação online.

O pagamento da taxa de publicação deve ser feita pelos autores somente após receber uma carta de aceitação preliminar. Após o pagamento é recebido por nosso escritório, o manuscrito será tratados posteriormente para publicação, dependendo da aprovação final do Conselho Editorial.

O pagamento, tanto de dentro ou fora do Brasil, deve ser feito por transferência bancária (Banco do Brasil ou City Bank).

- [Instruções para pagamento \(Brasil\)](#) .

- [Instruções para pagamento \(Fora do Brasil\)](#) .

Entre em contato com o escritório editorial [gmr@geneticsmr.com] se você tiver quaisquer perguntas.

Todos os artigos GMR devem atender aos mais altos padrões de qualidade científica, tanto em termos de originalidade e importância, quanto os resultados da investigação relatados devem fazer substanciais avanços. Como é um jornal que serve uma comunidade científica ampla e variada, artigo sumários, introduções e conclusões devem ser compreensíveis para o não-especialista, sublinhando quaisquer implicações mais amplas do estudo. No entanto, os artigos não devem comprometer no rigor científico e detalhe exigido por uma revista de pesquisa internacional. A amplitude de leitores que GMR atrai dá uma oportunidade aos autores para transmitir para um grande público, como bem como para os especialistas, a importância da sua investigação. A revista está indexada em mais de 64 serviços; ver [http://www.geneticsmr.com].

As contribuições devem ser enviadas por e-mail como anexos para [gmr@geneticsmr.com].

É condição fundamental que manuscritos submetidos não tenham sido previamente publicados e não será publicado simultaneamente em outros lugares. Com a aceitação, os editores adquirem direitos de autor pleno e exclusivo para todas as línguas e países. A utilização das denominações registradas, marcas, etc., nesta publicação não implica, mesmo na ausência de uma declaração específica, que tais nomes estejam isentos das leis de proteção pertinentes e regulamentos e, portanto, livres para uso geral.

Todos os trabalhos devem ser preparados em Inglês dos EUA. Uma primeira avaliação da língua vai ser feita após o recebimento de cada manuscrito. Aqueles que são considerados inadequados para avaliação inicial será devolvido ou enviado para a correção, a critério do autor. O manuscrito será considerado recebido oficialmente quando a versão corrigida estiver pronta para ser enviada para os árbitros.

Antes de aceitação final, a carta de encaminhamento com o título do artigo, nomes e assinaturas de todos os autores devem ser enviadas por e-mail a gmr@geneticsmr.com. Provas de impressão será enviado em formato "pdf" via e-mail para a revisão final. Todos os autores são co-responsáveis pela sua fundamentos e eles devem fazer todos os esforços para verificar o papel antes de este passo final para evitar reformatação caro e eventual introdução de novos erros.

Artigos GMR não têm restrições rígidas de comprimento. Eles devem conter detalhe técnico suficiente para um leitor especialista entender e avaliar os métodos e resultados. Não há limite de páginas para artigos GMR, mas os autores devem ainda ser concisos, por duas razões principais. Primeiro, nosso sistema de arbitragem eletrônica depende de e-mail, arquivos muito grandes podem, ocasionalmente, causar problemas. Em segundo lugar, longos manuscritos podem ser complicados para ler e estudar. Árbitros tendem a não gostar deles, e eles levam mais tempo para processar. Além disso, os leitores de

revistas eletrônicas, muitas vezes imprimem artigos para lê-los. Lembre-se que um artigo de 10.000 palavras leva cerca de 11 páginas. Quantas páginas você estaria disposto a ler na tela ou imprimir?

Políticas editoriais: GMR é uma revista arbitrada. Somente serão considerados para publicação manuscritos originais. Os trabalhos serão analisados por pelo menos dois avaliadores independentes antes de uma decisão é feita sobre a publicação. Todo o processo é realizado eletronicamente para acelerar o progresso e a publicação final. Os trabalhos serão publicados (colocado em linha), uma vez que foram totalmente processados.

Papers

Aceitam-se na sua forma final de 1 janeiro - 31 março constituem a primeira edição de cada volume, e assim por diante. Há quatro edições por ano.

Manuscritos (em Inglês dos EUA), juntamente com uma carta de apresentação do autor responsável pela toda a correspondência, deve ser submetido ao Editor no [gmr@geneticsmr.com] em formato eletrônico como arquivos .doc guardado no Microsoft Word 97 para Windows ou versão posterior. Não use formatação, como "título" ou "folhas de estilo" do Word. Ortografia, pontuação, estrutura de sentença, espaçamento, comprimento, e consistência do uso em forma e descrições devem ser verificados antes do envio. Por favor, também verificar referências de precisão. Certifique-se de que todas as figuras e tabelas são mencionadas no texto, e que todos referências são citadas no texto. Arquivos das figuras e tabelas (ver abaixo) devem ser separadas.

Informação de Envio

Autores são obrigados a fornecer as seguintes informações com os seus envios eletrônicos: Autor de submeter o artigo; título do artigo; autores (lista completa); tipo de artigo e sessão; estatuto de artigo (por exemplo, novo, revisado, etc.); endereço postal; endereço de e-mail; número de telefone; fax número; nomes e tipos de arquivos enviados.

Autores brasileiros não deve traduzir seus endereços institucionais. Estes devem permanecer na língua original (Português).

As versões revistas: Autores que apresentam uma versão revisada de um artigo, devem incluir uma lista de alterações, bem como as respostas aos árbitros (ou editor técnico). Todos os arquivos, não apenas aqueles revisados, para a versão final do documento devem ser enviado.

Reconhecimento de envios eletrônicos: recepção bem sucedida e processamento de Segundo o autor será reconhecido por e-mail quando o manuscrito submetido tiver sido verificado. Se nenhuma resposta foi recebida dentro de uma semana, o autor deve entrar em contato com o editor em [gmr@geneticsmr.com].

Revisão: Os artigos são revisados anonimamente por árbitros independentes. Os autores são encorajados para sugerir nomes dos revisores especialistas, mas a seleção continua a ser prerrogativa dos editores. Para facilitar o processo de revisão, os autores podem enviar material suplementar, como citado aceites, mas ainda não trabalhos, que podem ser importantes para a avaliação do manuscrito publicado.

Um artigo de revisão deve conter: um resumo de 250 palavras ou menos, não mais do que seis chave palavras, um título de corrida e não mais de 60 referências. Deve ser dividido em seções com títulos e legendas apropriados.

Preparação do manuscrito

Ordenar as seções compreendendo o manuscrito da seguinte forma: título, correndo título, autor, endereço, resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, recordgments e referências.

Título da página: A página de título deve incluir o título do artigo, nomes dos autores (nomes e as iniciais (apenas) pensar em serviços de indexação), e afiliação dos autores. A afiliação deve compreendem o departamento, instituição (geralmente universidade ou empresa), cidade e estado (ou nação). A página de título deve incluir o nome e endereço completo, número de telefone, número de fax

e endereço do autor designados para analisar provas e-mail. A running título de nenhum deve ser fornecido mais de 60 caracteres (incluindo espaços).

Resumo: Um resumo de até 250 palavras, espaçamento simples, é exigido de artigos de pesquisa e relatórios e devem ser organizados em um parágrafo. A informação seguinte (sem cabeça- Seres) devem ser incluídos: finalidade, métodos, resultados (por favor informe os dados numéricos (média $\pm$ SE) para resultados significativos), e conclusões. Os artigos de revisão também exigem um resumo, que não precisam incluir todos esses itens.

Palavras-chave: A lista de palavras-chave ou termos de indexação (até seis) deve ser incluído.

Formatação do texto: Os títulos devem ser ousados, e as primeiras letras maiúsculas e alinhado à esquerda. Todo o texto deve ser definido em fonte Times New Roman, tamanho 12, alinhado à esquerda, espaçamento simples. Não justificam a margem direita. Deixar apenas um (1) espaço após períodos. Os parágrafos não devem ser recuados; a não ser que haja linhas em branco entre eles. Use linha somente no final de parágrafos. Não se deve usar tabulações ou espaços para criar travessões. Use a fonte Symbol para símbolos e caracteres especiais. Não use editores de equação ou notas utilitárias de rodapé. Salvar equações como imagens. As equações devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos entre parênteses no lado direito da página.

Notas de rodapé: As notas de rodapé devem ser evitados. Quando a sua utilização é absolutamente necessário, febre notas devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e devem ser colocados na parte inferior da página a que se referem. Inserir uma linha acima da nota, de modo que é ajustado fora a partir do texto.

Deve ser tomado cuidado especial para assegurar que todas as tabelas são **corretamente:**

Quadros / Gráficos formatados. Símbolos científicos utilizados devem estar em símbolo ou Times New Roman. As tabelas devem estar em uma página separada, numeradas consecutivamente (em algarismos arábicos), referida pelo número no texto e projetado para caber na coluna ou página tamanho do artigo. Use tabelas com células a colunas separadas. Não utilize espaços, listas ou linhas verticais. Esquerda justificar o título acima da tabela. Indicar a localização de cada tabela dentro do manuscrito.

Ilustrações: Ilustrações / figuras (fotografias, desenhos, diagramas e gráficos) devem cada um, ser em um único arquivo, numerados de uma série consecutiva de números árabes na ordem em que elas são citadas no texto. As ilustrações devem ser submetidas em arquivos separados. Todas as ilustrações são para ser fornecidas em formato JPEG (jpg) em cores ou preto e branco. As imagens devem ser salvas como separado, autônomo arquivos. A resolução da imagem deve ser de 300 dpi. Não inclua imagens em o arquivo de texto. Indicar a localização de cada figura dentro do texto. Não se esqueça de enviar a lenda em uma página separada. Os autores também deve enviar, por correio, uma versão impressa das figuras. Estes devem ser de pelo menos 10 x 15 cm, até US tamanho carta, de modo que os dados podem ser digitalizados (no caso de o arquivos figura não são adequadas) para garantir uma boa qualidade para a publicação online.

Abreviaturas: Tente usar abreviaturas no texto com moderação. Escreva abreviaturas na totalidade antes de a primeira vez que são usadas no texto. Utilize o sistema métrico para todos os momentos sem períodos (cm, ml, s). Defina todos os símbolos usados nas equações e fórmulas. Não abreviar a palavra "Figura" ou "Tabela" em títulos ou texto.

Agradecimentos: Todos os reconhecimentos (incluindo aqueles para concessão e financeira apoio) devem ser digitados em um parágrafo precedente diretamente a seção de referência. Autores de manuscritos submetidos a GMR deverão indicar a fonte de todo o financiamento que permitiu a pesquisa descrita a empreender.

Referências: As referências no texto devem incluir o nome do autor e o ano entre parênteses, por exemplo (Searle, 1961) ou (Rei e Wilson, 1975). Quando uma referência com mais de dois autores é citado, apenas o primeiro autor é nomeado, por exemplo (Comstock et al., 1958). As

referências devem ser citadas no texto em ordem cronológica, por exemplo (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). Referências a "resultados não publicados" e "trabalhos submetidos" deve aparecer no texto em parênteses após o nome do (s) indivíduo (s). Exemplo: (KS Pereira, Martins e PK TM Silva, resultados não publicados).

Não mais do que 40 referências devem ser citadas em um artigo, 20 referências em uma comunicação de curto e 60 referências em um artigo de revisão.

Referências, sob o título "Referências", devem incluir apenas obras referidas no texto. Esta seção deve ser organizada em ordem alfabética, o sobrenome do primeiro autor.

As referências devem ser citadas as seguintes: os papéis do jornal - nomes e iniciais dos quatro primeiros autores (Depois o uso et al.), Ano, título do periódico abreviado de acordo com a PubMed ou Web of Science, número do volume, número primeira e última página; livros - nomes dos autores, ano, título completo, edição, editores, endereço (cidade); artigos publicados em simpósios - nomes dos autores, ano, título completo do livro, nome (s) do editor (s) entre parênteses, editor, endereço (cidade), primeiro e últimos números de página.

As referências devem consistir principalmente de artigos de periódicos indexados. Referências para as técnicas que são essenciais para a compreensão ou a repetição dos métodos devem estar sempre acessíveis (indexados).

Estilo de referência: A lista de referências no final do artigo deve seguir o formato solicitado pela GMR. O link abaixo pode ser acessado para ver como as referências devem aparecer.

Exemplos de estilo de referência

Informações gerais de estilo GMR

ANEXO III – NORMAS DA REVISTA BMC INFECTIOUS DISEASE

Instructions for authors

Research articles

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#). See '[About this journal](#)' for information about policies and the refereeing process. We also provide a collection of links to [useful tools](#) and resources for scientific authors on our page.

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our [Editorial Policies](#). Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research will not be considered.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *BMC Infectious Diseases* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *BMC Infectious Diseases* prefers [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About BMC Infectious Diseases](#)' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editorial team, Editorial Advisors, Section Editors and Associate Editors.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the publication procedures.

Publishing Datasets

Through a special arrangement with [LabArchives](#), LLC, authors submitting manuscripts to BMC Infectious Diseases can obtain a [complimentary subscription to LabArchives](#) with an allotment of 100MB of storage. LabArchives is an Electronic Laboratory Notebook which will enable scientists to share and publish data files in situ; you can then link your paper to these data. Data files linked to published articles are assigned digital object identifiers (DOIs) and will remain available in perpetuity. Use of LabArchives or similar data publishing services does not replace preexisting data deposition requirements, such as for nucleic acid sequences, protein sequences and atomic coordinates.

Instructions on assigning DOIs to datasets, so they can be permanently linked to publications, can be found on the LabArchives website. Use of LabArchives' software has no influence on the editorial decision to accept or reject a manuscript.

Authors linking datasets to their publications should include an [Availability of supporting data](#) section in their manuscript and cite the dataset in their reference list.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Infectious Diseases* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Methods](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)
- [Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in

the “acknowledgements” section in accordance with the instructions below. Please note that the individual names may not be included in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the [CONSORT extension for abstracts](#).

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see ['About this journal'](#).

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in ['About this journal'](#).

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or

risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past three years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to [ICMJE guidelines](#), An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, a department chair who provided only general support, or those who contributed as part of a large collaboration group.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

If you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the “acknowledgements” section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first six before adding 'et al.'..

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

An Endnote style file is [available](#).

Examples of the *BMC Infectious Diseases* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted. An example of such software is [Papers](#), which is part of Springer Science+Business Media.

Examples of the *BMC Infectious Diseases* reference style

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *BMC Infectious Diseases* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@biomedcentral.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *BMC Infectious Diseases* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.

5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *BMC Infectious Diseases* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

BMC Infectious Diseases will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All lines and pages should be numbered. Authors are asked to ensure that line numbering is included in the main text file of their manuscript at the time of submission to facilitate

peer-review. Once a manuscript has been accepted, line numbering should be removed from the manuscript before publication. For authors submitting their manuscript in Microsoft Word please do not insert page breaks in your manuscript to ensure page numbering is consistent between your text file and the PDF generated from your submission and used in the review process.

- Use the *BMC Infectious Diseases* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

Curriculum Lattes

Nome

Plínio Pereira Gomes Junior 

Nome em citações bibliográficas

GOMES JUNIOR, P. P.

Formação Complementar

2013 - 2013

Metagenomas. (Carga horária: 3h).

Sociedade Brasileira de Genética.

2012 - 2012

Basic Course of travel medicine. (Carga horária: 4h).

Sociedad Latinoamericana de medicina del viajero.

2011 - 2011

Atualização Didático Pedagógica. (Carga horária: 75h).

Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Brasil.

Projetos de pesquisa

2011 - 2011

Conhecimento da População Sobre Dengue, Seus Vetores e Medidas de Controle em Serra Talhada, Pernambuco.

Descrição: A dengue é uma doença causada por vírus, que possui 4 sorotipos distintos.

Esta doença é transmitida pelas fêmeas dos mosquitos do Gênero Aedes spp. Este vetor utiliza-se de depósitos de água limpa, cristalina e parada para deposição dos ovos, os quais têm uma alta capacidade de resistir à dessecação. Ele vive

preferencialmente dentro de domicílios ou no peridomicílio. A Dengue é uma temática importante a ser abordada, porquanto seu conhecimento, sua identificação precoce, a tomada de decisão e implementação de medidas de maneira oportuna constituem ações primordiais para evitar óbitos. Para o controle de endemias, a saúde pública conta com ações de diversas naturezas, que visam o impacto direto nas relações causais, e com campanhas informativas para a instrução da população quanto aos cuidados e prevenção. Como a vacinação ainda não estão disponíveis, resta como alternativa a redução ou eliminação dos criadouros de mosquitos existentes nas residências e em seus arredores. Avaliar o grau de conhecimento da população sobre o ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. é de suma importância para desenvolver uma campanha contextualizada na realidade local. Portanto, optar-se-á pelo uso de questionários semi-estruturado na coleta de dados da pesquisa. Serão amostrados 20 domicílios em cada bairro do Município de Serra Talhada, a distribuição será feita por quarteirão tendo no mínimo 1 domicílio para cada quarteirão existente e os questionários serão aplicados apenas com pessoas maiores de 21 anos, com o devido consentimento. Além da área urbana, a área rural também será analisada com visita de 2 domicílios por comunidade..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Projetos de extensão

2013 - 2013

Aplicação da Educação Ambiental nas escolas públicas para o combate a Dengue no município de Serra Talhada - PE

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (6).

Integrantes: Plínio Pereira Gomes Junior - Coordenador.

2013 - 2013

Aplicação da Educação Ambiental nas escolas públicas para o combate a Leishmaniose no município de Serra Talhada - PE

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (6) .

Integrantes: Plínio Pereira Gomes Junior - Coordenador.

2013 - 2013

I jogos da integração UAST

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (9) .

Integrantes: Plínio Pereira Gomes Junior - Coordenador / Dário Rocha Falcon -

Integrante / Demácio Costa de Oliveira - Integrante / Dennis Willian Abdala - Integrante

/ Fabiana Maria da Silva - Integrante / José Feliciano S. Filho - Integrante / Carla

Evilane Santana de Almeida - Integrante.

2012 - 2012

Aplicação da Educação Ambiental nas escolas públicas para o combate a Dengue no município de Serra Talhada - PE

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (6) .

Integrantes: Plínio Pereira Gomes Junior - Coordenador.

2012 - 2012

Aplicação da Educação Ambiental nas escolas públicas para o combate a Leishmaniose no município de Serra Talhada - PE

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (6) .

Integrantes: Plínio Pereira Gomes Junior - Coordenador.

2011 - 2011

AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREVENÇÃO DE CÂNCER DE PELE EM SERRA TALHADA - PE

Descrição: Trata-se de uma campanha de conscientização sobre ações preventivas contra o câncer de pele voltada a questões ocupacionais, no que diz respeito ao conhecimento do trabalhador rural e mototaxistas, sobre o risco que correm devido a profissão estar diretamente ligada à exposição ao sol em horários críticos e de que forma os mesmos podem minimizar os riscos por meio de cuidados simples..

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Plínio Pereira Gomes Junior - Coordenador.

2010 - 2011

Saberes e fazeres das parteiras tradicionais: uma abordagem domiciliar rural - projeto parteiras tradicionais pernambucanas

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Plínio Pereira Gomes Junior - Coordenador / Luciana Leite Batista Matos - Integrante.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Freitas, M.T.S., **GOMES-JÚNIOR, P.P.**, Batista, M.V.A., Leal-Balbino, T.C., Araujo, A.L., Balbino, V.Q. Novel DNA extraction assay for molecular identification of *Aedes* spp eggs. Doi 10.4238/2014.
2. **GOMES JUNIOR, P. P.** ; Silva, T. A. ; Silva, S. I. . Notas Etnobotânicas Sobre Flora Apícola em Fragmentos de Mata Atlântica Inseridos nas Comunidades Circunvizinhas à Reserva Florestal de Dois Irmãos, Recife -PE. REB: Revista Eletrônica de Biologia, v. 5, p. 77-91, 2012.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. SILVA, A. P. A. ; Xavier, Morgana do Nascimento ; SANTOS, L. H. A. ; SILVA, R. F. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** ; Barbosa, Rosangela Maria Rodrigues . AVALIAÇÃO SAZONAL DA EFICIÊNCIA DA ARMADILHA BR-OVT ADESIVA NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO. In: 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2015, Fortaleza -CE. AVALIAÇÃO SAZONAL DA EFICIÊNCIA DA ARMADILHA BR-OVT ADESIVA NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO, 2015.
2. SILVA, A. P. A. ; SILVA, R. F. ; SANTOS, L. H. A. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** ; Barbosa, Rosangela Maria Rodrigues . VIGILÂNCIA DE CULICÍDEOS POR MEIO DE ASPIRADOR EM SERRA TALHADA - PE. In: 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2015, Fortaleza -CE. VIGILÂNCIA DE CULICÍDEOS POR MEIO DE ASPIRADOR EM SERRA TALHADA - PE, 2015.

3. **GOMES JUNIOR, P. P.** ; Lima, F.T. ; Oliveira, C.K.S. . A proposition of pratic activity: the use of didatic models of neuroscience to teach genetics. In: 59º Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia - SP. 59º Congresso Brasileiro de Genética, 2013. v. 59.

4. Lima, F.T. ; Bezerra, H.M.S. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Aula Prática de genética de populações ajudando a compreender conceitos. In: XIX Encontro de Genética do Nordeste - I Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste, 2012, Petrolina/Juazeiro. XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012.

Resumos publicados em anais de congressos

1. CRUZ, D. L. V. ; LIMA, F. L. S. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Levantamento das famílias de insetos acidentais encontrados em armadilhas aéreas durante a estação chuvosa em áreas de semiárido. In: IV Simpósio de Entomologia Aplicada, 2015, Recife - Pe. Levantamento das famílias de insetos acidentais encontrados em armadilhas aéreas durante a estação chuvosa em áreas de semiárido, 2015.

2. TERTO, W. D. S. ; SILVA, K. D. N. ; PEREIRA, P. R. ; Bezerra, H.M.S. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Frequências fenotípicas e genotípicas dos sistemas: ABO e RH em uma população da cidade de Serra Talhada - PE. In: XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012, Serra Talhada - PE. XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012.

3. Lima, F.T. ; Oliveira, C.K.S. ; Bezerra, H.M.S. ; Ferreira, A.P. ; Nascimento, J.M. ; Barbosa, M^a. E. O. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Positive relationship between socio-enviromental condition and number of dengue cases in municipality districts of Serra Talhada, Pernambuco, Brazil. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and

Malaria, 2012, Rio de Janeiro - RJ. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2012.

4. Paiva, W.V.M. ; Paiva, S.S.L. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Developmental Variation of Larvae of *Aedes aegypti* to different wavelengths of light. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2012, Rio de Janeiro - RJ. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2012.

5. Araújo, A.L. ; Aragão, N.C. ; Cardoso, M.V. ; Batista, M.V.A. ; Balbino, V.Q. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . The use of ovitraps in monitoring of *Aedes aegypti* populations in Serra Talhada city, Pernambuco, Brazil. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2012, Rio de Janeiro - RJ. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2012.

6. Oliveira, C.K.S. ; LIMA, Dayse Aline Araujo ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Preparações histológicas com extrato de cochonilha-de-carmim (*Dactylopius ceylonicus*) utilizado na folha da Jibóia (*Epipremnum aureum*). In: XI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2011, Serra Talhada - PE. XI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2011.

7. BARBOZA, Vanessa Renata Sousa ; CARVALHO, Fernanda Letícia Nascimento ; LIMA, Dayse Aline Araujo ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Avaliação do grau de conhecimento sobre os raios ultravioleta e câncer de pele, dos alunos diurnos da Unidade Acadêmica de Serra Talhada - UFRPE. In: 1o CNBio - 9a SEMBIO, 2010, Paulo Afonso. 1o Congresso Nordestino de Biologia, 2010.

8. Florentino, T.M^a.M. ; Cavalcante, S.T.R. ; Lima, L.K.A. ; Souza, L.P. ; Costa, E.F. ; Souza, L. P. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Construção de modelos didáticos para o estudo do desenvolvimento embrionário. In: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010, Serra Talhada - PE. X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010.

9. BARBOZA, Vanessa Renata Sousa ; CARVALHO, Fernanda Letícia Nascimento ; Miranda, A.F.J. ; Nunes, A.C.F. ; Sá, V.J. ; Biase, R.C.C.G. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Conhecimento dos estudantes universitários, a cerca dos fatores de risco causadores do câncer de boca no município Serra Talhada - Pe. In: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010, Serra Talhada - PE. X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010.

Apresentações de Trabalho

1. Araújo, A.L. ; Freitas, M.T.S. ; Batista, M.V.A. ; Balbino, V.Q. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . An efficient method of DNA extraction of single egg of Aedes aegypti. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Demais tipos de produção técnica

1. **GOMES JUNIOR, P. P.** . Técnicas de microscopia em Citologia. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Monografias de cursos de aperfeiçoamento/especialização

1. SILVA, L. F.; **GOMES JUNIOR, P. P.**; LIMA, M. M.. Participação em banca de José Vagner Delmiro Nogueira. Análise da percepção ambiental e sanitária dos moradores do bairro Clube zona urbana do município de Manaíra - PB. 2014. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Educação Ambiental e Sustentabilidade no semiárid) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. LIMA, I. C. A. E.; EVANGELISTA JUNIOR, W. S.; **GOMES JUNIOR, P. P.**. Participação em banca de Idalina Carla Angelo e Lima. Uso de atrativos alimentares na

captura de moscas das frutas (diptera: tehritidae) em goiabeira.. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

2. Nascimento, H.; Lima, M.M^a.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Participação em banca de Almerly Pereira Ferreira.Avaliação do conhecimento da população da cidade de Tabira - Pe sobre Hanseníase. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3. Clementino, R.H.; SILVA, A. L.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Participação em banca de Carla Katiane Santos Oliveira.Perfil epidemiológico dos casos positivos e dengue entre os anos de 2010 a 2012, no município de Serra Talhada - PE. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4. Lima, M.M^a.; Lima, A.L.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Participação em banca de Felipe Teixeira Lima.Conhecimento da população sobre Dengue, Seus vetores e medidas de controle em Serra Talhada, Pernambuco. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

5. SILVA, A. L.; Evangelista-Júnior, W.S.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Participação em banca de Maria Eugênia de Oliveira Barbosa.Díptero como vetor mecânico de patógenos à saúde pública em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

6. Honorato, R.M^a.; Evangelista-Júnior, W.S.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Participação em banca de Leandro de Pádua Souza.Insetos-praga e predadores associados à cultura do feijão-caupi. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

7. Lima, M.M^a.; **GOMES JUNIOR, P. P.**. Participação em banca de Isabeli Nogueira Morais. A esquistossomose no município de Tuparetama - PE. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
8. **GOMES JUNIOR, P. P.**. Participação em banca de Aline Cristina Ferreira. Maturidade gonadal (macroscópica e microscópica) de *Goyazana castelnaui* H. Milne-Edwards, 1853 (Brachyura, Trichodactylidae). 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
9. **GOMES JUNIOR, P. P.**; FALCON, D. R.; MELO, H. F.. Participação em banca de Claudeni Marques Santos. Saúde Pública de Serra Talhada: Doenças e Áreas Problemáticas. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
10. GUSMÃO, Cássia Lima Silva; SILVA, A. L.; **GOMES JUNIOR, P. P.**. Participação em banca de Vanessa Renata de Sousa Barboza. Conhecimento sobre câncer de boca na população de Serra Talhada - PE. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
11. SILVA, A. L.; GUSMÃO, Cássia Lima Silva; **GOMES JUNIOR, P. P.**. Participação em banca de Dayse Aline Araújo Lima. Avaliação do conhecimento dos trabalhadores rurais dos distritos de Serra Talhada - Pernambuco, quanto à prevenção do câncer de pele. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.
12. Lima, A.L.; Clementino, R.H.; **GOMES JUNIOR, P. P.**. Participação em banca de Ângela Monick Ramos Barbosa. Levantamento de plantas utilizadas por parteiras e suas utilidades. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

13. Rocha, L.L.; Clementino, R.H.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Participação em banca de Janicléa de Sá Aquino. Avaliação do conhecimento de parteiras sobre plantas potencialmente abortivas. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

14. GUSMÃO, Cássia Lima Silva; SILVA, A. L.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Participação em banca de Ana Maria de Oliveira Paiva. Análise dos níveis de antígeno prostático específico (PSA) de homens da cidade de Tavares - PB. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. SILVA, A. L.; Lima, M.M^a.; **GOMES JUNIOR, P. P.** Comissão Examinadora da Seleção Simplificada para Professor Substituto. 2013. Faculdade de Formação de Professores de Serra Talhada.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 4º Congresso Internacional de Tecnologia para o meio ambiente. Conhecimento dos alunos da Universidade Federal Rural de Pernambuco em Serra Talhada sobre a relação da saúde ambiental e a dengue. 2014. (Congresso).

2. 4º Congresso Internacional de Tecnologia para o meio ambiente. Conhecimento dos professores da rede municipal de Serra Talhada sobre Dengue. 2014. (Congresso).

3. 4º Congresso Internacional de Tecnologia para o meio ambiente. Uso do Georreferenciamento para diagnóstico da infraestrutura relacionadas com a Saúde Pública da cidade de Serra Talhada. 2014. (Congresso).

4. 4º Congresso Internacional de Tecnologia para o meio ambiente. Avaliação dos alunos universitários da Universidade Federal Rural de Pernambuco em Serra Talhada sobre Leishmaniose. 2014. (Congresso).
5. 4º Congresso Internacional de Tecnologia para o meio ambiente. Conhecimento dos Professores da rede municipal de ensino de Serra Talhada - PE sobre Leishmaniose. 2014. (Congresso).
6. 59º Congresso Brasileiro de Genética. A proposition of pratic activity: the use of didatic models of neuroscience to teach genetics. 2013. (Congresso).
7. XX congresso de nutrição parenteral e enteral. Avaliação do estado nutricional de escolares do município de Triunfo - PE. 2013. (Congresso).
8. XX congresso de nutrição parenteral e enteral. Análise alimentar de escolares do município de Triunfo - PE. 2013. (Congresso).
9. XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul. Perfil enteroparasitológico de escolares do município de Triunfo - PE. 2013. (Congresso).
10. I congresso Internacional de Ciências Biológicas. Diversidade parasitológica carreada em dipteros em regiões do semiárido Pernambucano. 2013. (Congresso).
11. I congresso Internacional de Ciências Biológicas. Análise da diversidade entomológica por meio de diferentes armadilhas CDC. 2013. (Congresso).
12. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Avaliação da glicemia de pacientes do laboratório municipal José Paulo Terto, de maio a dezembro de 2012. 2013. (Congresso).

13. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Prevalência dos parasitas encontrados em exames parasitológicos de fezes realizados na rede pública de saúde. 2013. (Congresso).
14. XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Avaliação dos exames parasitológicos realizados no Laboratório José Paulo Terto em Serra Talhada no período de Janeiro a dezembro de 2012. 2013. (Congresso).
15. VII Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas, Vi congresso de ensino pesquisa e extensão e III seminário de educação inclusiva CAV-UFPE e.Comportamento sexual entre estudantes universitários e seus respectivos fatores de risco.. 2013. (Simpósio).
16. VII Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas, Vi congresso de ensino pesquisa e extensão e III seminário de educação inclusiva CAV-UFPE e.Perfil higiênico-sanitário de escolares do município de Triunfo-PE. 2013. (Simpósio).
17. XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Frequências fenotípicas e genotípicas dos sistemas: ABO e RH em uma população da cidade de Serra Talhada - PE. 2012. (Congresso).
18. XVIII Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria. Developmental variation of larvae of *Aedes aegypti* exposed to different wavelengths of light. 2012. (Congresso).
19. XVIII Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria. The use of ovitraps in monitoring of *Aedes aegypti* populations in Serra Talhada city, Pernambuco, Brazil. 2012. (Congresso).

20. XVIII Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria. Positive relationship between socio-environmental condition and number of dengue cases in municipality districts of Serra Talhada, Pernambuco, Brazil. 2012. (Congresso).
21. XVIII Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria. An efficient method of DNA extraction of single egg of *Aedes aegypti*. 2012. (Congresso).
22. III Latin American Congress of Travel Medicine. 2012. (Congresso).
23. XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Levantamento dos casos de dengue ocorridos no município de Serra Talhada de janeiro de 2011 a setembro de 2012. 2012. (Congresso).
24. XIX encontro de genética do Nordeste. Aula prática de genética de populações, ajudando a compreender conceitos. 2012. (Encontro).
25. XI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Preparações histológicas com extrato de cochonilha-de-carmim (*Dactylopius ceylonicus*) utilizado na folha da Jibóia (*Epipremnum aureum*). 2011. (Congresso).
26. AGROSERTÃO. 2011. (Seminário).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. BAPTISTA, W. S. ; **GOMES JUNIOR, P. P.** . Feira do aluno empreendedor UAST. 2015. .
2. **GOMES JUNIOR, P. P.** ; OLIVEIRA, D. C. ; FALCON, D. R. ; SILVA, F. M. ; ABDALA, D. W. ; S. FILHO, J. F. . I jogos da integração UAST. 2013. (Outro).
3. **GOMES JUNIOR, P. P.** . XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. 2013. (Congresso).

4. SILVA, A. L. ; GUSMÃO, Cássia Lima Silva ; COSTA, Cynthia Maria Carneiro ; GOMES JUNIOR, P. P. . I simpósio de biologia aplicada ao semiárido. 2011. (Congresso).

5. SILVA, Ana Luiza ; GUSMÃO, Cássia Lima Silva ; COSTA, Cynthia Maria Carneiro ; GOMES JUNIOR, P. P. . III semana de Biologia da Unidade Acadêmica de Serra Talhada. 2011. (Congresso).

6. GOMES JUNIOR, P. P. ; COSTA, Cynthia Maria Carneiro ; SILVA, A. L. ; GUSMÃO, Cássia Lima Silva ; GARCIA, J. E. . Ambiente em Foco: de Charles Darwin ao Caos Climático. 2011. (Exposição).

Orientações

Orientações e supervisões concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Ariadja Monique de Sá Vanderlei. Avaliação do comportamento sexual entre estudantes universitários e seus respectivos fatores de risco na cidade de Serra Talhada. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
2. Luiz Henrique Alexandre dos Santos. Avaliação do Conhecimento dos Profissionais de Saúde sobre Dengue e Análise Estatística dos casos de Dengue de 2007 a 2013. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
3. Hudson Mateus da Silva Bezerra. Avaliação do Crescimento de Larvas de *Aedes aegypti* submetidas a diferentes concentrações de *Avicennia schaueriana*. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.

4. Sinthia Millena dos Santos Pereira. Análise estatística dos casos de doença de Chagas correlacionados à diversidade dos seus vetores em Pernambuco de 2009 a 2012. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
5. Joelma Machado do Nascimento. AVALIAÇÃO DOS CASOS DE DENGUE NAS PRINCIPAIS CIDADES PERNAMBUCANAS, DE 1996 A 2012.. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
6. Felipe Teixeira Lima. Conhecimento da população sobre dengue, seus vetores e medidas de controle em Serra Talhada, Pernambuco. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
7. Almery Pereira Ferreira. Avaliação do conhecimento da população da cidade de Tabira - PE, sobre hanseníase. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
8. Carla Katiane dos Santos de Oliveira. Perfil epidemiológico dos casos positivos de dengue no município de Serra Talhada - PE no período de 2010 a 2012. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
9. Maria Eugênia de Oliveira Barbosa. Díptero como vetor mecânico de patógenos à saúde pública em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.

- 10.** Walquíria Vieira Monteiro Paiva. Avaliação do desenvolvimento da fase jovem do *Aedes aegypti* L. sob a ação da radiação luminosa em diferentes comprimentos de onda. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
- 11.** Maria das Graças de Oliveira Ferreira. ANÁLISE DO PERFIL SOCIAL DAS MÃES ADOLESCENTES DO BAIRRO MUTIRÃO, SERRA TALHADA - PE. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
- 12.** Vanessa Renata de Sousa Barboza. Avaliação do conhecimento dos trabalhadores rurais sobre as formas de prevenção do câncer de boca no município de Serra Talhada - Pernambuco. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unid Acadêmica de Serra Talhada. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
- 13.** Dayse Aline Araújo Lima. Avaliação das formas de prevenção e nível de conhecimento dos trabalhadores rurais dos distritos de Serra Talhada - Pernambuco a respeito do câncer da pele. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
- 14.** Ângela Monick Ramos Barbosa. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como medicinais por parteiras no município de Serra Talhada - PE. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.
- 15.** Janiclêa de Sá Aquino. Plantas potencialmente abortivas conhecidas pelas parteiras de Serra Talhada - PE. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação

em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.

16. Ana Maria de Oliveira Paiva. Análise dos níveis de PSA da população masculina de Tavares - PB. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Orientador: Plínio Pereira Gomes Junior.

Educação e Popularização de C & T

Cursos de curta duração ministrados

1. GOMES JUNIOR, P. P. . Técnicas de microscopia em Citologia. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. GOMES JUNIOR, P. P. ; COSTA, Cynthia Maria Carneiro ; SILVA, A. L. ; GUSMÃO, Cássia Lima Silva ; GARCIA, J. E. . Ambiente em Foco: de Charles Darwin ao Caos Climático. 2011. (Exposição).