

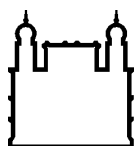
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**ANÁLISE DE VIREMIA E DA ULTRAESTRUTURA DE ÓRGÃOS DE
CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM LINHAGENS DO VÍRUS DENGUE
TIPO 2 (DENV-2).**

FERNANDA CUNHA JÁCOME

Rio de Janeiro
Março de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Fernanda Cunha Jácome

Análise de Viremia e da Ultraestrutura de Órgãos de Camundongos BALB/c Infectados com Linhagens do Vírus Dengue Tipo 2 (DENV-2).

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dr. Flávia Barreto dos Santos

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

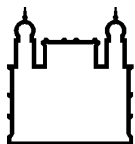
J17 Jácome, Fernanda Cunha

Análise de viremia e da ultraestrutura de órgãos de camundongos BALB/c infectados com linhagens do vírus Dengue tipo 2 (DENV-2) / Fernanda Cunha Jácome. – Rio de Janeiro, 2015.
xvii, 105 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 81-105

1. Dengue 2. 2. Modelo animal. 3. Linhagens. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: FERNANDA CUNHA JÁCOME

Análise de Viremia e da Ultraestrutura de Órgãos de Camundongos BALB/c Infectados com Linhagens do Vírus Dengue Tipo 2 (DENV-2).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flávia Barreto dos Santos

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado - Presidente (Fiocruz)

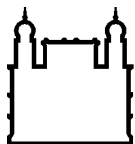
Prof. Dr. Elzinandes Leal de Azeredo (Fiocruz)

Prof. Dr. Valéria de Mello Coelho (UFRJ)

Prof. Dr. Carlos Aberto Basílio de Oliveira (UNIRIO)

Prof. Dr. Suzana Côrte-Real Faria (Fiocruz)

Rio de Janeiro, 13 de março de 2015.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Sérgio e Maria, à minha irmã Flávia e à amiga Débora.

AGRADECIMENTOS

A toda equipe Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, pelo apoio;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante o período de execução deste trabalho;

À minha querida orientadora Dra Flávia Barreto dos Santos, que me aceitou como aluna, num piscar de olhos, sem saber exatamente o que viria pela frente. Agradeço pelo conhecimento partilhado com muito carinho e paciência e pela oportunidade da realização deste trabalho;

À minha supervisora e amiga Dra Débora Ferreira Barreto-Vieira. Acima de tudo por acreditar em mim. Não fosse pela sua insistência em trazer-me de volta ao mundo acadêmico, eu não estaria escrevendo estas palavras. Obrigada por tudo;

À Dra Ortrud Monika Barth, chefe do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, onde este trabalho foi desenvolvido. Obrigada pela amizade, pelas conversas tranquilizadoras e pelo conhecimento transmitido;

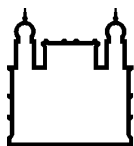
A toda equipe do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral pelo apoio técnico. Em especial, à aluna de PROVOC Ana Luisa, aos alunos de graduação Marcos Alexandre e Gabriela Caldas, ao mestrando Arthur Rasinhas e ao técnico Raphael Leonardo. Agradeço, ainda, pela amizade e infinita paciência. Essa dissertação, eu dedico a vocês também;

À Dra Rita Maria Ribeiro Nogueira, chefe do Laboratório de Flavivírus, onde parte deste trabalho foi realizada;

À mestranda Thiara Manuele, às doutorandas Priscila Conrado Guerra Nunes, Thaís Carneiro Choin, Nieli Farias e Fernanda Bruycker, à pós-doutoranda Dra. Monique Queiroz Lima e aos técnicos Allison de Araújo Fabri e José da Costa de Farias Filho pela imensa ajuda na realização dos experimentos no Laboratório de Flavivírus. Obrigada também pelos conselhos valiosos que me deram e pela experiência e conhecimento compartilhados;

Aos meus familiares, em especial à minha mãe, que sempre será meu porto seguro, ao meu pai e à minha irmã. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais;

Aos amigos e colegas que não foram citados, mas que de alguma forma fizeram parte desta jornada.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

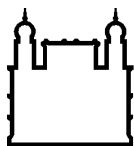
Análise de Viremia e da Ultraestrutura de Órgãos de Camundongos BALB/c Infectados com Linhagens do Vírus Dengue Tipo 2 (DENV-2).

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fernanda Cunha Jácome

O DENV-2 foi introduzido no Brasil em 1990, quando os primeiros casos de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e de Síndrome do Choque por Dengue (SCD) foram reportados. Em 2007 este sorotipo reemergiu, causando em 2008 a maior epidemia registrada no país até então. Estudos filogenéticos realizados com cepas de DENV-2 que circularam em 2007-2008 demonstram que os vírus reemergentes pertencem ao mesmo genótipo que os vírus inicialmente introduzidos no país, contudo, eles agrupam-se formando uma Linhagem distinta. O DENV-2, frequentemente associado com casos de FHD/SCD, tem sido o sorotipo tradicionalmente mais estudado devido a sua associação com grandes epidemias e com manifestações clínicas mais graves. Entretanto, estudos sobre a viremia induzida por Linhagens distintas de um mesmo genótipo do sorotipo 2 e sua associação com a gravidade da doença até o momento não haviam sido realizados. Ademais, um dos maiores desafios no que diz respeito ao estudo da patogênese do DENV e ao desenvolvimento de fármacos e vacinas contra a dengue é a ausência de um modelo animal que reproduza a doença tal qual esta ocorre em casos humanos, sendo o estabelecimento de modelos animais para estudos de infecção e doença causada pelos DENV de grande relevância para as diversas áreas de pesquisa em dengue. Diante deste cenário, este estudo teve como objetivo principal analisar as alterações morfológicas e a viremia da infecção de duas Linhagens distintas de DENV-2 epidêmicas, isoladas de pacientes e não neuroadaptadas em camundongos BALB/c. Os resultados demonstram a susceptibilidade do camundongo BALB/c às duas Linhagens do DENV-2 e a capacidade dos vírus se multiplicarem em diferentes órgãos, incluindo coração, pulmão, cérebro e baço. As alterações morfológicas induzidas pelas duas Linhagens são semelhantes bem como às alterações observadas em casos humanos de dengue e que a Linhagem I induz, em média, uma viremia mais elevada em todos os tipos de órgão testados.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise de Viremia e da Ultraestrutura de Órgãos de Camundongos BALB/c Infectados com Linhagens do Vírus Dengue Tipo 2 (DENV-2).

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fernanda Cunha Jácome

DENV-2 was introduced in Brazil in 1990, when the first cases of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) were reported. In 2007 this serotype re-emerged, causing in 2008 the largest epidemic registered in the country until then. Phylogenetic studies with DENV-2 strains that circulated in 2007-2008 showed that although the re-emerging viruses belong to the same genotype as the first viruses introduced in the country, they grouped as a distinct lineage. DENV-2 that is often associated with DHF/DSS cases, has been traditionally the most studied serotype because of its association with major epidemics and more severe clinical manifestations. However, studies on viremia induced by different lineages of the same genotype and its association with the disease severity have not yet been performed. Moreover, a major challenge regarding the study of the pathogenesis of DENV and the development of drugs and vaccines against dengue is the lack of an animal model which reproduces this disease as it occurs in human cases, thus, the development of animal models for studies of infection and disease caused by DENV is of great relevance to the various areas of dengue research. On that scenario, this study aims to analyze morphological alterations and viremia of infection of two different lineages of epidemic DENV-2, isolated from patients and nonneuroadapted, in BALB/c mice. The results demonstrate the susceptibility of BALB/c mouse to the two lineages of DENV-2 and the ability of the virus to replicate in different organs, including heart, lung, brain and spleen. Morphological changes induced by both DENV-2 lineages are similar to the changes observed in dengue human cases and Lineage I induces, on average, higher viremia in all tested organs types.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	vi
Índice	x
Índice de Figuras	xiii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xvi
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 O agente etiológico	18
1.2 Diversidade genética dos vírus dengue	19
1.3 Replicação dos vírus dengue	21
1.4 Células alvo das infecções pelo vírus dengue	22
1.5 Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue	23
1.5.1 Revisão da classificação das infecções por dengue	24
1.6 Epidemiologia	25
1.6.1 Dengue no mundo	25
1.6.2 Dengue no Brasil	27
1.7 Histopatologia e patogenia das infecções por dengue	28
1.8 Modelos experimentais para o estudo de infecção pelos vírus dengue.....	30
1.8.1 Primatas não humanos (PNH)	30
1.8.2 Modelos murinos	31
1.8.3 Modelos humanizados	31
1.8.4 Modelos imunodeficientes / interferon-deficientes	32
1.8.5 Modelos imunocompetentes	32
1.8.6 Camundongos BALB/c.....	33
1.9 Diagnóstico laboratorial das infecções por dengue	34
1.9.1 Isolamento viral.....	35
1.9.2 Testes sorológicos.....	35
1.9.3 Métodos moleculares para a detecção dos vírus dengue.....	36
1.10 Vacinas	37
1.10.1 Vacinas atenuadas	37
1.10.2 Vacinas inativadas e de subunidades.....	38
1.11 Justificativa.....	39
2 OBJETIVOS	41

2.1	Objetivo Geral.....	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Considerações éticas.....	42
3.2	Cepas de DENV-2	42
3.3	Camundongos BALB/c.....	42
3.4	Extração do genoma viral	43
3.5	RT-PCR em Tempo Real.....	43
3.6	Processamento das amostras para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET)	44
3.7	Análise estatística	45
3.8	Desenho experimental	45
4	RESULTADOS	47
4.1	Análise da suscetibilidade do camundongo BALB/c à infecção de duas Linhagens de DENV-2 pela detecção de genoma viral em órgãos e soro.....	47
4.2	Determinação da carga viral das duas Linhagens de DENV-2 em órgãos e soros dos camundongos infectados por RT-PCR em Tempo Real	48
4.2.1	Análise da carga viral das Linhagens I ou II de DENV-2 em camundongos infectados pela via intravenosa	49
4.2.2	Análise da carga viral das Linhagens I ou II de DENV-2 em camundongos infectados pela via intraperitoneal	51
4.3	Análise ultraestrutural em órgãos de camundongos BALB/c infectados pelas duas Linhagens de DENV-2 pelas via IV e IP.	53
4.3.1	Análise ultraestrutural de coração de camundongos BALB/c infectados com as Linhagens de DENV-2	54
4.3.2	Análise ultraestrutural de fígado de camundongos BALB/c infectados com as Linhagens de DENV-2	60
4.3.3	Análise ultraestrutural de pulmão de camundongos BALB/c infectados com as Linhagens de DENV-2	66
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	80

7	PERSPECTIVAS	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Partícula e genoma do DENV	19
Figura 2: Esquema da replicação dos vírus dengue	22
Figura 3: Classificação de dengue de acordo com a Organização Mundial da Saúde	25
Figura 4: Distribuição global do risco de infecção por DENV	36
Figura 5: Fluxograma do desenho experimental para as infecções de camundongos BALB/c com duas Linhagens de DENV-2	46
Figura 6: Quantificação do genoma viral em tecidos de camundongos BALB/c infectados por duas Linhagens de DENV-2, independente da via de inoculação	49
Figura 7: Quantificação do genoma viral em diferentes tecidos de camundongos BALB/c infectados	49
Figura 8: Quantificação do genoma viral em diferentes tecidos de camundongos BALB/c infectados	51
Figura 9: Corte ultrafino de coração mostrando área tecidual sem alterações	54
Figura 10: Células inflamatórias mononucleadas no interstício e plaqueta no capilar de coração.	55
Figura 11: Capilar apresentando acúmulo de líquido e célula endotelial apresentando prolongamentos de membrana e citoplasma espessado.	55
Figura 12: Partículas semelhantes aos vírus dengue em célula endotelial e cardiomiócitos.	56

Figura 13: Plaquetas e células inflamatórias mononucleadas no capilar e células endoteliais apresentando vesículas de transporte e prolongamentos de membrana plasmática	57
Figura 14: Células inflamatórias mononucleadas no interstício e acúmulo de líquido no capilar.	58
Figura 15: Inclusões perinucleares em cardiomiócitos.	58
Figura 16: Partículas semelhantes aos vírus dengue em célula endotelial de coração.	59
Figura 17: Células inflamatórias e plaquetas em capilares sinusóides e inclusões eletrondensas na região perinuclear de célula endotelial.	61
Figura 18: Inclusões lipídicas e microesteatoses em hepatócitos.	62
Figura 19: Células inflamatórias no interstício.	63
Figura 20: Ativação de endotélio evidenciado por prolongamentos de membrana da célula endotelial.	63
Figura 21: Microesteatose em hepatócitos.	64
Figura 22: Espessamento de septo interalveolar e células inflamatórias no pulmão	66
Figura 23: Acúmulo de líquido no vaso sanguíneo	67
Figura 24: Espessamento de septo interalveolar e células inflamatórias no pulmão	68
Figura 25: Plaqueta no capilar em pulmão	68

Lista de Tabelas e quadros

Tabela 1: Classificação genotípica baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E.	20
Tabela 2: Parâmetros de termociclagem do protocolo descrito por Jhonson et al., 2005	44
Tabela 3: Detecção de diferentes linhagens de DENV-2 por RT-PCR em Tempo Real em órgãos de camundongos BALB/c inoculados pelas vias intravenosa e intraperitoneal.	48
Tabela 4: Determinação da carga viral da Linhagem I de DENV-2 em órgãos e soro de camundongos BALB/C inoculados pela via intravenosa	50
Tabela 5: Determinação da carga viral da Linhagem II de DENV-2 em órgãos e soro de camundongos BALB/c inoculados pela via intravenosa	51
Tabela 6: Determinação da carga viral da Linhagem I de DENV-2 em órgãos e soro de camundongos BALB/c inoculados pela via intraperitoneal	52
Tabela 7: Determinação da carga viral da Linhagem II de DENV-2 em órgãos e soro de camundongos BALB/c inoculados pela via intraperitoneal	52
Tabela 8: Carga viral de Linhagens de DENV-2 em amostras de órgãos e soro que apresentaram título viral superiores ao inóculo para a infecção experimental dos camundongos BALB/c	53
Quadro 1: Alterações morfológicas observadas em coração de camundongos BALB/c infectados experimentalmente, em duplicata, pelas Linhagens I ou II de DENV-2	60
Quadro 2: Alterações morfológicas observadas em fígado de camundongos BALB/c infectados experimentalmente, em duplicata, pelas Linhagens I ou II de DENV-2	65
Quadro 3: Alterações morfológicas observadas em pulmão de camundongos BALB/c infectados experimentalmente, em duplicata, pelas Linhagens I ou II de DENV-2	69
Quadro 4: Alterações morfológicas observadas em cérebro de camundongos BALB/c infectados experimentalmente, em duplicata, pelas Linhagens I ou II de DENV-2	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	resposta imune dependente de anticorpos
ALT	alanina aminotransferase
AN	anticorpos neutralizantes
AST	aspartato aminotransferase
BLT	do inglês “bone marrow, liver, thymus”
CEUA	Comitê de Ética para a Utilização de Animais de Laboratório
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CE	células endoteliais
DC	dengue clássica
DENCO	do inglês “Dengue Control”
DENV	vírus dengue
DG	dengue grave
ECP	efeito citopático
FHD	febre hemorrágica do Dengue
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GSK	GlaxoSmithKline
HI	inibição de hemaglutinação
Hsp	do inglês “heat shock protein”
IFN	interferon
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
IP	intraperitoneal
IV	intravenosa
MET	microscópio eletrônico de transmissão
NOD	diabéticos não obesos
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.i.	pós-infecção
PNH	primatas não humanos
PSD	partícula semelhantes aos vírus dengue
RE	retículo endoplasmático

RT-PCR	reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SCD	Síndrome do Choque por Dengue
SCID	imunodeficiência combinada severa
TNF	fator de necrose tumoral
vRNA	RNA viral

1 INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose de maior importância no mundo e classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a doença viral transmitida por vetores com a propagação mais rápida, possuindo enorme potencial de causar grandes epidemias por todo o mundo (WHO, 2013).

Estimativas recentes sugerem que 390 milhões de pessoas são infectadas (Bhatt *et al.*, 2013), com 500 mil episódios de dengue grave e mais de 20 mil mortes relacionadas com a doença (Murray *et al.*, 2013), sendo que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2013).

1.1 O agente etiológico

Os DENV são arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Apresentam 4 sorotipos infectantes: DENV-1, -2, -3 e -4 e são mantidos na natureza por um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o homem, o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (Gubler *et al.*, 2002). Em 2013, um quinto sorotipo (DENV-5) foi sugerido durante a investigação de um caso ocorrido em 2007 em Sarawak na Malásia, a partir do soro de um fazendeiro de 37 anos (Normile *et al.*, 2013). Estudos filogenéticos e de neutralização indicam a existência do novo sorotipo e, esta nova descoberta, poderá implicar no controle da doença e no desenvolvimento de vacinas (Mustafa *et al.*, 2015).

A infecção por um dos sorotipos garante imunidade duradoura a este sorotipo e imunidade transiente aos outros sorotipos. Os vírus são envelopados, esféricos, possuem nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e medem cerca de 50 nanômetros de diâmetro (Figura 1a). Seu é genoma é de RNA de fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11.000 pares de bases (Wengler *et al.*, 1978) que codificam uma poliproteína precursora contendo 3 proteínas estruturais, E (envelope), prM (precursora da membrana) e C (capsídeo), constituintes da partícula viral madura e 7 proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que são expressas nas células infectadas (figura 1b) (Rice *et al.*, 1985; Lindenbach *et al.*, 2001).

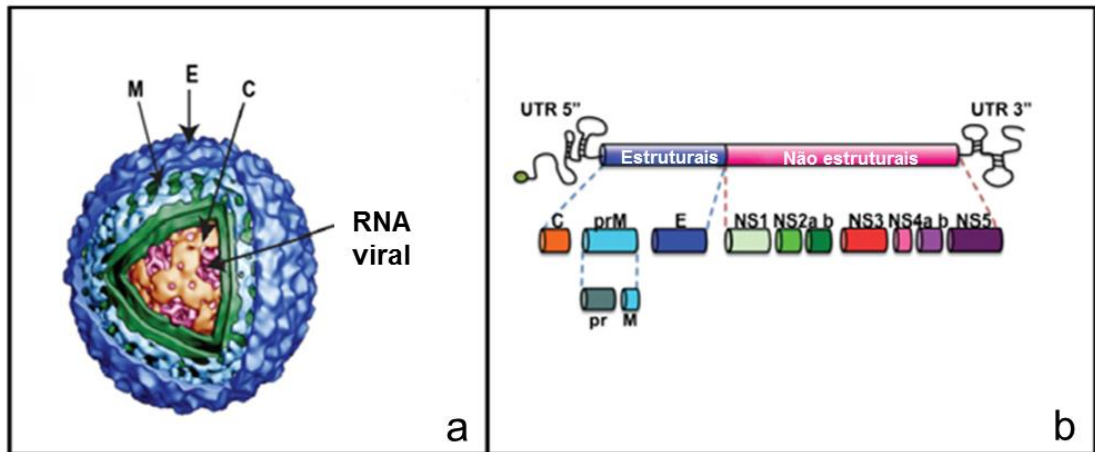


Figura 1. Partícula (a) e genoma (b) do DENV: proteína precursora da proteína de membrana (prM); proteína de membrana (M); proteína do envelope (E); proteína do capsídeo (C); proteínas não estruturais 1-5 (NS1-5); regiões não traduzidas (UTR). Modifício de Rosa Maria Del Angel, 2013.

1.2 Diversidade genética dos vírus dengue

A variabilidade genética dos DENV pode ser atribuída à falta de um mecanismo de correção da RNA polimerase viral que acredita-se ser capaz de produzir uma mutação por rodada de replicação do genoma (Steinhauer *et al.*, 1992; Drake *et al.*, 1993). Dados filogenéticos e de epidemiologia molecular subdividem os DENV em diferentes genótipos, os quais são geralmente associados a diferentes áreas geográficas (Chen *et al.*, 2011).

Diferenças entre cepas de DENV foram detectadas pela primeira vez através de estudos sorológicos utilizando anticorpos produzidos através da inoculação do vírus em animais de laboratório (Sabin *et al.*, 1952). Já as primeiras evidências genéticas de diferenças entre cepas dentro de um mesmo sorotipo vieram com a utilização do método de RNA *fingerprinting*. As cepas eram agrupadas em topotipos e observou-se que cepas isoladas na mesma região geográfica compartilhavam mais semelhanças do que cepas isoladas em outras áreas (Veza *et al.*, 1980; Repik *et al.*, 1983).

Atualmente, o sequenciamento de ácidos nucleicos permite o agrupamento destes vírus em grupos geneticamente distintos (genótipos) dentro dos 4 sorotipos. Genótipos são definidos como clusters de DENV com diferenças de sequências menores que 6% dentro de uma dada região do genoma (Rico-Rese *et al.*, 1990).

Baseados no sequenciamento completo do gene E, Weaver e Vasilakis (2009) propõem a divisão do DENV-1 em 5 genótipos, DENV-2 em 6 genótipos, do DENV-3 em 5 genótipos e do DENV-4 em 4 genótipos (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação genotípica baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E

Sorotipo	Genótipo	Distribuição geográfica
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Leste da África
	II	Tailândia (1950-1960)
	III	Malásia (cepas selvagens)
	IV	Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália
	V	Américas, Oeste Africano, Ásia
DENV-2	Asiático I	Malásia e Tailândia
	Asiático II	Vietnã, da China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	Americano	América Latina, Caribe (1950-1960), Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico
	Sudeste Asiático/Americano	Tailândia, Vietnã, Américas (últimos 20 anos)
	Selvagem	Oeste Africano e Sudeste Asiático
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e Sul das Ilhas do Pacífico
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África, Samoa, Tailândia (1962)
	IV	Porto Rico, Américas Latina e Central, Taiti (1965)
	V	Filipinas (1956), Japão (1973), China (1980) América do Sul (2002-2004)
DENV-4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão (provenientes do Sudeste Asiático)
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (cepas recentes)
	IV	Malásia (cepas selvagens)

De acordo com Weaver e Vasilakis (2009).

No Brasil atualmente circula o genótipo Américas/África ou genótipo V de DENV-1, porém três linhagens distintas dentro deste genótipo foram descritas (dos Santos *et al.*, 2011). Para o DENV-2, foi descrita a existência de duas linhagens do genótipo do Sudeste Asiático/Americano de DENV-2 (Faria *et al.*, 2013) e de quatro linhagens do genótipo do Subcontinente Indiano ou genótipo III para os DENV-3 (Araújo *et al.*, 2009). Para o DENV-4 foi descrita a existência de dois genótipos (I e II) no país (Nunes *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2013).

1.3 Replicação dos vírus dengue

A infecção pelo DENV começa quando o mosquito vetor faz o seu repasto sanguíneo e o vírus é introduzido no hospedeiro. A partícula viral infecta uma célula permissiva através da ligação da proteína E a receptores celulares. Vários receptores já foram identificados. Dentre estes, o sulfato de heparina (Chen *et al.*, 1997), heat shock protein (Hsp) 70, Hsp 90 (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005), GRP78/Bip (Jindadamrongwech *et al.*, 2004), 37-kDa/67-kDa (Thepparit *et al.*, 2004) e DC-SIGN (Lozach *et al.*, 2005). Após a ligação desta proteína a um receptor, a partícula viral entra na célula através de um processo de endocitose. A acidificação do endossoma faz com que a membrana do envelope viral e a membrana do endossoma fusionem-se permitindo a entrada do nucleocapsídeo e a liberação do genoma para o citoplasma (Clyde *et al.*, 2006; Perera *et al.*, 2008), (Figura 2).

O domínio NS5-Pol da proteína NS5 é responsável pela replicação e tradução do genoma viral. Inicialmente, o RNA viral (vRNA) serve de RNA mensageiro para a tradução de uma poliproteína formada por três proteínas estruturais (C, prM e E) e cinco proteínas não estruturais (NS1 - NS5). Esta poliproteína é direcionada ao retículo endoplasmático (RE) onde é clivada pela proteína NS3 juntamente com seu co-fator NS2B. O vírus, então, sintetiza uma fita negativa de RNA que vai servir de molde para a produção do genoma viral (Clyde *et al.*, 2006; Perera *et al.*, 2008; Potisopon *et al.*, 2014), (Figura 2).

O RNA recém-sintetizado é empacotado pela proteína C para formar o nucleocapsídeo. No RE, partículas imaturas de DENV apresentam heterodímeros das proteínas prM e E. Ao migrar pela rede trans-Golgi, a acidificação do pH induz uma modificação conformacional da partícula e uma protease celular, furina, cliva a proteína prM para gerar partículas virais maduras onde a proteína E forma homodímeros. O produto da clivagem da prM pela furina fica associado aos vírions até que estes sejam liberados para o meio extracelular através do processo de exocitose (Perera *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008), (Figura 2).

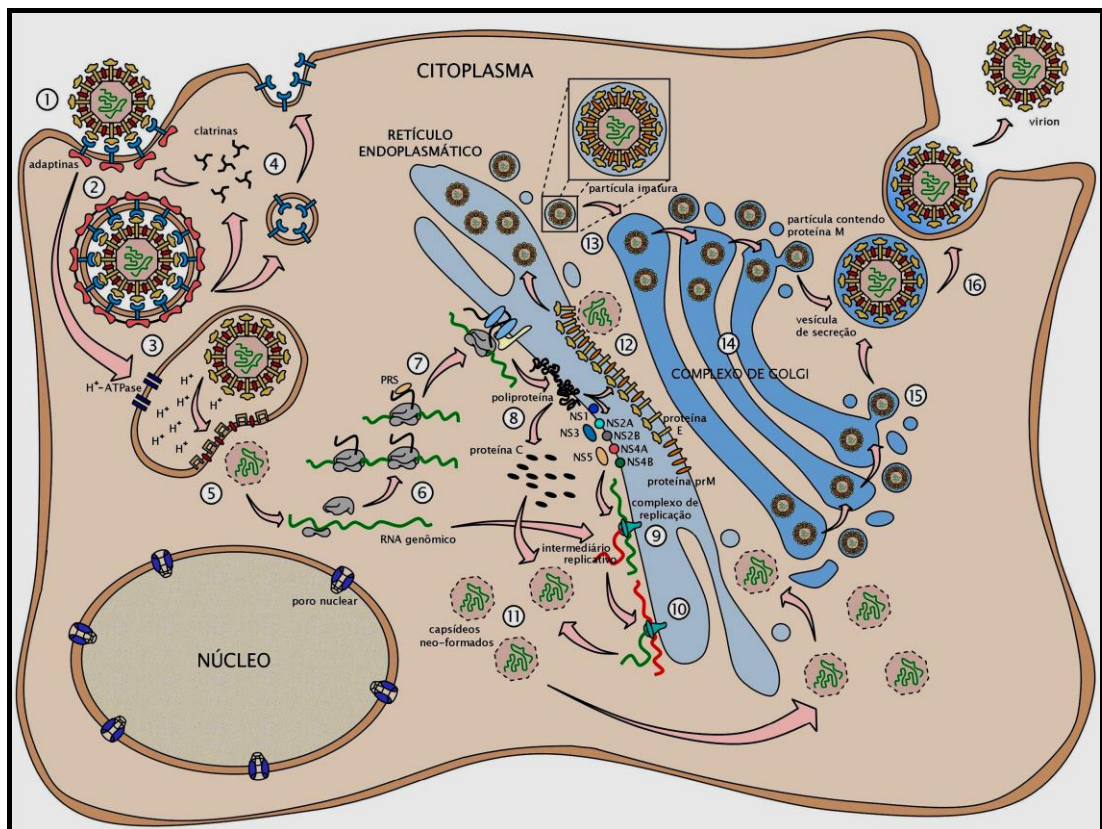


Figura 2: Esquema da replicação dos vírus dengue: adsorção da partícula viral à membrana celular (1); vesícula endocítica (2); formação e acidificação do endossoma e fusão das membranas vesicular e viral (3); reciclagem de receptores celulares (4); liberação do RNA viral (5); ligação do RNA viral às subunidades do ribossomo (6); tradução do RNA viral para a formação da poliproteína do DENV (7); clivagem da poliproteína do DENV no retículo endoplasmático (8); síntese da fita negativa do RNA viral (9); replicação do RNA viral (10); montagem do capsídeo (11); formação do envoltório viral junto à membrana do retículo endoplasmático (12); migração da partícula viral imatura para o complexo de Golgi (13); maturação da partícula viral no complexo de Golgi (14); partícula viral madura (15); saída do vírion por exocitose (16). Fonte: Oliveira, 2004.

1.4 Células alvo das infecções pelo vírus dengue

Estudos em pele humana mostraram que as primeiras células a serem infectadas pelos DENV são as células de Langerhans e células dendríticas da pele (Wu *et al.*, 2000, Marovich *et al.*, 2001).

Os vírus podem infectar diversos tipos celulares em diferentes tecidos e órgãos. Estudos realizados em autópsias e biópsias de pacientes demonstraram presença de RNA e antígeno viral em monócitos e linfócitos circulantes, células linfóides, macrófagos do baço, bem como no fígado, pulmão, baço, cérebro, rim,

medula óssea e coração (Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011). Ensaios de imunomarcção e hibridização *in situ* identificaram o antígeno viral ou a fita positiva do RNA em células endoteliais no fígado, pulmão e baço (Jessie *et al.*, 2004; Balsitis *et al.*, 2009; Póvoa *et al.*, 2014).

Linfócitos humanos infectados por DENV-2 após três dias de cultivo são capazes de replicar o vírus (Theofilopoulos *et al.*, 1976). Em amostras de sangue periférico de pacientes na fase aguda da infecção, o vírus pôde ser recuperado principalmente de linfócitos B, mas também em monócitos, células “natural killer” e linfócitos T (King *et al.*, 1999).

O genoma viral já foi detectado em plaquetas isoladas de pacientes durante a fase aguda da infecção e partículas semelhantes aos DENV foram identificadas em plaquetas através de microscopia eletrônica de transmissão (Noisakran *et al.*, 2009).

Os DENV replicam no citoplasma das células dos vertebrados após um período de latência de 12 a 16 horas. A replicação viral ocorre no local da inoculação provalmente nas células retículo-endoteliais, células de Langerhans ou nos fibroblastos que se encarregam de levar o vírus até os linfonodos regionais, favorecendo sua disseminação no sangue, preferencialmente nos monócitos (Rothman *et al.*, 1999). Os DENV entram na célula por ligação específica da proteína E com receptores celulares, incluindo DC-SIGN (ICAM-3) (Lozach *et al.*, 2005) e receptores de manose, incluindo os monócitos, macrófagos e células dendríticas (Miller *et al.*, 2008), seguido do processo de endocitose (Chambers *et al.*, 1990).

1.5 Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue

A dengue é uma doença febril aguda causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais (Edelman & Hombach, 2008), que pode causar manifestações clínicas semelhantes (Rothman e Ennis, 1999), porém podem variar em intensidade de acordo com as características do hospedeiro e do vírus. O período de incubação pode variar de 3 a 15 dias, mas, em média, de 4 a 7 dias, após o qual a doença poderá se apresentar sob diferentes formas clínicas de acordo com a OMS: assintomática, indiferenciada, DC e FHD.

No DC a febre é geralmente de início súbito e dura em média de 2 a 7 dias. Os sintomas ainda podem incluir cefaléia, dor retro-orbital, sintomas gastrointestinais, mialgia, artralgia e rash (Souza *et al.*, 2008). Sintomas como

anorexia, náuseas, vômito e diarreia podem ser observados por 2 a 6 dias. Alguns pacientes podem evoluir para formas graves da doença e passam a apresentar sinais de alerta, principalmente no período de defervescência, que precede as manifestações hemorrágicas graves. As manifestações hemorrágicas, apesar de leves na DC podem ocorrer em alguns indivíduos, sendo mais comuns petéquias, equimoses, epistaxe, hemorragia gengival e metrorragias, surgindo no final do período febril (Cunha & Nogueira, 2005). A forma clássica é auto limitada e geralmente resulta em uma completa recuperação (Nishiura & Halstead, 2007).

A forma mais grave do dengue, segundo a classificação utilizada pela OMS (1997), é a FHD/Síndrome do Choque por dengue (SCD), que possui 4 graus de gravidade e ocorre com maior frequência nas infecções secundárias. É definida pelos seguintes critérios: febre, tendências hemorrágicas, trombocitopenia e extravasamento de plasma. Os Graus I e II são considerados os Graus mais brandos da FHD, enquanto os Graus III e IV representam a evolução da doença para o estágio de choque. Esta é uma classificação dinâmica e pode mudar rapidamente de acordo com a evolução e o estágio em que o paciente se encontra (Sá & Zagne, 2008).

1.5.1 Revisão da classificação das infecções por dengue

A Organização Mundial da Saúde propôs uma nova classificação dos casos de dengue, a partir da iniciativa intitulada *Dengue Control* (DENCO) que possui o objetivo de orientar médicos na identificação precoce de casos graves (OMS, 2009). Observações preliminares do DENCO confirmaram que utilizando um conjunto de parâmetros clínicos e/ou laboratoriais, é possível a distinção entre pacientes apresentando dengue grave ou não (OMS, 2009), (Figura 3).

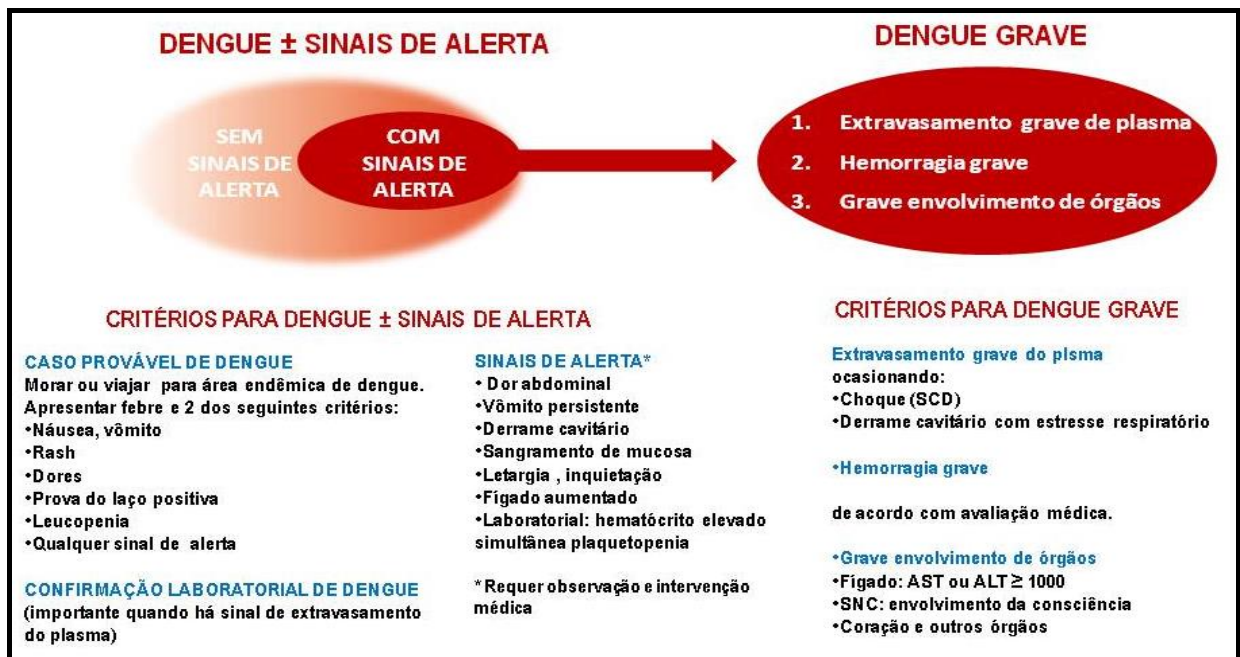


Figura 3: Classificação de dengue de acordo com a Organização Mundial de Saúde (Adaptado de OMS, 2009).

Desde o estabelecimento da classificação de casos em dengue e dengue grave, tem sido possível identificar a gravidade dos casos em tempo real para tomada de decisões, medir e comparar a mortalidade e morbidade em países e globalmente bem como para disparar planos de contingência precocemente. Tais análises baseiam-se no número e gravidade de casos reportados (Horstick *et al.*, 2015).

1.6 Epidemiologia

1.6.1 Dengue no mundo

Os primeiros relatos de uma doença semelhante à dengue podem ser encontrados em enciclopédias médicas chinesas datadas da dinastia Chin (265 a 420) e da dinastia Sung (992) (Gubler *et al.*, 2006). Entretanto, as primeiras epidemias de dengue ocorreram entre 1779 e 1780 simultaneamente na Ásia, África e América do Norte. Nesta época, a dengue era considerada uma doença benigna e não-fatal contraída por visitantes dos trópicos e os longos intervalos entre grandes epidemias se justificavam pelo fato de que vírus e mosquitos apenas circulavam entre populações através de viagens marítimas (Gubler *et al.*, 1995).

Uma epidemia global de dengue começou no sudoeste asiático após a Segunda Guerra Mundial (Halstead *et al.*, 1992) e em 1975, casos de FHD

tornaram-se a principal causa de hospitalizações e morte entre crianças nesta área (Gubler *et al.*, 1995). A dengue foi reintroduzida no Pacífico no início dos anos 1970 e epidemias causadas pelos 4 sorotipos já foram reportadas. Na África, o número de epidemias tem crescido significativamente desde a década de 1980, sendo a região leste da África a área onde há maior ocorrência da doença (Gubler *et al.*, 1995).

Nas Américas uma campanha objetivando o controle da febre amarela liderada pela Organização Pan-americana de Saúde erradicou o mosquito *Ae. Aegypti* durante as décadas de 1950 e 1960. Durante esse período, epidemias de dengue ocorriam esporadicamente em ilhas do Caribe. Com a descontinuação do programa de erradicação do mosquito, os DENV voltaram a circular em países do continente americano. Em 1970, o DENV-2 estava presente nas Américas e o DENV-3 apresentava uma distribuição focal na Colômbia e em Porto Rico. O DENV-1 foi introduzido em 1977 causando epidemias na Jamaica, em Cuba, em Porto Rico e na Venezuela. Mais tarde, atingiu outros países caribenhos além de México, América Central e o norte da América do Sul. Em 1981, além da introdução do DENV-4 no leste Ilhas do Caribe, um novo genótipo de DENV-2 proveniente do sudoeste asiático causou a primeira grande epidemia de FHD em Cuba. Este genótipo espalhou-se rapidamente e em 1995, 14 países do continente americano já havia reportado casos confirmados de FHD (Guzman *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, a incidência de dengue tem crescido dramaticamente no mundo, com mudanças no perfil epidemiológico (Wilson & Chen, 2015). Com mais de um terço da população mundial vivendo em áreas de risco de infecção, o DENV é a principal causa de doenças e mortes nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Antes da década de 1970 apenas 9 países registravam epidemias graves. Hoje, contudo, a doença é endêmica em mais de 100 países da África, Américas, Sudoeste Asiático e regiões oeste do Pacífico (OMS, 2014).

As áreas mais afetadas são as Américas, o sudoeste asiático e as regiões oeste do Pacífico, onde em 2010, mais de 2,3 milhões de casos foram notificados. Em 2013, o número de casos reportados somente na Américas foi de 2,35 milhões. Entretanto, com o crescente número de casos, a dengue tem espalhado-se por novas áreas e atualmente existe na Europa a ameaça de possíveis surtos. Em 2010 foram reportados casos autóctones na França e Croácia. Em 2012, um surto na Ilha da Madeira, em Portugal, resultou em mais de 2000 casos, além de casos importados em outros 10 países europeus. Em 2013 foram notificados casos na

Flórida, Estados Unidos e Yunnan, na China. Já em 2014, número crescente de casos de DENV-3 tem afetado países das Ilhas do Pacífico (OMS, 2014).

A figura 5 mostra a atual distribuição global do risco de infecção pelos DENV (Guzmán & Harris, 2014).

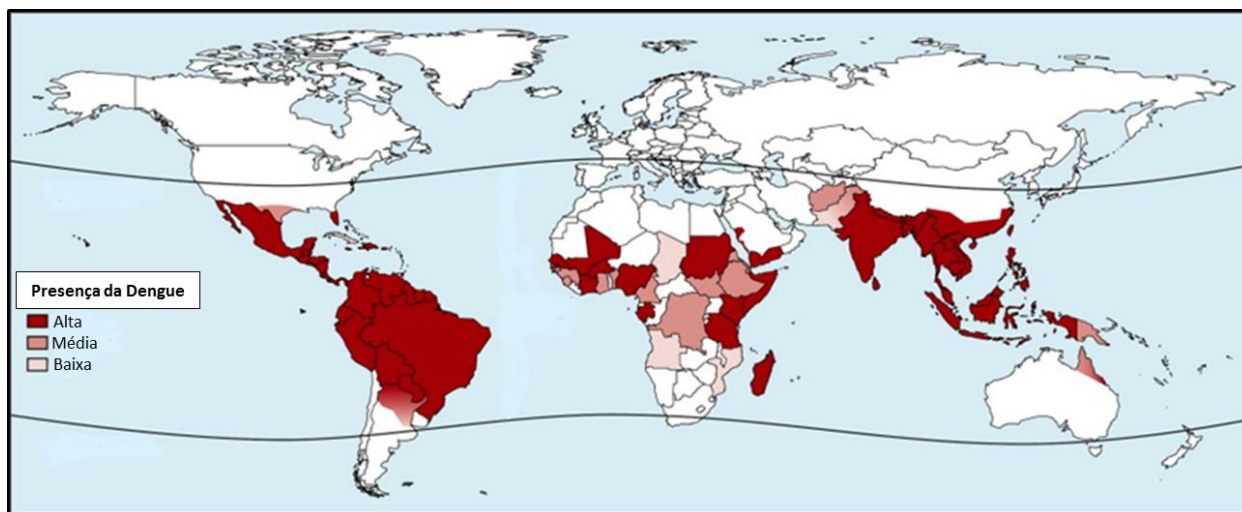


Figura 4: Distribuição global do risco de infecção por DENV (Modificado de Guzman & Harris, 2014).

1.6.2 Dengue no Brasil

A primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu no início da década de 1980 na cidade de Boa Vista, Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4 (DENV-1 e DENV-4), com sete mil casos notificados, porém a transmissão permaneceu restrita à cidade (Osanai *et al.*, 1983).

No entanto, em 1986, o DENV-1 foi isolado em Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro, RJ (Schatzmayr *et al.*, 1986). O intenso fluxo de pessoas e a proximidade aos grandes centros urbanos facilitaram a rápida dispersão do vírus, causando uma epidemia explosiva com 92 mil casos reportados (Nogueira *et al.*, 1999).

Em 1990, um novo surto ocorreu na Região Metropolitana do RJ, na cidade de Niterói, onde o DENV-2 foi isolado pela primeira vez no Brasil. Após a sua introdução a situação do dengue no país se agravou, sendo notificados os primeiros casos de FHD/SCD (Nogueira *et al.*, 1990, 1991, 1993).

A circulação do DENV-3 foi identificada em 2000, no município de Nova Iguaçu, RJ (Nogueira *et al.*, 2002). Em 2002, esse sorotipo foi responsável pela maior e mais grave epidemia do país que registrou 771.551 casos (Nogueira *et al.*, 2005), correspondendo a 80% dos casos ocorridos nas Américas.

Os anos de 2004 e 2005 foram considerados como interepidêmicos (Araújo *et al.* 2006). Em 2007, observou-se a reemergência do DENV-2, e a este sorotipo foi atribuída à ocorrência de uma grave epidemia no ano de 2008, com um total de 259.392 casos no estado do RJ (SVS, 2009) e um novo perfil epidemiológico, com a ocorrência de casos graves em crianças (Teixeira *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011). Em 2009, o DENV-1 substituiu o DENV-2 como sorotipo predominante no país, ocasionando uma grande epidemia, com mais de 1 milhão de casos no ano de 2010 (SVS, 2010).

Em julho de 2010, no estado de Roraima, o DENV-4 reemergiu cerca de 30 anos após a sua primeira detecção no país (Temporão *et al.*, 2011). Em 2011 e 2012 o DENV-4 se tornou o sorotipo predominante e, em 2013, foram registrados 1.476.917 casos de dengue, 6.566 casos graves e 573 óbitos. Em 2014 foram registrados no país 572.308 casos da doença, 673 casos de dengue grave e 400 óbitos (SVS, 2013, 2014).

1.7 Histopatologia e patogenia das infecções por dengue

Estudos de casos fatais de dengue têm demonstrado o envolvimento do fígado como um dos órgãos alvo na infecção pelos DENV (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Trung *et al.*, 2010). Análises histopatológicas do fígado de pacientes revelaram necrose de hepatócitos, focos de hemorragia e edema, infiltrado mononuclear no espaço periportal e vacuolização do citoplasma. Análises ultraestruturais revelaram inclusões lipídicas nos hepatócitos e aumento de mitocôndrias, sugerindo processo apoptótico. Partículas semelhantes aos DENV (PSD) foram observadas no citoplasma de hepatócitos (Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014). Acúmulo de lipídios próximo ao núcleo (microesteatose) e macroesteatose na periferia das células são alterações observadas (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Kularatne *et al.*, 2014; Póvoa *et al.*, 2014).

A alteração da função hepática mais comumente reportada é a elevação dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) que são observadas já nos primeiros dias do quadro febril e atingindo seu pico no período de convalescência (Kuo *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1997; Larreal *et al.*, 2005; Trung *et al.*, 2010). Níveis anormais de bilirrubina, fosfatase alcalina e gama glutamil transpeptidase também foram observados (Kuo *et al.*, 1992).

Dentre os pacientes que apresentam comprometimento cardíaco, a miocardite é a condição mais encontrada (Satarasinghe *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Salgado *et al.*, 2010; Weerakoon *et al.*, 2011), porém manifestações cardíacas associadas aos DENV não são comumente observadas (Gulati *et al.*, 2007). Quadros de arritmia ventricular e atrial, bradicardia e taquicardia sinusal, hipocinesia, choque cardiogênico, efusão pericardiaca, falência cardíaca e até infarto do miocárdio já foram associados a casos graves (Obeyesekere *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 2008; Salgado *et al.*, 2010).

Estudos histopatológicos de amostras de coração provenientes de casos fatais evidenciam edema intersticial com infiltrado inflamatório (miocardite) difuso formado principalmente por células mononucleadas e fibroblastos. Degradação das fibras cardíacas e do núcleo já foram reportados. Análises em microscópio eletrônico de transmissão (MET) demonstraram processo apoptótico sinalizado por alteração de mitocôndrias (Lee *et al.*, 2008; Weerakoon *et al.*, 2011; Póvoa *et al.*, 2014).

O genoma e antígeno NS1 dos DENV já foram detectados em amostras de coração (Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011) e a presença da fita negativa do RNA viral nas células endoteliais, mioblastos, células intersticiais do miocárdio e macrófagos, indicam a infecção do coração pelos DENV (Salgado *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014).

Análises histopatológicas de necropsias de pulmão de pacientes revelaram espessamento de septo interalveolar, infiltrado inflamatório mononuclear (pneumonia intersticial), hiperplasia de macrófagos alveolares, edema intersticial, focos de hemorragia e congestão alveolar difusa. Megacariócitos e fragmentos celulares semelhantes a plaquetas foram vistos no espaço alveolar (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2014). PSD foram observadas em células endoteliais (CE) e em macrófagos alveolares através de análise em MET (Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014).

O antígeno viral já foi detectado, através da técnica de imuno-histoquímica, em macrófagos alveolares, em pneumócitos tipo II, no endotélio vascular pulmonar e em monócitos circulando nos vasos sanguíneos do pulmão (Miagostovich *et al.*, 1997; Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009) e a fita negativa do RNA viral nestas células indica a replicação viral (Póvoa *et al.*, 2014).

A infecção pelos DENV pode também apresentar manifestações neurológicas que variam desde sintomas não específicos a convulsões, meningite e, mais

raramente, a síndrome de Guillian-Barré (Lum *et al.*, 1996; Salomon *et al.*, 2000; Cam *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2014).

Em exames de tomografia computadorizada e ressonância magnética, edema cerebral, lesões focais espalhadas, hematoma subdural e cerebelar e hemorragia intracraniana são observados (Salomon *et al.*, 2000; Cam *et al.*, 2001; Misra *et al.*, 2006; Bhoi *et al.*, 2014). Pleiocitose também já foi observada no líquido cefalorraquidiano (Misra *et al.*, 2006; Bhoi *et al.*, 2014). Tais manifestações podem ocorrer como resultado de hemorragia intracraniana, edema ou hipoperfusão cerebral, falência renal ou hepática ou distúrbios eletrolíticos (Varatharaj *et al.*, 2010).

Estudos ultraestruturais revelaram PSD no retículo endoplasmático de neuroglias e no espaço intersticial entre dois neurônios (Limonta *et al.*, 2012).

1.8 Modelos experimentais para o estudo de infecção pelos vírus dengue

O maior desafio para estudos da imunopatogênese dos DENV em humanos e para o desenvolvimento de vacinas e fármacos é a falta de um modelo experimental que desenvolva doença com aspectos semelhantes aos observados em casos humanos.

Uma das maiores dificuldades no que se refere ao desenvolvimento de um modelo animal adequado é a baixa replicação quando camundongos imunocompetentes são inoculados a partir de isolados clínicos e a ausência de sinais clínicos da doença em primatas não humanos (PNH) (Zompi *et al.*, 2012). Entretanto, vários modelos já foram propostos e têm sido de grande importância para a elucidação de vários aspectos da patogênese dos DENV.

1.8.1 Primatas não humanos (PNH)

Os PNH são naturalmente infectados pelos DENV e mantêm o ciclo de transmissão selvagem (Gubler *et al.*, 1998). Os quatro sorotipos do DENV são capazes de infectar e replicar em PNH produzindo viremia e anticorpos neutralizantes (AN). Apesar de tal modelo não apresentar sinais clínicos ele tem sido utilizado para a investigação da resposta imunológica e para testes de imunogenicidade e eficácia de vacinas candidatas antes que estas entrem em fase de testes clínicos (Zompi *et al.*, 2012; Sariol *et al.*, 2014; Zellweger *et al.*, 2014).

1.8.2 Modelos murinos

O desenvolvimento de um modelo murino tem sido desafiador, já que isolados clínicos, além de não causarem patologia, apresentam baixa ou nenhuma replicação em camundongos imunocompetentes (Zompi *et al.*, 2012; Zellwegwer *et al.*, 2014). A maioria dos modelos propostos utilizam camundongos humanizados ou imunodeficientes, utilizam vias invasivas de inoculação (Faugout *et al.*, 1990; Reut *et al.*, 1996) ou amostras de vírus adaptados (Johnson *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2012).

1.8.3 Modelos humanizados

Animais transplantados com tecidos ou que expressam genes humanos são ferramentas importantes nos estudos da patogênese da dengue (Legrand *et al.*, 2009).

Há na literatura descrição de diversos modelos humanizados capazes de desenvolver sinais clínicos compatíveis com a dengue. Camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID), transplantados com diferentes células de linhagens humanas apresentaram febre, exantema e eritema, trombocitopenia e até mesmo hemorragia branda no fígado (Na *et al.*, 1999; Bente *et al.*, 2005; Kuruvilla *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2011; Cox *et al.*, 2012) quando infectados pelos DENV por vias diferentes. Viremia também foi observada em muitos destes modelos (An *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1998; Kuruvilla *et al.*, 2007; Cox *et al.*, 2012; Frias-Staheli *et al.*, 2014)

O aumento dos níveis de citocinas foi verificado em camundongos BLT (do inglês *bone marrow, thymus, liver*) (Frias-Staheli *et al.*, 2014) e em camundongos transplantados com células tronco do sangue de cordão umbilical humano (Mota *et al.*, 2001). Mais especificamente, interferon (IFN) gama, interleucina (IL) 2 e fator de necrose tumoral (TNF) alfa foram produzidas por linfócitos T humanos em camundongos SCID, diabéticos não obesos (NOD) transplantados com células tronco hematopoéticas (Jaiswal *et al.*, 2009). Este mesmo modelo ao ser infectado através da picada de mosquito foi capaz de produzir TNF- α , IL-4 e IL-10 (Cox *et al.*, 2012). Além disso, os anticorpos detectados no soro destes camundongos humanizados infectados foram capazes de neutralizar o DENV (Kuruvilla *et al.*, 2007; Jaiswal *et al.*, 2009, 2012).

1.8.4 Modelos imunodeficientes / interferon-deficientes

Replicação robusta de DENV é observada em camundongos interferon-deficientes que não apresentam receptores para IFN α e β e IFN γ (AG129). Quando infectados com vírus adaptados, apresentam sinais neurológicos como paralisia, cegueira, permeabilidade vascular aumentada, níveis significantes de TNF α no soro e morte (Johnson *et al*, 1999; Shresta *et al*, 2006; Prestwood *et al*, 2008).

AG129 infectados com uma dose alta de DENV não adaptado apresentaram manifestações graves de DENV. Extravasamento severo de plasma levando a hemorragia, comprometimento de órgãos, hipercitocinemia e morte durante o pico da viremia foram observados neste modelo. Camundongos infectados com doses baixas da mesma cepa, no entanto, mostraram disseminação assintomática do DENV com replicação do vírus no cérebro, baço e fígado. Aumento de permeabilidade vascular também foi notado, contudo, não houve sinais de hemorragia (Tan *et al*, 2010).

Para estudos de amplificação de resposta imune dependente de anticorpos (ADE), camundongos AG129 são inoculados com doses subneutralizantes de anticorpos anti-DENV antes da infecção pelo vírus. Este modelo apresenta sinais de DG tais como permeabilidade vascular, elevados níveis de citocinas no soro, trombocitopenia, hematócrito elevado e hemorragia gastrointestinal. O antígeno ou genoma viral pode ser detectado em diferentes órgãos, como fígado, intestinos delgado e grosso, estômago, rim e cérebro (Balsitis *et al*, 2010; Zellweger *et al*, 2010).

1.8.5 Modelos imunocompetentes

A infecção de uma célula pelos DENV induz a produção de IFN α/β , que, ao ser receptado pela célula infectada ou por células vizinhas, inicia uma cascata de sinalização com objetivo de ativar a transcrição de genes codificantes para proteínas com atividade anti-DENV. O vírus codifica vários antagonistas de IFN capazes de bloquear sua produção ou a capacidade da célula infectada de sinalização através de receptores de IFN. A proteína NS5 do DENV é capaz de ligar-se à STAT2, uma proteína envolvida na transdução de sinalvia IFNR, e mediar a degradação da

mesma em humanos, mas não em camundongos, o que torna a replicação viral menos eficiente nestes animais (Ashour *et al*, 2010; Morrison *et al*, 2014).

No entanto, camundongos imunocompetentes infectados com DENV são capazes de produzir viremia (Paes *et al*, 2005; Barth *et al*, 2006; Costa *et al*, 2006; Yamanaka *et al*, 2009; Gonçalves *et al*, 2012). Infecção pela via intracraniana ou com vírus neuroadaptados ou adaptados em linhagens de células de camundongos podem causar manifestações neurológicas como encefalite, paralisia e morte (Falgout *et al*, 1990; Raut *et al*, 1996; Atrasheuskaya *et al*, 2003). Dentre os sinais clínicos apresentados por modelos imunocompetentes estão: trombocitopenia, hematócrito elevado, extravasamento de plasma, hemorragia e choque (Atrasheuskaya *et al*, 2003; Shresta *et al*, 2004; Chen *et al*, 2007). Aumento dos níveis de diferentes citocinas no soro e produção de AN já foram relatados (Atrasheuskaya *et al*, 2003; Shresta *et al*, 2004; Chen *et al*, 2007; Gonçalves *et al*, 2012). Envolvimento hepático também é observado: camundongos BALB/c e C57BL/6 têm seus níveis de enzimas hepáticas elevados quando infectados pelo DENV (Chen *et al*, 2004, Paes *et al*, 2009).

As alterações histopatológicas encontradas no fígado são: macro e microesteatose, infiltrado inflamatório mononuclear, vacuolização do citoplasma, edema intracelular, capilar sinusoide parcialmente colapsado, edema intersticial e intracelular, hemorragia e necrose (Chen *et al*, 2004; Paes *et al*, 2005, 2009; Gonçalves *et al*, 2012). Hemorragia no baço (Gonçalves *et al*, 2012). No pulmão, alterações incluem edema e pneumonia intersticial mononuclear, hiperplasia do epitélio bronquiolar, espessamento de septo interalveolar, células inflamatórias e debris nucleares nos alvéolos (Atrasheuskaya *et al*, 2003; Barth *et al*, 2006; Barreto *et al* 2009). Edema perivascular discreto também foi observado no cérebro (Atrasheuskaya *et al*, 2003).

1.8.6 Camundongos BALB/c

Estudos realizados com camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV pela via intravenosa (IV) demonstraram que este modelo é capaz de produzir viremia entre o 2º e o 11º dia pós-infecção (p.i.), atingindo o pico no 7º dia (Paes *et al*, 2005; Barth *et al*, 2006). Poucos sinais clínicos de DEN podem ser observados, dentre estes trombocitopenia, alteração da função hepática e sinais neurológicos como a paralisia e até morte. Estes camundongos são capazes de

expressar uma resposta imunológica contra DENV produzindo citocinas e AN (Atrasheuskaya *et al*, 2003).

Em cortes histológicos de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV pode-se observar espessamento de septo interalveolar, congestão vascular, macrófagos alveolares, células inflamatórias, debris nucleares e eritrócitos no espaço alveolar, plaquetas e células inflamatórias mono e polimorfonucleadas circulando em capilares, pequenos focos de hemorragia e edema, hiperplasia do epitélio bronquiolar. Partículas semelhantes ao DENV foram observadas em macrófagos alveolares (Atrasheuskaya *et al*, 2003; Barth *et al*, 2006; Barreto *et al* 2007, 2009).

Estudos histopatológicos e ultraestruturais de fígado revelam vacuolização do citoplasma, edema intercelular e intersticial, infiltrado inflamatório mononuclear, capilares sinusóide parcialmente colapsados e vasos sanguíneos dilatados, esteatose, eritrócitos internalizados por hepatócitos, hemorragia e necrose (Atrasheuskaya *et al*, 2003; Paes *et al*, 2009). No cérebro, nota-se edema perivascular discreto quando a infecção é feita por DENV neuroadaptado (Atrasheuskaya *et al*, 2003).

A análise ultraestrutural de tecido cardíaco revelou infiltrado inflamatório, células cardíacas com citoplasma rarefeito, CEs apresentando prolongamentos de membrana citoplasmática, presença de células inflamatórias mononucleadas e plaquetas no interstício e circulando no capilar e desorganização das fibras cardíacas (Rasinhas *et al*, 2013).

1.9 Diagnóstico laboratorial das infecções por dengue

O diagnóstico laboratorial das infecções por DENV pode ser realizado pelo isolamento e identificação do vírus, pela detecção de antígenos, do ácido nucléico viral e pela determinação de anticorpos específicos, imunoglobulinas M e G (IgM e IgG). O período da doença em que o paciente se encontra é importante para decisão de qual o método para diagnóstico mais apropriado para ser utilizado e para uma correta interpretação dos resultados obtidos, embora o tratamento não dependa do diagnóstico virológico (Kao *et al.*, 2005; Peeling *et al.*, 2010; Simmons *et al*, 2012).

1.9.1 Isolamento viral

O isolamento viral é considerado “padrão ouro” dado que é a evidência direta da infecção viral e com ele é possível diagnosticar a dengue durante a fase aguda, quando os títulos de anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis. Quatro sistemas de isolamento podem ser utilizados: inoculação intra-cerebral em camundongos recém-nascidos, cultura de células de mamíferos (como as linhagens de células LLC-MK2, Vero e BHK21), inoculação intra-torácica em mosquitos adultos e cultura de células de mosquito (AP-61, TRA-284, C6/36, AP64 e CLA-1) (Gubler, 1997; Guzmán e Kourí, 2002; Huang *et al.*, 2004). A inoculação do soro de paciente na fase aguda em células de mosquito *Ae. albopictus* (C6/36) tem sido, atualmente, o método mais utilizado (Igarashi, 1978, Guzman *et al.*, 2011). A presença do vírus é sugerida pela presença de efeito citopático (ECP) e a tipagem viral é realizada pela técnica de imunofluorescência utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos (Gubler *et al.*, 1984).

1.9.2 Testes sorológicos

O teste de inibição de hemaglutinação (HI) é baseado na capacidade dos DENVs têm de aglutinar eritrócitos. As vantagens do HI são a alta sensibilidade e relativa facilidade de execução. Contudo, além da necessidade de amostras pareadas, este teste não possibilita a identificação do sorotipo infectante (De Paula *et al.*, 2004; OMS, 2009).

O teste de fixação de complemento determina a presença de anticorpos ou antígenos em uma amostra utilizando a ação do sistema complemento. A ativação do sistema complemento pelo complexo antígeno-anticorpo resulta na formação de complexos que rompem a membrana celular. Se o anticorpo é ligado a antígenos absorvidos pelos eritrócitos estes são destruídos e ocorre a hemólise. Devido a sua complexidade, este teste não costuma ser utilizado na rotina laboratorial (De Paula *et al.*, 2004).

O teste de neutralização em placa baseia-se na neutralização do vírus por anticorpos. Anticorpos contidos no soro de um paciente infectado impedem que o vírus infecte uma cultura de células e se replique. Este teste é o mais sensível e específico dentre todos os testes sorológicos para o diagnóstico, contudo, é de alto custo, lento e de difícil interpretação (De Paula *et al.*, 2004).

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) que detectam anticorpos da classe IgM e IgG e antígenos NS1 têm sido os mais empregados para o diagnóstico das infecções por dengue, pois são mais baratos e de fácil execução (Guzman *et al.*, 2011).

O teste imunoenzimático de captura anticorpos IgM (MAC-ELISA) é o mais utilizado para confirmação de casos de dengue (Kuno *et al.* 1987). A presença de anticorpos IgM em única amostra de soro indica infecção ativa ou recente, contornando as dificuldades de obtenção de uma segunda coleta de sangue.

O ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA) pode classificar o tipo de infecção para a dengue (primária ou secundária) de acordo com os títulos observados no teste (Miagostovich *et al.*, 1999). A relação entre os títulos de IgM e IgG também pode ser usada na caracterização de respostas primárias e secundárias (OMS, 1997).

Testes comerciais para a captura de proteína NS1 têm sido utilizados para o diagnóstico precoce das infecções por dengue, por esta proteína ser secretada na corrente sanguínea durante a replicação viral, desde o primeiro dia do aparecimento dos sintomas e permanecendo detectável até o quinto ou sexto dia (Xu *et al.*, 2006; Dussart *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010; Guzman *et al.*, 2011; Andries *et al.*, 2013).

1.9.3 Métodos moleculares para a detecção dos vírus dengue

Diversos protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) têm sido utilizados no diagnóstico das infecções por dengue, uma vez que detecta e caracteriza a presença do vírus, identificando o sorotipo infectante, sendo importantes para a clínica e para vigilância virológica (Morita *et al.*, 1991; Lanciotti *et al.*, 1992, Harris *et al.*, 1998). O protocolo por Lanciotti *et al.* (1992) é o mais utilizado, sugerido pela Organização Pan-Americana de Saúde. Este é realizado em duas etapas, a primeira etapa ocorre uma amplificação inicial, utilizando primers de regiões conservadas das proteínas C e prM do genoma viral, numa segunda etapa (semi-nested) ocorre a identificação dos vírus, com iniciadores específicos para cada sorotipo.

O método de RT-PCR em tempo real utiliza iniciadores e sondas específicos para cada sorotipo de dengue, ou específicos para uma região conservada entre todos os sorotipos (Drosten *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005). O uso da fluorescência na sonda permite a detecção dos produtos da amplificação, conforme eles são amplificados, ou seja, em tempo real, sem a necessidade da eletroforese

(Holland *et al.*, 1991), permitindo também a quantificação viral (Guzman *et al.*, 2011), com maior rapidez, maior sensibilidade e menor risco de contaminação (Mackay *et al.*, 2002).

1.10 Vacinas

Em consequência das dificuldades encontradas na implementação de programas de controle do mosquito vetor, juntamente com o número crescente de casos de dengue no mundo, o desenvolvimento de uma vacina tornou-se uma das grandes prioridades da OMS. Existem atualmente várias vacinas candidatas em fase clínica e pré-clínica de desenvolvimento (Del Angel *et al.*, 2013).

1.10.1 Vacinas atenuadas

Vacinas atenuadas podem induzir resposta humoral duradoura, contudo a replicação viral deve ser discreta para que não haja desenvolvimento da doença. Vírus podem ser atenuados através de passagens seriadas em cultura de células ou ainda através de deleções no genoma, para que a replicação destes torne-se menos eficiente, sem que haja comprometimento em sua capacidade de indução de uma resposta humoral (Del Angel *et al.*, 2013).

A vacina atenuada desenvolvida pelo Instituto de Pesquisas do Exército Walter Reed dos Estados Unidos juntamente com a GlaxoSmithKline (GSK) foi testada em voluntários adultos e em crianças. Os recipientes da vacina não apresentaram sinais clínicos graves da doença e a soroconversão entre os voluntários foi de moderada a alta (Elderman *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2009).

A vacina em fase de desenvolvimento mais avançada é a ChimeriVax, uma vacina quimérica produzida pelo laboratório Sanofi. Esta candidata à vacina é baseada no vírus atenuado da vacina contra a febre amarela (cepa vacinal 17D). Genes M e E do envelope dos quatro sorotipos de DENV são substituídos no genoma do vetor atenuado. Resultados da primeira fase de testes clínicos foram promissores. A segunda fase de testes clínicos mostra que muito embora a vacina reduza a incidência de dengue causada pelos sorotipos 1, 3 e 4 em 90%, o mesmo não aconteceu com o sorotipo 2, que apresentou uma eficácia de apenas 9,2%. A

vacina encontra-se atualmente na fase 3 dos estudos clínicos (Thomas, 2011; Sabchareon *et al*, 2012).

Outra vacina quimérica tetravalente, a DENvax (Inviragen Inc.), utiliza DENV-2 atenuado (Kanasa-Thanan *et al*, 2003) como vetor e a partícula quimérica apresenta glicoproteínas dos quatro sorotipos de DENV em seu envelope. Esta vacina se encontra na primeira fase de testes clínicos (Thomas *et al*, 2011; Del Angel *et al*, 2013).

As vacinas quiméricas DENV-1/DENV-4 e DENV-2/DENV-4 desenvolvidas pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos já foram testadas em PNH. Resultados mostraram que ambas as candidatas induziram a produção de AN e conferiram proteção aos primatas quando estes foram desafiados pelo sorotipo 1 ou 2. Resultados semelhantes foram obtidos quando os animais foram inoculados com uma combinação das duas quimeras em concentrações iguais. Uma formulação tetravalente desta vacina (TetraVax-DV) encontra-se na primeira fase de testes clínicos e cerca de 90% de soropositividade para todos os sorotipos com exceção do sorotipo 2 foi observado entre os voluntários vacinados (Bray *et al*, 1996; Del Angel *et al*, 2013).

A vacina candidata DIME, desenvolvida pelo Centro Naval de Pesquisas Médicas dos Estados Unidos, finalizou a primeira fase de testes clínicos. Trata-se de uma vacina monovalente de DNA constituída por um plasmídeo que expressa os genes pr-M e E do DENV-1. Em testes clínicos voluntários receberam 3 doses altas ou baixas da vacina (meses 0, 3 e 5) (Sun *et al*, 2009; Thomas *et al*, 2011).

1.10.2 Vacinas inativadas e de subunidades

Vacinas inativadas utilizam o patógeno morto por processos químicos ou físicos em sua formulação e vacinas de subunidades são produzidas a partir de fragmentos do patógeno capazes de induzir resposta imunológica. A vantagem de ambas as vacinas é a ausência da multiplicação do patógeno no organismo sem o comprometimento de suas características imunogênicas.

O Instituto de Pesquisas do Exército Walter Reed (Estados Unidos) juntamente com a GSK desenvolveu uma vacina a partir do DENV-2 inativado em formalina. Testes da formulação da vacina monovalente em macacos rhesus mostraram imunogenicidade e proteção moderada contra cepas selvagens dos DENV e a associação a adjuvantes melhoraram o desempenho da vacina. A

primeira fase de testes clínicos desta candidata se encontra em planejamento (Putnak *et al*, 2005; Thomas *et al*, 2011).

Uma vacina produzida a partir de subunidades de proteína E foi desenvolvida pela Hawaii Biotech. Uma formulação tetravalente da vacina candidata inoculada em PNH foi capaz de induzir produção de AN contra os quatro sorotipos de DENV, e conferiu proteção contra os DENV-2 e DENV-4 (Putnak *et al*, 2005).

Os profissionais envolvidos no desenvolvimento de uma vacina enfrentam numerosos desafios, como a existência de quatro sorotipos antígenicamente distintos e a existência de algumas lacunas sobre a imunopatogênese. Felizmente, existem candidatas promissoras à vacina em diferentes fases de desenvolvimento clínico e pré-clínico (Thomas *et al.*, 2011).

1.11 Justificativa

O DENV-2 foi introduzido no estado do RJ em 1990 quando foram registrados os primeiros casos de FHD/SCD e um aumento no número de hospitalizações. Após sete anos sem atividade, este sorotipo re-emergiu em 2007 e causou a epidemia mais grave no país no ano de 2008. Estudos filogenéticos demonstraram que, apesar dos DENV-2 ainda pertencerem ao genótipo asiático circulante anteriormente, estes se agruparam formando uma linhagem distinta (Oliveira *et al.*, 2010, Faria *et al.*, 2013).

O DENV-2 tem sido o sorotipo tradicionalmente mais estudado devido à sua associação com grandes epidemias e manifestações clínicas mais graves e, frequentemente, com casos de FHD/SCD. Porém, ainda não estão bem definidos os fatores que determinam porque certos indivíduos apresentam dengue e outros dengue grave. Estudos de quantificação dos DENV realizados por Vaughn *et al.* (2000) e Araújo *et al.* (2009) evidenciaram uma correlação entre alta viremia e gravidade da doença. Recentemente, Nunes (2012) demonstrou que a viremia da Linhagem II de DENV-2 foi mais elevada do que a da Linhagem I em pacientes infectados, além de uma maior viremia ter sido observada em casos graves daquela Linhagem.

O estabelecimento de modelos animais para estudos das infecções pelos DENV é de grande relevância para a pesquisa sobre patogênese, imunidade, desenvolvimento de fármacos, desenho e teste de vacinas. Contudo, o estabelecimento destes modelos tem sido um desafio, uma vez que os vírus

epidêmicos circulantes não infectam naturalmente espécies não-humanas.

Estudos prévios demonstram que camundongos BALB/c imunocompetentes, quando infectados experimentalmente com DENV não neuroadaptado pelas vias IV ou intraperitoneal, (IP), apresentam infecção (Barreto *et al.*, 2004, 2007; Barth *et al.*, 2006 *et al.*; Paes *et al.*, 2005, 2009). Sinais clínicos bem como alterações teciduais similares aos observados em casos humanos infectados pelos DENV foram observados. Neste Projeto visamos realizar infecções experimentais de camundongos BALB/c com cepas representantes das duas Linhagens de DENV-2 isolados de casos humanos, não neuroadaptadas e avaliar a viremia e as alterações morfológicas em diferentes órgãos e a viremia resultantes destas infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Analisar a viremia e as alterações morfológicas em diferentes órgãos de camundongos BALB/c resultantes da infecção de duas Linhagens de DENV-2 epidêmicas e não neuroadaptadas

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a suscetibilidade do camundongo BALB/c à infecção pelas duas Linhagens de DENV-2;
- ✓ Determinar a carga viral das duas Linhagens de DENV-2 em tecidos e soros dos camundongos infectados.
- ✓ Analisar as alterações morfológicas em tecidos de camundongos BALB/c infectados pelas duas Linhagens de DENV-2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética Para Utilização de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (CEUA Fiocruz, protocolo: LW-50/11) e ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fiocruz (CEP Fiocruz, protocolo: 247/05), e aprovados.

3.2 Cepas de DENV-2

As cepas, BR/RJ66985/2000 e BR/RJ0337/2008, representativas das Linhagens I e II de DENV-2 foram isoladas a partir de amostras de soro de pacientes no Laboratório de Flavivírus, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz. A cepa BR/RJ66985/2000 (número de acesso GenBank #HQ012518), representante da Linhagem I, foi isolada no ano de 2000 de um paciente do sexo masculino de 39 anos com quadro de DC. A cepa BR/RJ0337/2008 (#HQ01253), representante da Linhagem II, foi isolada no ano de 2008 de um recém nascido que apresentava altos títulos de anticorpos anti-dengue, também com DC. Para a produção do estoque viral, as cepas foram inoculadas em garrafas de 175cm² contendo células de mosquito *Ae. albopictus* a uma concentração de 5×10^5 células/mL. A titulação foi calculada pelo método de Reed & Muench (1938). Ao final de 3 passagens e 7 passagens, respectivamente, as cepas representantes das Linhagens I e II apresentavam títulos de $10^{6,6}$ TCID₅₀/mL e 10^9 TCID₅₀/mL. Após as passagens o sorotipo infectante foi confirmado pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpo monoclonal específico para DENV-2 (Gubler *et al.*, 1984)

3.3 Camundongos BALB/c

Para as infecções experimentais foram utilizados camundongos BALB/c machos de 2 meses de idade, pesando entre 20 e 25 gramas, obtidos através do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz. Durante os

experimentos, os camundongos foram mantidos no Biotério do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira do IOC, Fiocruz onde temperatura (~20°C), fotoperíodo (12h/12h), alimentação e hidratação foram rigorosamente controlados.

3.4 Extração do genoma viral

Para a extração do genoma viral, coração, fígado, pulmão, cérebro e baço foram macerados em 500 µL de meio de cultura Leibovitz L-15 (Sigma, Alemanha) complementados com penicilina-streptomicina a 2% e fungizona a 1% (Invitrogen, EUA) e centrifugados por 15 minutos a 10.000 RPM a uma temperatura de 4^o C. O RNA foi extraído de 140 µL do sobrenadante dos órgãos macerados e amostras de soro utilizando-se o kit QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5 RT-PCR em Tempo Real

Para quantificação do genoma viral, a curva padrão foi construída a partir de uma diluição seriada de RNA extraído de uma amostra de DENV-2 (cepa S16083), de título conhecido ($8,7 \times 10^6$ PFU/mL), gentilmente cedida por Biomanguinhos. O protocolo utilizado foi o descrito por Johnson *et al.* (2005), utilizando-se os primers DENJ2-R (5'-CCATCTGCAGCAACACCATCTC-3') e DENJ2-F (5'-CAGGTTATGGCACTGTACGAT-3'), desenhados a partir de um fragmento da região 3' não codificante, e a sonda DENJ2-P (CY5 5'-CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA-3' BHQ-1).

A reação foi realizada conforme indicação do fabricante, com concentrações ideais dos iniciadores e sonda determinadas por ensaios de otimização. Numa microplaca óptica (PE Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de 96 micropoços, primeiramente, foram adicionados 20µl da mistura, contendo os iniciadores, sonda, água e o kit SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR (Invitrogen, EUA) em cada poço. Logo após, foram acrescentados 5µl do RNA extraído, obtendo assim um volume final de 25µl/reação. Cada amostra e controles foram aplicados em duplicatas. As placas foram colocadas na plataforma LineGene 9660 (Bioer,

China), para a reação de qRT-PCR em tempo real, seguindo os parâmetros de ciclagem disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros de termociclagem.

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Transcrição reversa	50 ⁰ C	15 minutos	1 ciclo
Ativação da enzima	95 ⁰ C	2 minutos	1 ciclo
Desnaturação	95 ⁰ C	15 segundos	40 ciclos
Anelamento/Extensão	60 ⁰ C	1 minuto	40 ciclos

*protocolo descrito por Johnson *et al.*, 2005.

3.6 Processamento das amostras para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET)

O protocolo utilizado para processamento dos órgãos pelas técnicas padrão de microscopia eletrônica foi descrito por Barreto *et al.* (2008). Resumidamente, os tecidos coletados foram fixados, por imersão, em glutaraldeído 2% diluído em tampão cacodilato de sódio (0,2M, pH 7,2). As amostras foram cortadas em fragmentos de cerca de 1mm³, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e gradualmente desidratadas em banhos crescentes de acetona (10%, 15%, 30%, 50%, 70% em acetato de uranila, 90% e 100% em sulfato de cobre). Após a desidratação, as amostras foram incluídas em resina epoxi (Electron Microscopy Sciences) e secções ultrafinas (50-70 nm) foram obtidas com auxílio de uma navalha de diamante adaptada a um ultramicrótomo (Reichert-Jung). Posteriormente, as secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila 2% em etanol 50% e citrato de chumbo (Reynolds *et al.*, 1963) e observadas ao MET Zeiss EM-900.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi feita através do Teste-T e qui-quadrado. O software utilizado foi o SPSS 20^o versão. Resultados de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 Desenho experimental

Para a infecção com a Linhagem I do DENV-2, cinco camundongos foram inoculados pela via IV e cinco, pela via IP. O mesmo procedimento foi feito para a infecção com a Linhagem II do DENV-2. O volume do inóculo foi 100 μ L e a concentração viral foi 10.000 TCID₅₀/0,1mL. Após 72 horas de infecção os camundongos foram anestesiados com tiopental e o sangue foi coletado através de punção cardíaca. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical. Sangue e parte dos órgãos coletados foram acondicionados em freezer a -70^oC para posterior extração de RNA. Outra parte dos órgãos foi fixada e processada para análises em microscopia eletrônica de transmissão de acordo com o protocolo descrito por Barreto *et al.* (2010). Os experimentos foram realizados em duplicata e camundongos não infectados foram eutanasiados no mesmo dia que os infectados e utilizados como controles negativos (Figura 5).

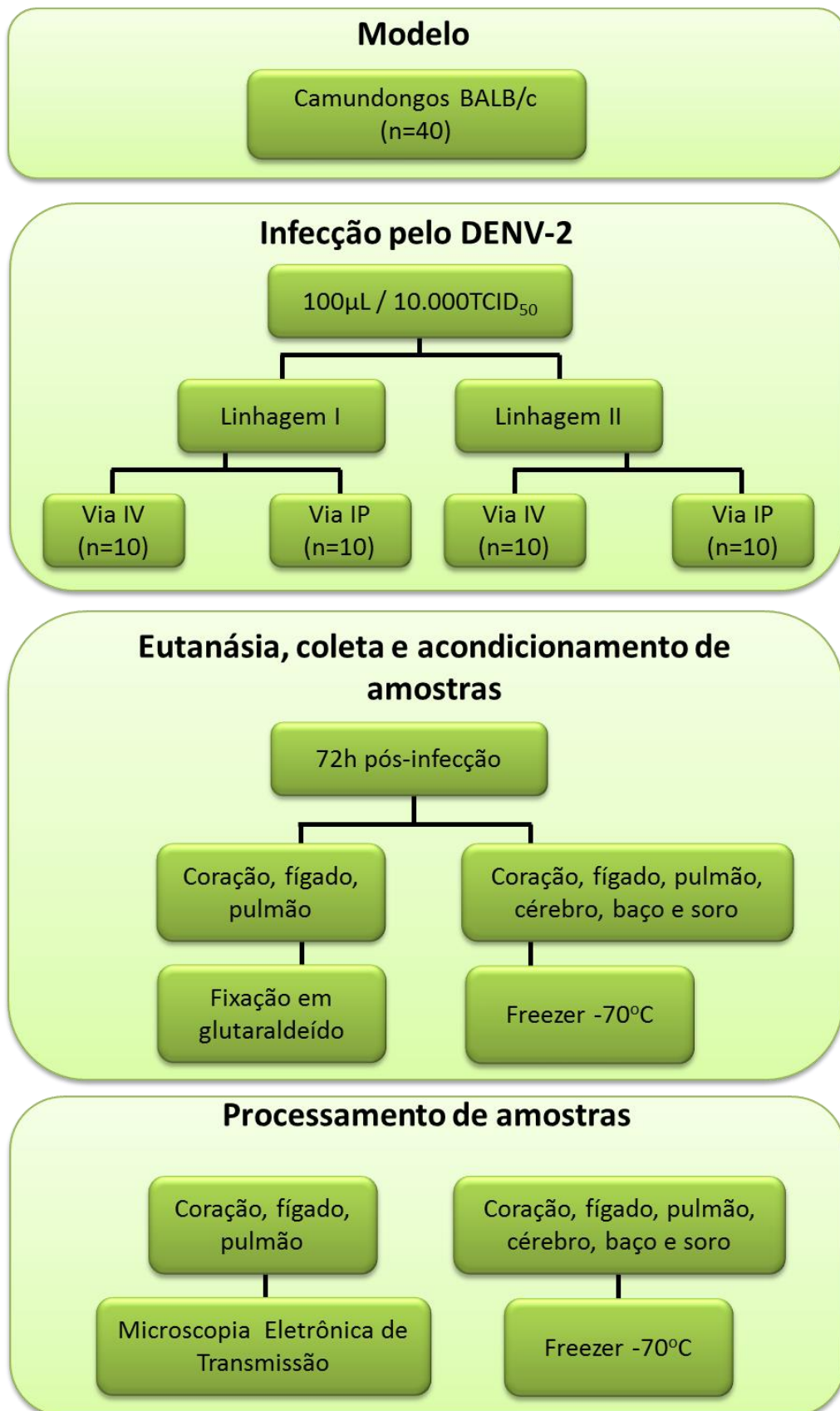


Figura 5: Fluxograma do desenho experimental para as infecções de camundongos BALB/c com duas Linhagens de DENV-2. IV: inoculação intravenosa, IP: inoculação intraperitoneal.

4 RESULTADOS

Durante a realização da etapa de experimentação animal, nenhum camundongo veio a óbito e todos os animais foram eutanasiados. Sinais neurológicos como paralisia ou cegueira e sinais clínicos como petéquias, tremores ou perda de peso não foram observados durante o período entre a infecção pelas duas Linhagens de DENV-2 e a eutanásia.

Os resultados serão apresentados com os dados dos experimentos realizados em duplicata.

4.1 Análise da suscetibilidade do camundongo BALB/c à infecção de duas Linhagens de DENV-2 pela detecção de genoma viral em órgãos e soro

Independente da Linhagem utilizada, foi observado que os camundongos BALB/c foram suscetíveis às cepas de DENV-2 epidêmicas, não-neuroadaptadas utilizadas neste estudo. A linhagem I induziu, em média, cargas virais mais elevadas em todos os órgãos e soro testados. Em uma análise total, ficou demonstrado que os órgãos dos animais infectados com a Linhagem I, independente da via de inoculação utilizada, apresentaram uma tendência a maior positividade viral no coração (40%), cérebro (40%) e baço (35%), quando comparados aos animais infectados com a Linhagem II considerando a detecção de RNA viral em diferentes órgãos. No entanto, somente em amostras de soro observou-se diferença significativa entre o número de amostras positivas para o genoma viral ($p=0,035$) (Tabela 3).

Dentre os órgãos de camundongos infectados com as diferentes Linhagens de DENV-2 pela via IV, foi possível observar um maior número de resultados positivos em coração de camundongos infectados tanto pela Linhagem I quanto daqueles infectados pela Linhagem II (5/10, em ambos os casos). Dentre todos os órgãos testados (coração, fígado, pulmão, cérebro e baço), pelo menos uma das amostras foi positiva quanto à detecção do genoma viral. Nas amostras de soro, só foi possível detectar o genoma viral em 3 amostras de camundongos infectados pela Linhagem I (Tabela 3).

Quando os camundongos foram infectados pela via IP observou-se uma maior positividade viral no baço (60%) e cérebro (50%) dos animais infectados pela Linhagem I. O fígado e o coração também apresentaram uma maior positividade viral

quando os camundongos foram infectados por esta Linhagem quando comparados àqueles infectados pela Linhagem II, por esta mesma via. Independente da Linhagem utilizada para infecção, nenhuma amostra de soro foi positiva quando os camundongos foram infectados por ambas a Linhagens por esta via.

O genoma do DENV-2, de ambas as Linhagens não foi detectado em amostras de tecido ou soro de camundongos não infectados utilizados como controles negativos.

Tabela 3: Detecção de diferentes linhagens de DENV-2 por RT-PCR em Tempo Real em órgãos e soro de camundongos BALB/c inoculados pelas vias intravenosa e intraperitoneal.

Órgãos	DENV-2					
	Linhagem I (66985/2000)			Linhagem II (0337/2008)		
	Via de Inoculação (Positivo/Testado*)		Total Positivo/ Testado (%)	Via de Inoculação (Positivo/Testado)		Total Positivo/ Testado (%)
	Intravenosa (n=10)	Intraperitoneal (n=10)		Intravenosa (n=10)	Intraperitoneal (n=10)	
Coração	5/10 (50%)	3/10 (30%)	8/20 (40)	5/10 (50%)	2/10 (20%)	7/20 (35)
Fígado	1/10 (10%)	4/10 (40%)	5/20 (25)	3/10 (30%)	1/10 (10%)	4/20 (20)
Pulmão	3/10 (30%)	0/10 (0%)	3/20 (15)	1/10 (10%)	2/10 (20%)	3/20 (15)
Cérebro	3/10 (30%)	5/10 (50%)	8/20 (40)	3/10 (30%)	2/10 (20%)	5/20 (25)
Baço	1/10 (10%)	6/10 (60%)	7/20 (35)	3/10 (30%)	1/10 (10%)	4/20 (20)
Soro	3/10 (30%)	0/10	3/20 (15)	1/10 (10%)	0/10	1/20 (5)

* Considerando-se a experimentação em duplicata. 72hs pós-infecção.

4.2 Determinação da carga viral das duas Linhagens de DENV-2 em órgãos e soros dos camundongos infectados por RT-PCR em Tempo Real

A Linhagem I, em média, induziu cargas virais mais elevadas em todos os órgãos e soros testados. Independente da via de inoculação e do órgão analisado, foi demonstrado que os maiores títulos virais foram observados em amostras teciduais de camundongos infectados pela Linhagem I (Figura 6).

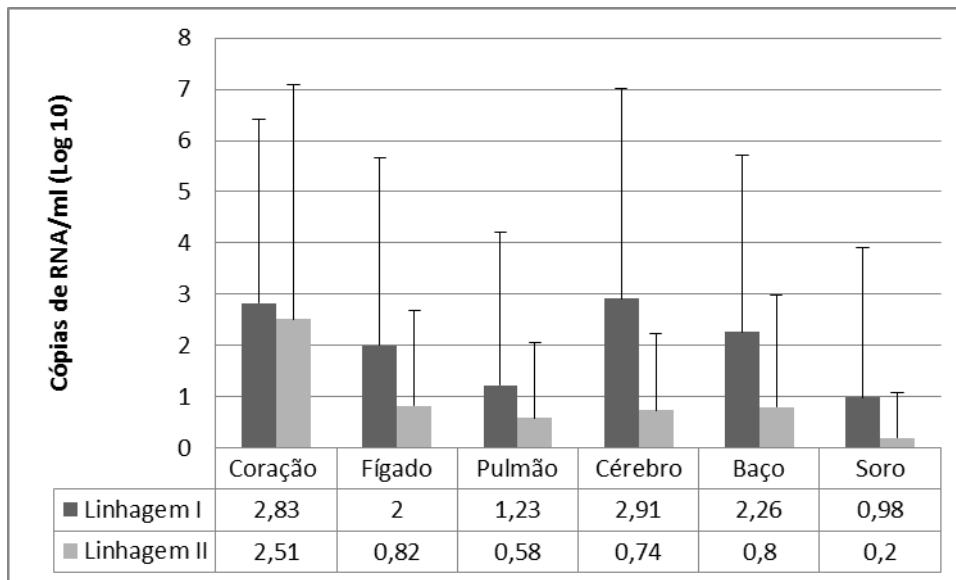


Figura 6: Quantificação do genoma viral em órgãos de camundongos BALB/c infectados por duas Linhagens de DENV-2, independente da via de inoculação realizada. Médias de cópias de RNA estão indicadas na legenda.

4.2.1 Análise da carga viral das Linhagens I ou II de DENV-2 em camundongos infectados pela via intravenosa

Comparando as médias das cargas virais detectadas nos órgãos testados, foi observado que a média de títulos induzidos pela Linhagem I foram mais altos em amostras de soro, pulmão e cérebro. Já as médias dos títulos observados em amostras de coração, fígado e baço foram mais elevadas quando a infecção foi induzida pela Linhagem II (Figura 7).

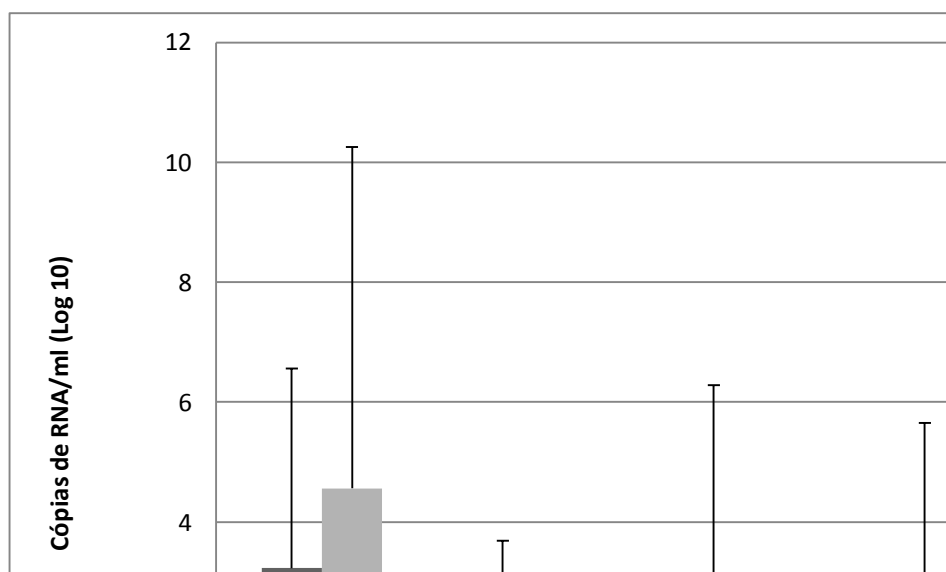


Figura 7: Quantificação do genoma viral em diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados por duas Linhagens de DENV-2 pela via intravenosa. Médias de cópias de RNA estão indicadas na legenda.

O genoma viral foi encontrado em oito camundongos infectados pela Linhagem I. Dentre os órgãos de camundongos infectados pela via IV, observamos o maior título em uma amostra de soro quando os animais foram desafiados pela Linhagem I. Todos os órgãos do animal cuja amostra de soro apresentou o título mais elevado foram testados positivos com exceção do baço, demonstrando que houve disseminação do vírus (Tabela 4).

Tabela 4: Determinação da carga viral da Linhagem I de DENV-2 em órgãos e soro de camundongos BALB/c inoculados pela via intravenosa.

Linhagem I de DENV-2 / Via intravenosa						
Órgãos	Coração	Fígado	Pulmão	Cérebro	Baço	Soro
Camundongos*	Títulos Virais (cópias/mL)					
1	ND	ND	$3,47 \times 10^6$	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	$1,20 \times 10^3$
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	$7,92 \times 10^8$	$1,34 \times 10^8$	$1,98 \times 10^8$	ND
6	$1,28 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	ND
7	$3,11 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	ND
8	$8,63 \times 10^7$	ND	ND	ND	ND	$3,96 \times 10^3$
9	$3,63 \times 10^7$	ND	ND	$6,06 \times 10^4$	ND	ND
10	$1,94 \times 10^6$	$1,72 \times 10^9$	$1,72 \times 10^9$	$8,67 \times 10^8$	ND	$1,0 \times 10^{13}$

ND = não detectado; * Considerando-se a experimentação em duplicata. (n=10), 72hs pós-infecção.

Dentre camundongos desafiados com a Linhagem II, foi possível recuperar o genoma viral em nove. Os maiores títulos foram observados em amostras coração de dois camundongos. O maior número de órgãos testados positivos no mesmo animal foi três, em dois camundongos (Tabela 5).

Com relação à detecção do genoma viral, o número de amostras de soro e pulmão positivos foi maior entre amostras provenientes de camundongos infectados pela Linhagem I. Por outro lado, obtivemos maior número de amostras positivas de fígado e baço de camundongos infectados pela Linhagem II. A positividade viral em amostras de coração e cérebro foram iguais para as duas Linhagens de DENV-2 utilizadas.

Tabela 5: Determinação da carga viral da Linhagem II de DENV-2 em órgãos e soro de camundongos BALB/c inoculados pela via intravenosa

Linhagem II de DENV-2 / Via intravenosa						
Orgãos	Coração	Fígado	Pulmão	Cérebro	Baço	Soro
Camundongos*	Títulos Viral (cópias/mL)					
1	6,8x10 ³	ND	ND	3,13x10 ⁰	8,29x10 ⁻¹	ND
2	3,61x10 ⁶	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	1,17x10 ⁴
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	1,9x10 ³	3,07x10 ²	ND	1,66x10 ⁹	ND
6	ND	ND	ND	2,37x10 ⁵	ND	ND
7	1,73x10 ¹⁵	1,59x10 ⁵	ND	6,09x10 ²	ND	ND
8	4,62x10 ¹⁴	ND	ND	ND	ND	ND
9	2,39x10 ⁵	3,17x10 ¹	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	1,22x10 ³	ND

ND = não detectado; * Considerando-se a experimentação em duplicata. (n=10); 72hs pós-infecção.

4.2.2 Análise da carga viral das Linhagens I ou II de DENV-2 em camundongos infectados pela via intraperitoneal

Quando a via de inoculação utilizada foi a IP, o RNA viral foi identificado em oito camundongos infectados com a Linhagem I e em seis infectados pela Linhagem II. O genoma viral foi detectado em As médias dos títulos virais detectados em amostras de coração, fígado, cérebro e baço de camundongos infectados pela Linhagem I e em pulmão de camundongos infectados pela Linhagem II foram as mais elevadas, e os títulos observados para o baço (p=0,026) foram significativos. As amostras positivas infectadas com a Linhagem II só superaram em número os resultados positivos de amostras infectadas pela Linhagem I quando o tecido testado foi o pulmão (Figura 8).

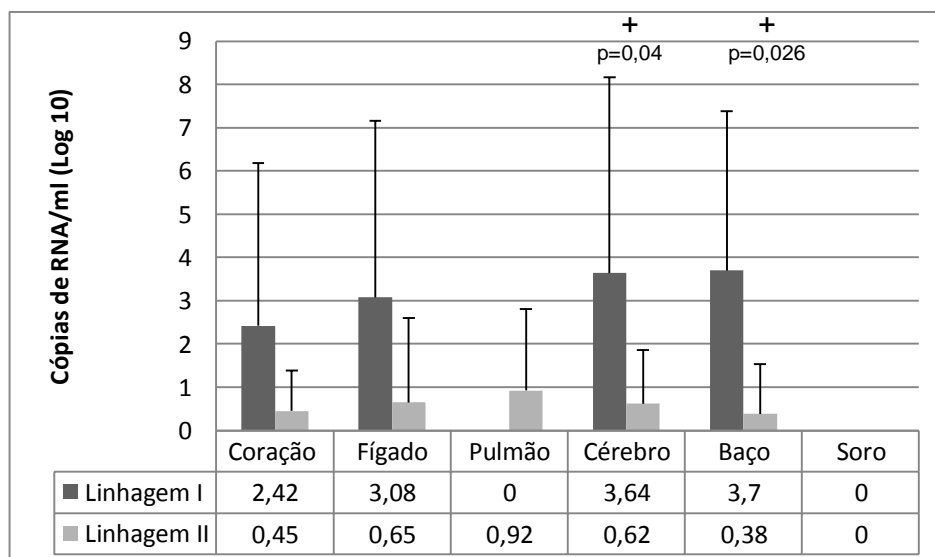


Figura 8: Quantificação do genoma viral em diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados por duas Linhagens de DENV-2 pela via intraperitoneal. Médias de cópias de RNA estão indicadas na legenda. Estatisticamente significativo (+).

Em camundongos inoculados pela via IP, o título viral mais elevado foi observado em uma amostra de cérebro de um animal desafiado pela Linhagem I. Em dois camundongos infectados por esta mesma Linhagem, o RNA pôde ser detectado em três órgãos distintos. No entanto, em nenhuma amostra de soro houve a detecção do genoma viral (Tabela 6).

Tabela 6: Determinação da carga viral da Linhagem I de DENV-2 em tecidos e soro de camundongos BALB/c inoculados pela via intraperitoneal

Linhagem I de DENV-2 / Via intraperitoneal						
Órgãos	Coração	Fígado	Pulmão	Cérebro	Baço	Soro
Camundongos*	Títulos Virais (cópias/mL)					
1	ND	ND	ND	$1,34 \times 10^1$	$3,22 \times 10^1$	ND
2	$1,43 \times 10^6$	$2,61 \times 10^3$	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	$6,94 \times 10^8$	ND	ND	ND	$1,34 \times 10^8$	ND
6	ND	ND	ND	$7,68 \times 10^5$	$2,48 \times 10^3$	ND
7	ND	ND	ND	$5,0 \times 10^{12}$	$6,84 \times 10^7$	ND
8	$1,72 \times 10^9$	$1,72 \times 10^9$	ND	$9,73 \times 10^8$	ND	ND
9	ND	$1,73 \times 10^9$	ND	$5,53 \times 10^7$	$2,02 \times 10^7$	ND
10	ND	$8,76 \times 10^8$	ND	ND	$7,38 \times 10^8$	ND

ND = não detectado; * Considerando-se a experimentação em duplicata. (n=10), 72hs pós-infecção.

Com relação aos camundongos infectados com a Linhagem II, todos os órgãos testados positivos apresentaram títulos menores que aquele usado para a inoculação (Tabela 7).

Tabela 7: Determinação da carga viral da Linhagem II de DENV-2 em órgãos e soro de camundongos BALB/c inoculados pela via intraperitoneal

Linhagem II de DENV-2 / Via intraperitoneal						
Órgãos	Coração	Fígado	Pulmão	Cérebro	Baço	Soro
Camundongos*	Títulos Virais (cópias/mL)					
1	ND	ND	$2,8 \times 10^5$	ND	ND	ND
2	$7,49 \times 10^2$	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	$1,01 \times 10^3$	$7,28 \times 10^3$	ND
5	ND	ND	$6,06 \times 10^3$	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	$4,59 \times 10^1$	$3,35 \times 10^6$	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	$1,61 \times 10^3$	ND	ND

ND = não detectado; * Considerando-se a experimentação em duplicata. (n=10), 72hs pós-infecção.

Em resumo, ao analisarmos os resultados sem levar em consideração a via de inoculação utilizada, a Linhagem I foi mais eficiente, produzindo, em média, cargas virais mais elevadas que a Linhagem II. Além do mais, um maior número de amostras infectadas pela Linhagem I apresentou carga viral superior ao título do inóculo utilizado para a infecção experimental sugerindo que houve replicação viral.

Com relação a via de inoculação, ficou demonstrado que independente da Linhagem utilizada para a infecção, uma maior positividade foi observada em amostras de camundongos infectados pela via intravenosa: trinta e duas amostras positivas num total de 120 amostras testadas. Em camundongos infectados pela via intraperitoneal, observamos 26 amostras positivas em um total de 120 amostras testadas.

4.3 Análise ultraestrutural em órgãos de camundongos BALB/c infectados pelas duas Linhagens de DENV-2 pelas via IV e IP.

As alterações morfológicas encontradas em órgãos de camundongos infectados não foram observadas naqueles de camundongos utilizados como controles negativos.

Os dados acerca das análises morfológicas dos órgãos dos camundongos infectados experimentalmente com as Linhagens de DENV-2 serão de animais representativos de cada grupo experimental realizado originalmente em duplicata.

4.3.1 Análise ultraestrutural de coração de camundongos BALB/c infectados com as Linhagens de DENV-2

Análises morfológicas de coração de camundongos infectados experimentalmente com a Linhagem I de DENV-2 pelas vias IP ou IV demonstraram alterações pontuais havendo áreas teciduais totalmente preservadas (Figura 9). As principais alterações observadas foram: presença (Figura 10a e 10b) e células inflamatórias mononucleadas no interstício e plaquetas no interior de capilares (Figura 10b), acúmulo de líquido nos capilares (Figura 11a), sinais de ativação do endotélio caracterizada pelo espessamento do citoplasma de CE o que está associado ao grande número de vesículas elétron-lúcidas (vesículas de transporte); presença de prolongamentos de membrana plasmática foi notada nestas células (Figura 11b). PSDs foram observadas em citoplasma de CE (Figura 12a e 12b) e de cardiomiócitos adjacentes (Figuras 12b).

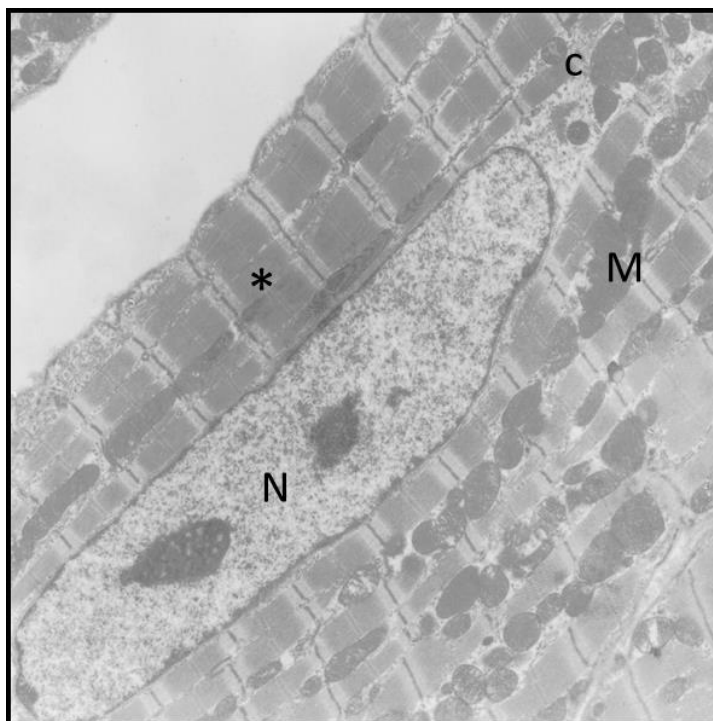


Figura 9: Corte ultrafino de coração mostrando área tecidual sem alterações. Micrografia de coração de camundongo BALB/c infectado pela via IP com a Linhagem I de DENV-2. Cardiomiócito (c), núcleo (N), fibras cardíacas (*), mitocôndrias (M). Barra = 1,8µm.

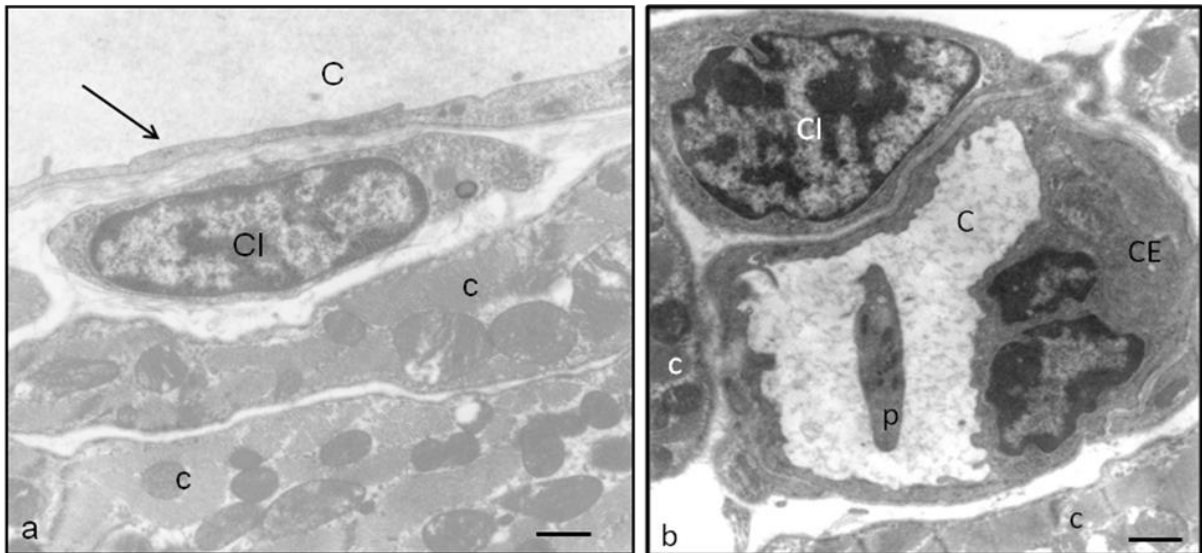


Figura 10: Células inflamatórias mononucleadas no interstício e plaqueta no capilar de coração. Micrografias de coração de camundongo BALB/c infectado pela via IP com a Linhagem I de DENV-2. **(a)** Célula inflamatória mononucleada (CI) no interstício. Capilar (C), endotélio (seta). Barra = 0,7 μ m. **(b)** Plaqueta (p) em capilar (C), célula inflamatória mononuclear no interstício (CI). Célula endotelial (CE), Barra = 1,2 μ m. Cardiomiócito (c).

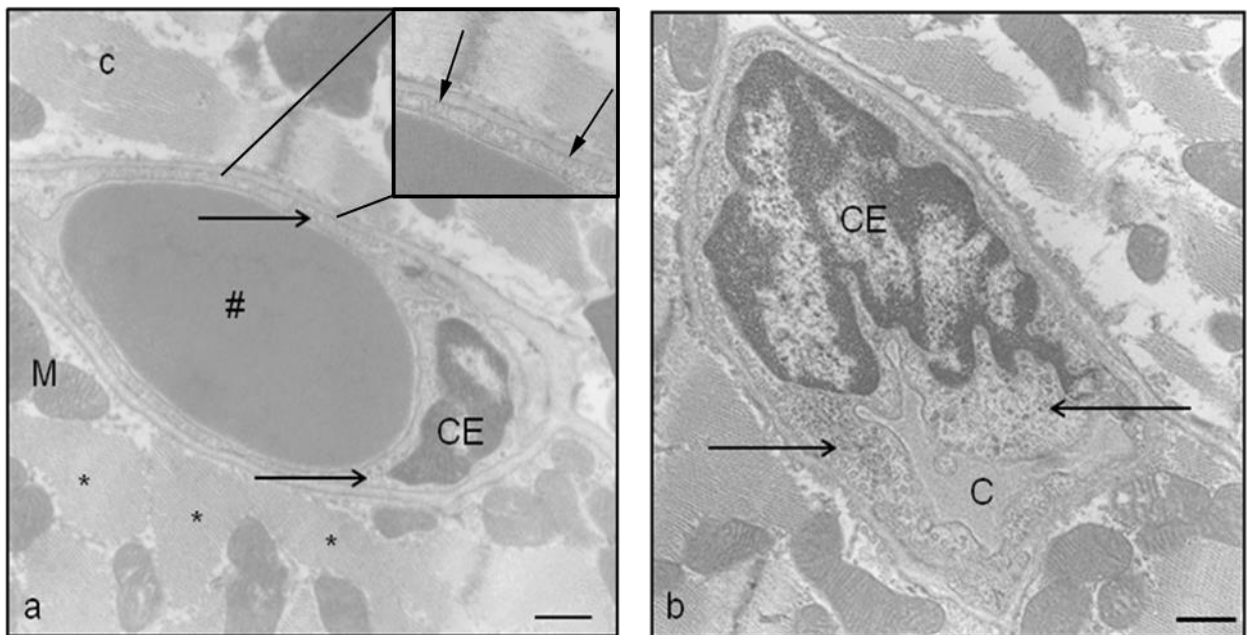


Figura 11: Capilar apresentando acúmulo de líquido e célula endotelial apresentando prolongamentos de membrana e citoplasma espessado. Micrografias de coração de camundongo BALB/c infectado pela via IP com a Linhagem I de DENV-2. **(a)** Acúmulo de líquido no capilar (#) e vesículas de transporte em citoplasma de célula endotelial (setas). Barra = 0,7 μ m. **(b)** Lúmen do capilar (C) reduzido, citoplasma da célula endotelial (CE) espessado devido à presença de vesículas de transporte (setas). Barra = 0,7 μ m.

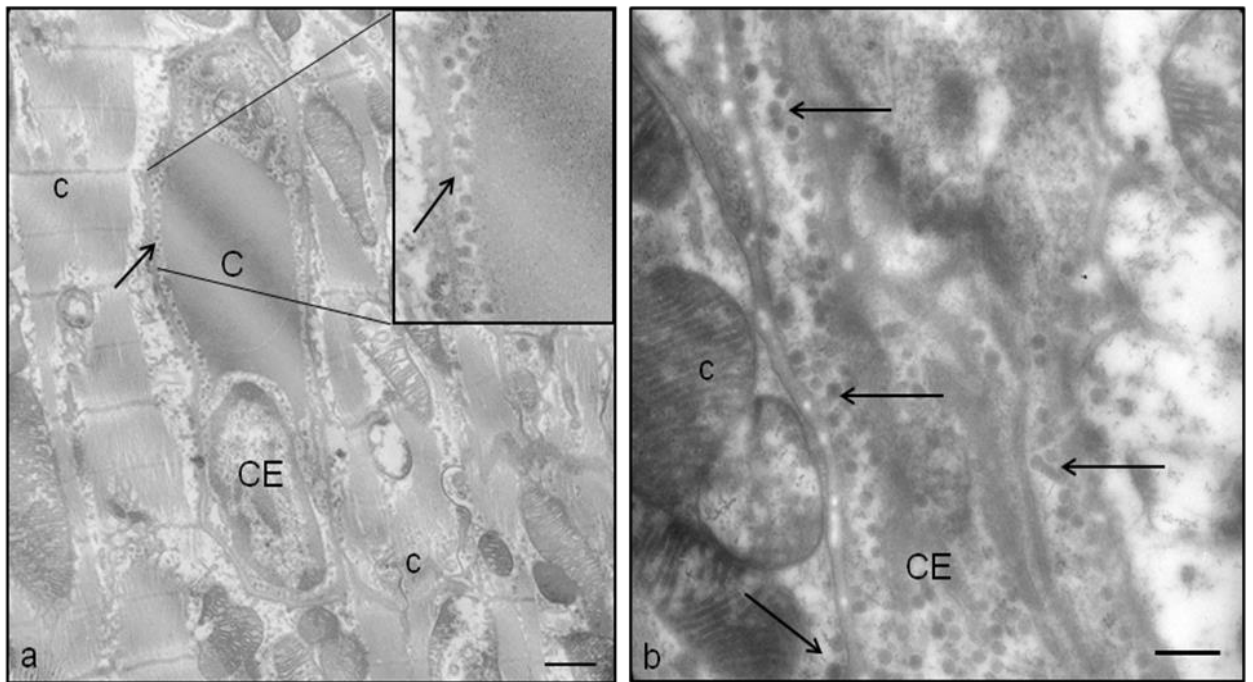


Figura 12: Partículas semelhantes aos vírus dengue em célula endotelial e cardiomiócitos. Micrografias de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem I de DENV-2. **(a)** Célula endotelial (CE) contendo partículas semelhantes ao DENV (setas) em seu citoplasma. Barra = 0,7 μ m. **(b)** Partículas semelhantes ao DENV (setas) no citoplasma de uma célula endotelial (CE). Barra = 0,1 μ m. Cardiomiócito (c), capilar (C).

Em cortes ultrafinos de coração de camundongos infectados experimentalmente com a Linhagem II de DENV-2 pelas vias IV ou IP, observaram-se plaquetas (Figura 13a) e células inflamatórias mononucleadas no capilar (Figuras 13b e 13c), células inflamatórias mononucleadas no interstício (Figuras 14a e 14b), acúmulo de líquido no capilar (Figura 14b), cardiomiócitos apresentando inclusões perinucleares (Figura 15), células endoteliais emitindo prolongamentos de membrana plasmática (Figura 13d), produzindo vesículas de transporte (Figura 13c) e contendo PSDs em seu citoplasma (Figuras 16a e 16b). As fibras cardíacas em sua maioria apresentaram-se sem qualquer alteração.

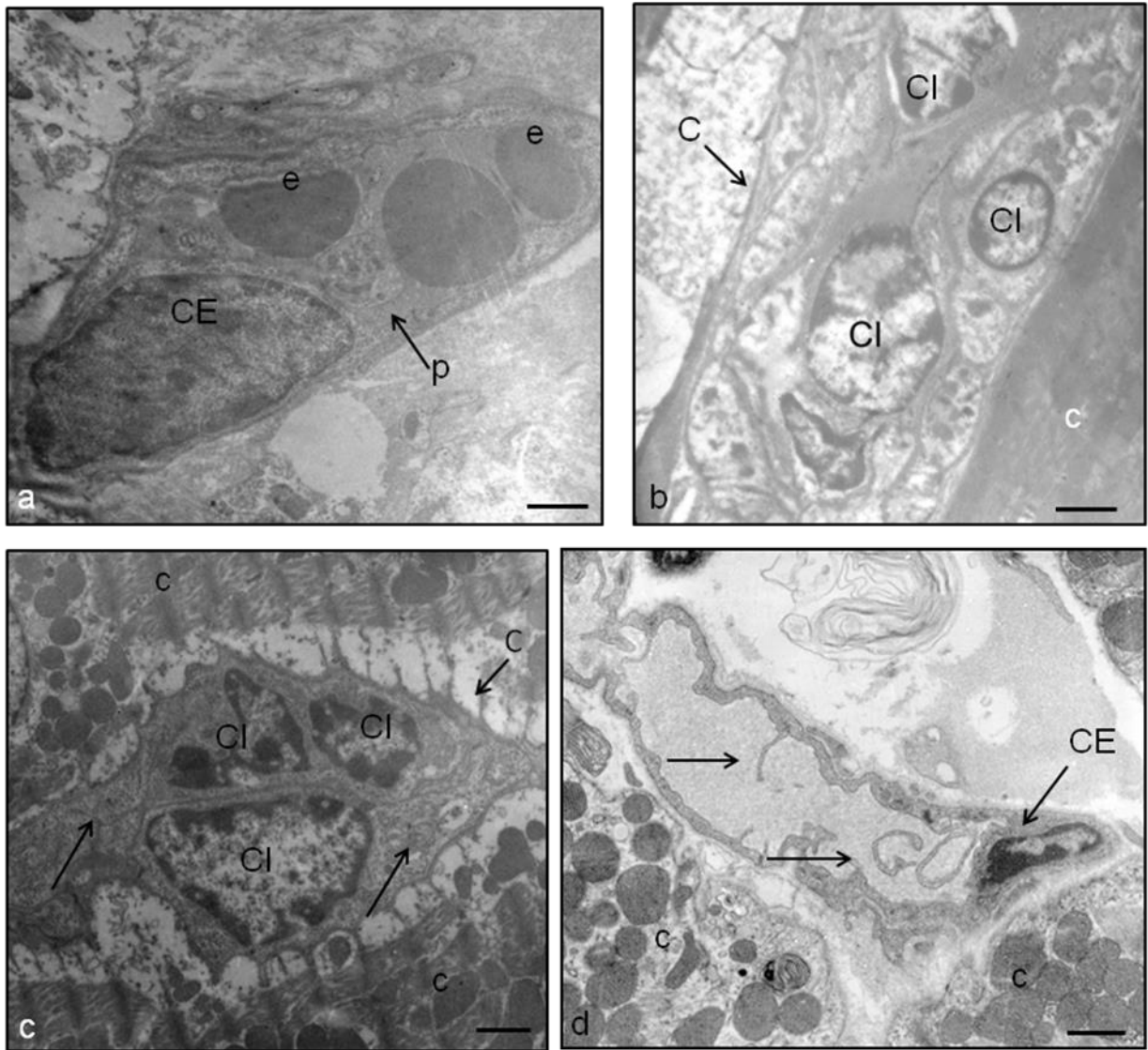


Figura 13: Plaquetas e células inflamatórias mononucleadas no capilar e células endoteliais apresentando vesículas de transporte e prolongamentos de membrana plasmática. Micrografias de coração de camundongos BALB/c infectados pelas vias IV (a,b,d) e IP (c) com a Linhagem II de DENV-2. **(a)** Plaqueta (p) no capilar. Barra = 0,9 μ m. **(b)** Células inflamatórias mononucleadas (CI) circulando no capilar (C). Barra = 2,2 μ m. **(c)** Células inflamatórias mononucleadas (CI) contidas no capilar (C) e citoplasma da célula endotelial (CE) espessado devido à presença de vesículas de transporte (setas). Barra = 0,7 μ m. **(d)** Célula endotelial (CE) emitindo prolongamentos de membrana (setas). Barra = 1,3 μ m. Cardiomiócito (c). Célula endotelial (CE), eritrócitos (e).

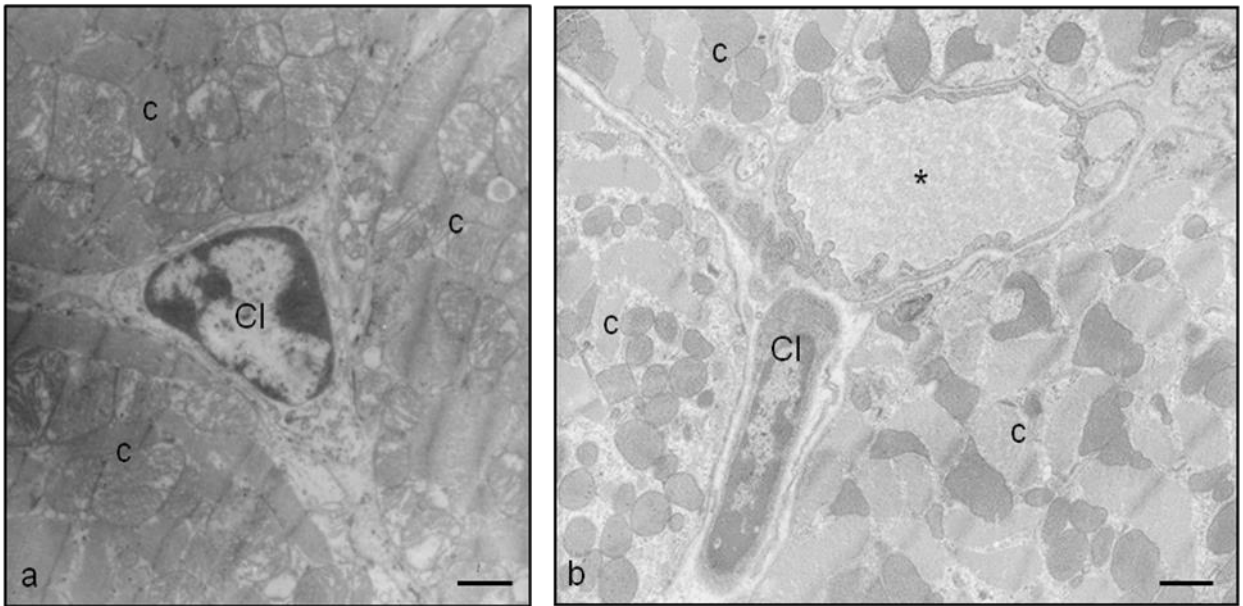


Figura 14: Células inflamatórias mononucleadas no interstício e acúmulo de líquido no capilar. (a) Micrografia de coração de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem II de DENV-2. Note célula inflamatória mononucleada (CI) no interstício. Barra = 1,7 μ m. **(b)** Micrografia de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem II de DENV-2. Célula inflamatória mononucleada (CI) no interstício acúmulo de líquido no capilar (E). Barra = 1,2 μ m. Cardiomiócito (c).

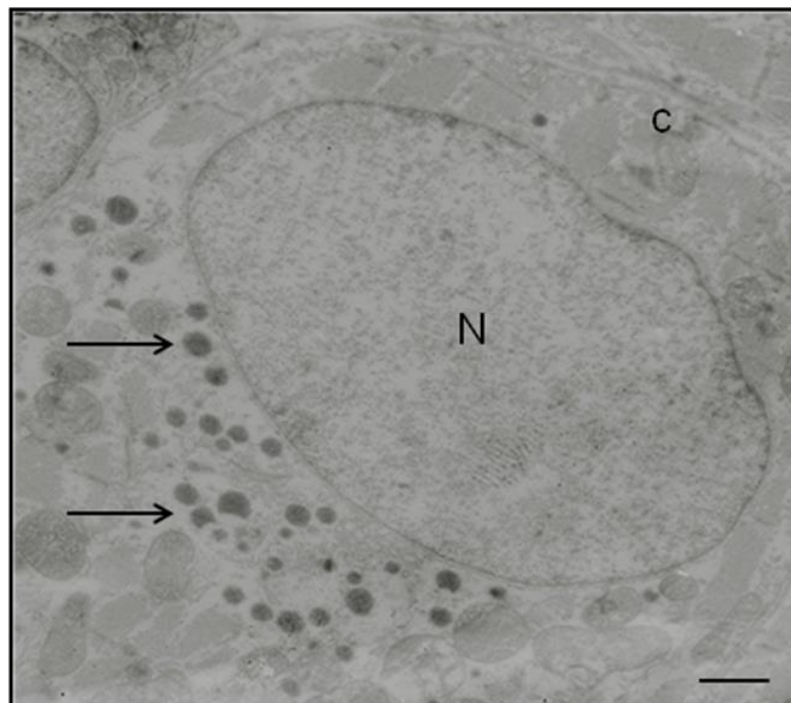


Figura 15: Inclusões perinucleares em cardiomiócitos. Micrografia de coração de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem II de DENV-2. Inclusões perinucleares (setas) em cardiomiócitos. Núcleo (N), cardiomiócito (c). Barra = 0.8 μ m.

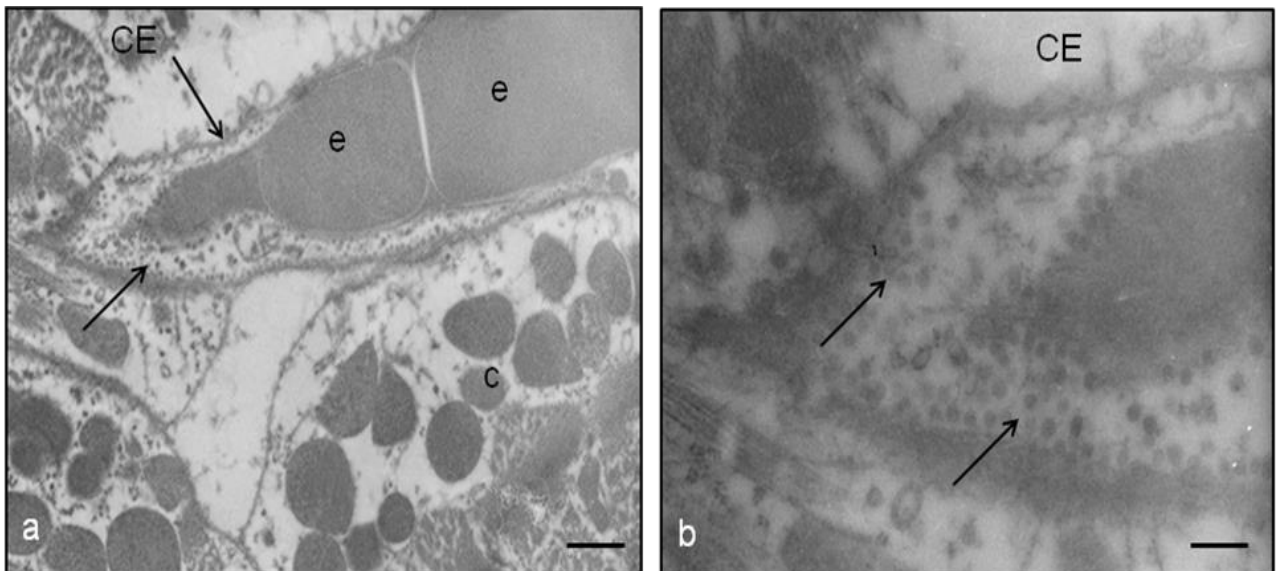


Figura 16: Partículas semelhantes aos vírus dengue em célula endotelial de coração. Micrografias de coração de camundongo BALB/c infectado pela via IP com a Linhagem II de DENV-2. Partículas semelhantes ao DENV (seta) no citoplasma da célula endotelial (CE). Eritrócito (e). **(a)** Barra = 1µm, **(b)** Barra = 0,3µm.

O Quadro 2 sumariza as alterações morfológicas observadas em coração de animais infectados com as linhagens I ou II de DENV-2 pelas vias IV ou IP.

Quadro 1: Alterações ultraestruturais observadas em coração de camundongos BALB/c infectados experimentalmente, em duplicata, pelas Linhagens I ou II de DENV-2.

DENV-2	Via de inoculação	Características ultraestruturais observadas
Linhagem I	Inoculação Intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Partículas semelhantes aos DENV no endotélio e em cardiomiócitos adjacentes. ✓ Vesículas de transporte e prolongamentos de membrana em célula endotelial
	Inoculação Intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Células inflamatórias mononucleadas no capilar e no interstício ✓ Fibras desorganizadas ✓ Plaquetas no capilar e no interstício ✓ Vesículas de transporte e prolongamentos de membrana em célula endotelial
Linhagem II	Inoculação Intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Células inflamatórias mononucleadas no capilar e no interstício ✓ Inclusões perinucleares em cardiomiócitos ✓ Plaquetas circulando no capilar e no interstício ✓ Vesículas de transporte e prolongamentos de membrana em célula endotelial
	Inoculação Intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias mononucleadas no capilar ✓ Partículas semelhantes a vírus no citoplasma de células endoteliais. ✓ Vesículas de transporte e prolongamentos de membrana em célula endotelial

4.3.2 Análise ultraestrutural de fígado de camundongos BALB/c infectados com as Linhagens de DENV-2

Em fígado de camundongos infectados experimentalmente com a Linhagem I de DENV-2 pelas vias IV ou IP, células inflamatórias polimorfonucleadas (Figura 17a) mononucleadas (Figura 17b e 17c) e plaquetas (Figura 17d) nos capilares, inclusões

eletrondensas na região perinuclear de células endotelial (Figura 17c), inclusões lipídicas e microesteatose em hepatócitos (Figuras 18),

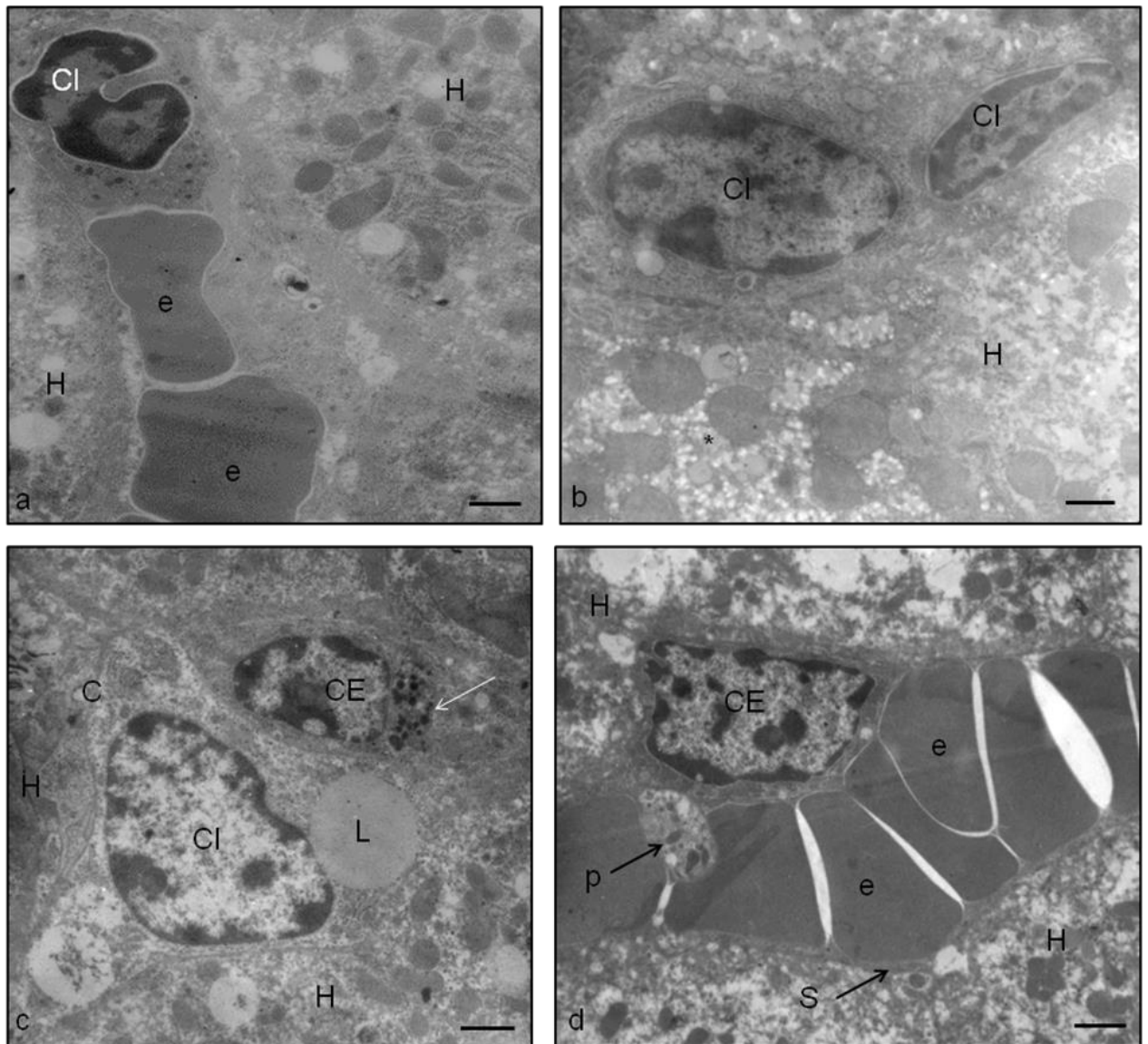


Figura17: Células inflamatórias e plaquetas em capilares sinusóides e inclusões eletrondensas na região perinuclear de célula endotelial. Micrografias de fígado de camundongos BALB/c infectados pelas vias IP (a, c, d) e IV (b) com a Linhagem I de DENV-2. (a) Célula inflamatória polimorfonucleada (CI) no lúmen de capilar sinusóide (S). Barra = 1,2µm. (b) Células inflamatórias mononucleares (CI) em capilar sinusóide. Barra = 0,8µm. (c) Célula inflamatória mononucleada (CI) no capilar (C) e inclusões eletrondensas (seta) na região perinuclear de uma célula endotelial (CE). Barra = 1,4µm. (d) Migração de uma plaqueta (P) do lúmen de capilar sinusóide (S) para o interstício. Barra = 1,1µm. Hepatócitos (H), eritrócitos (e).

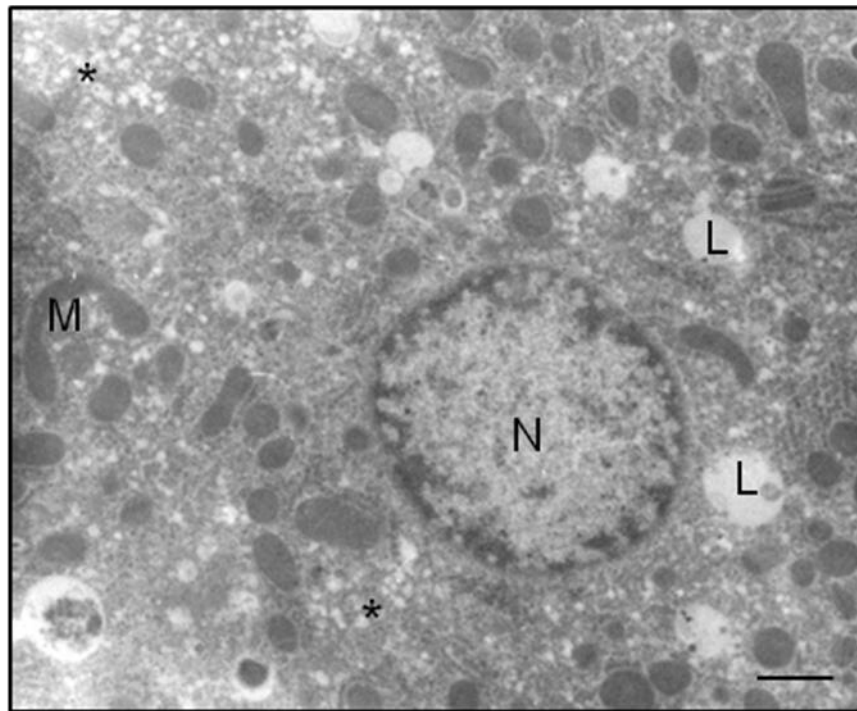


Figura 18: Inclusões lipídicas e microesteatoses em hepatócitos. Micrografia de fígado de camundongo BALB/c infectado pela via IP com a Linhagem I de DENV-2. Hepatócito apresentando microesteatoses (*) e inclusões lipídicas (L). Núcleo (N), mitocôndrias (M). Barra = 1,2µm.

Em tecido hepático de camundongos infectados experimentalmente com a Linhagem II de DENV-2 pelas vias IV ou IP, observaram-se células inflamatórias mononucleadas circulando nos capilares (Figura 19a) e no interstício (Figuras 19a e 19b), ativação de endotélio caracterizado por CE emitindo prolongamentos de membrana citoplasmática (Figura 20) e hepatócitos apresentando microesteatose (Figuras 21a e 21b) e inclusões lipídicas (Figuras 21c e 21d) em seus citoplasmas,

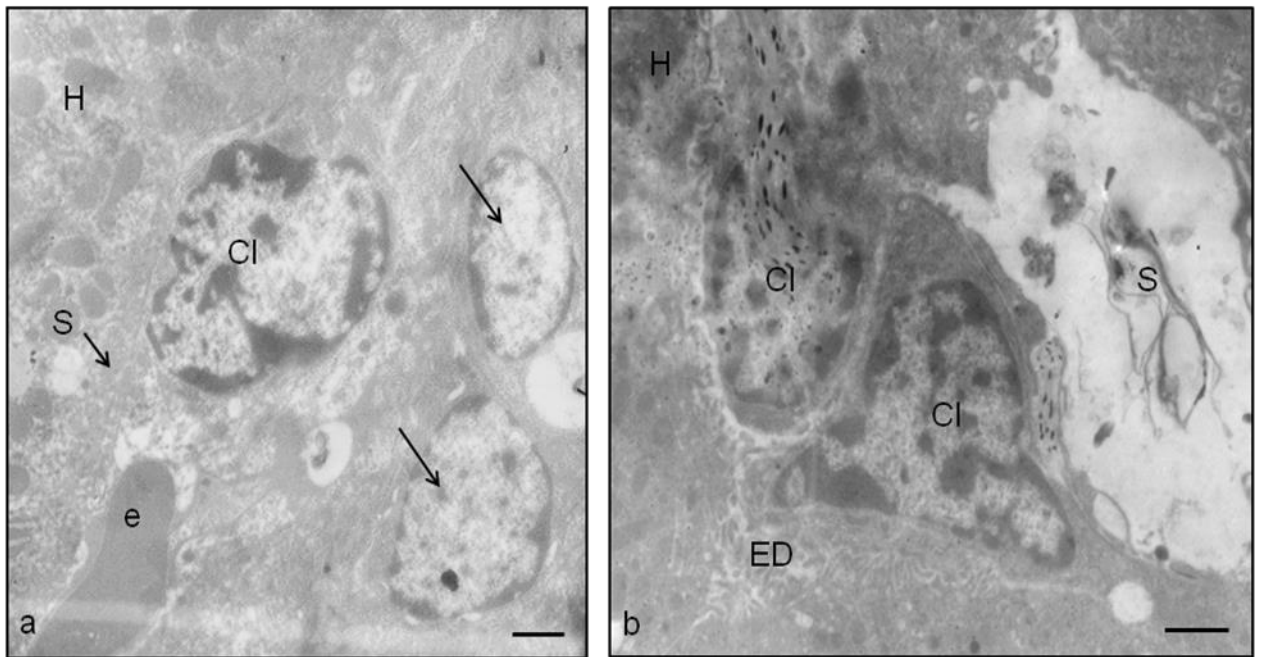


Figura 19: Células inflamatórias no interstício. Micrografia de fígado de camundongos BALB/c infectados pelas vias IV **(a)** e IP **(b)** com a Linhagem II de DENV-2. **(a)** Capilar sinusóide (S) contendo célula inflamatória (CI) e células inflamatórias mononucleares no interstício (seta). Barra = 1,8 μ m. **(b)** Células inflamatórias mononucleares (CI) migrando de capilar sinusóide (S) para o interstício. Barra = 2,0 μ m. Hepatócito (H), eritrócito (e), espaço de Disse (ED).

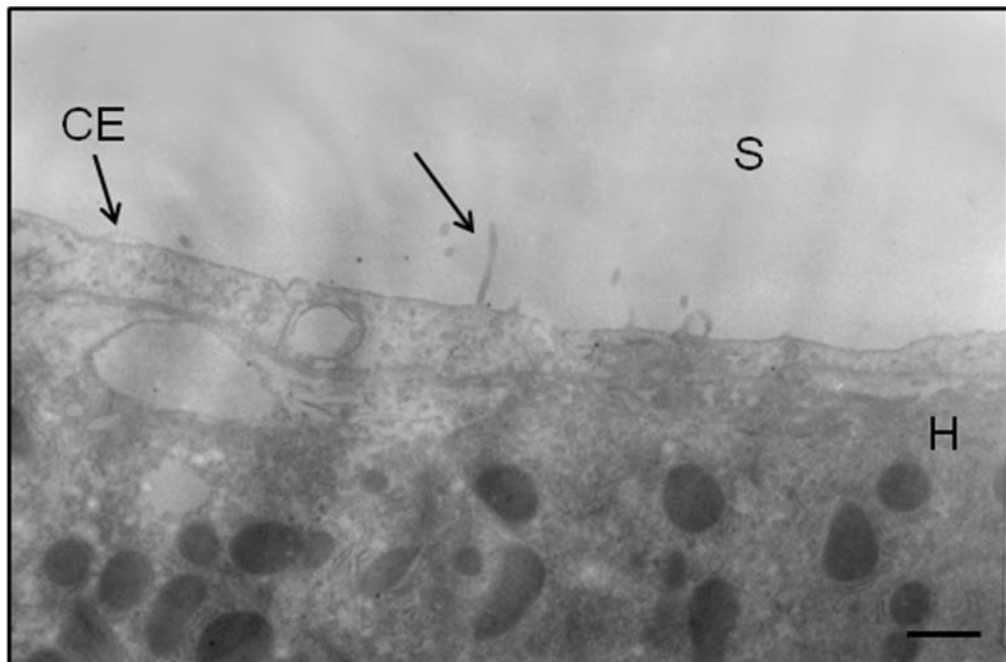


Figura 20: Ativação de endotélio evidenciado por prolongamentos de membrana da célula endotelial. Micrografia de fígado de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem I de DENV-2. Emissão de prolongamentos de membrana do endotélio (seta). Hepatócito (H), capilar sinusóide (S). Barra = 0,7 μ m.

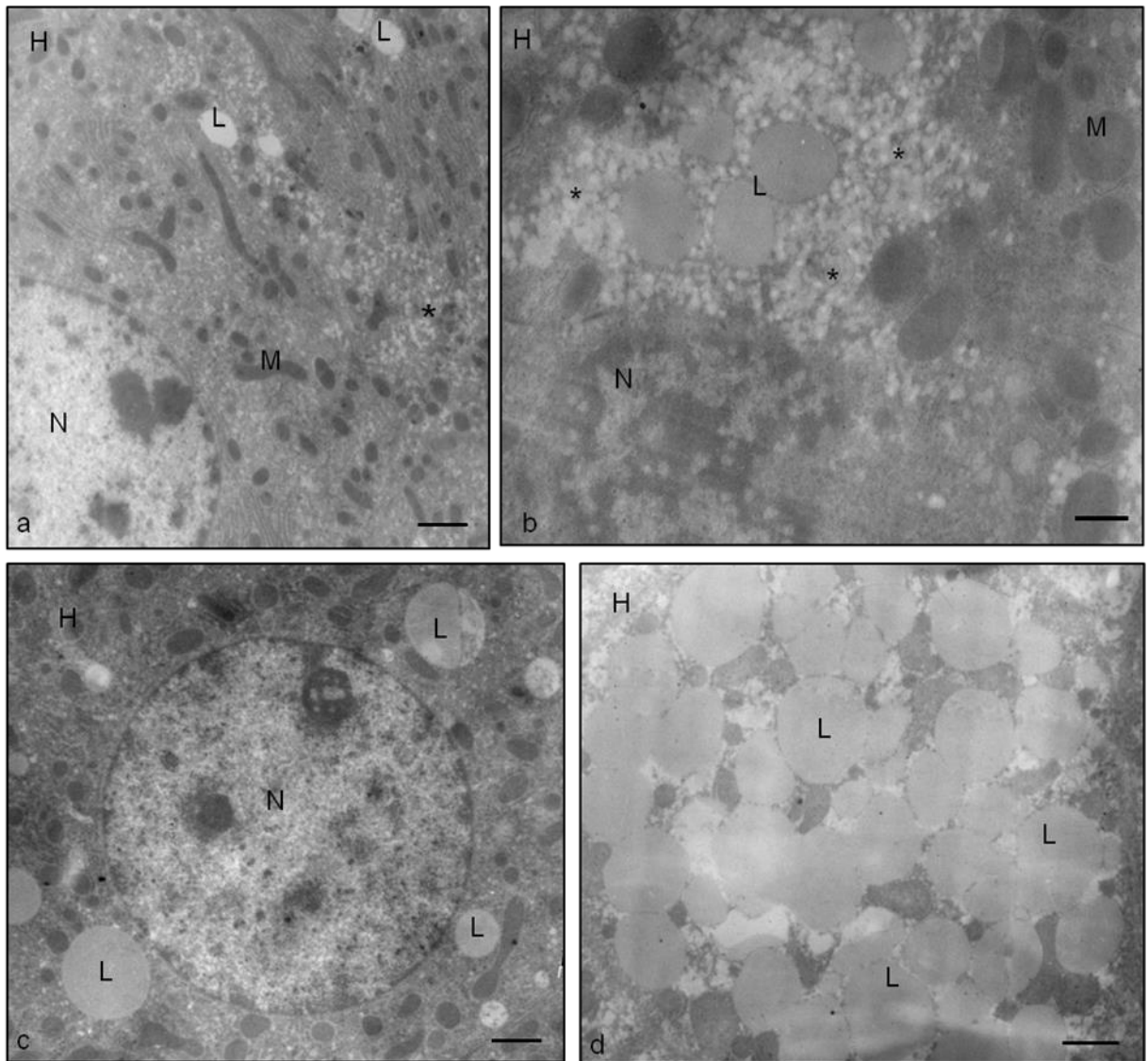


Figura 21: Microesteatose em hepatócitos. Micrografia de fígado de camundongos BALB/c infectados pelas vias IP **(a)** e IV **(b)** com a Linhagem II de DENV-2. **(a)** Inclusões lipídicas (L) e microesteatoses (*) no citoplasma de hepatócito (H). Barra = 1,8 μ m. **(b)** Note microesteatoses (*) e inclusões lipídicas (L) no hepatócito. Barra = 0,9 μ m. Núcleo (N), mitocôndrias (M).

O Quadro 2 sumariza as alterações morfológicas observadas em fígado de animais infectados com as linhagens I ou II de DENV-2 pelas vias IV ou IP.

Quadro 2: Alterações ultraestruturais observadas em fígado de camundongos BALB/c infectados experimentalmente, em duplicata, pelas Linhagens I ou II de DENV-2.

DENV-2	Via de inoculação	Características ultraestruturais observadas
Linhagem I	Inoculação Intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias mononucleadas no capilar e no interstício ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Inclusões lipídicas ✓ Microesteatose
	Inoculação Intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleadas ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Inclusões eletrondensas ✓ Microesteatose ✓ Plaquetas circulando no capilar
Linhagem II	Inoculação Intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleadas no capilar e mononucleadas no interstício ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Inclusões lipídicas no citoplasma de hepatócitos ✓ Microesteatose ✓ Plaquetas circulando no capilar
	Inoculação Intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias mononucleadas circulando no capilar e no interstício ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Inclusões lipídicas no citoplasma de hepatócitos ✓ Microesteatose

4.3.3 Análise ultraestrutural de pulmão de camundongos BALB/c infectados com as Linhagens de DENV-2

Análises ultraestruturais de pulmão de camundongos infectados com a Linhagem I de DENV-2 revelaram espessamento de septo interalveolar (Figura 22) devido à presença de células inflamatórias mononucleadas (Figura 22a) e polimorfonucleadas (Figura 22b) (pneumonia intersticial), acúmulo de líquido no capilar (Figura 23) e células inflamatórias mononucleadas (Figura 22a) e polimorfonucleadas (Figura 22b) circulando nos capilares.

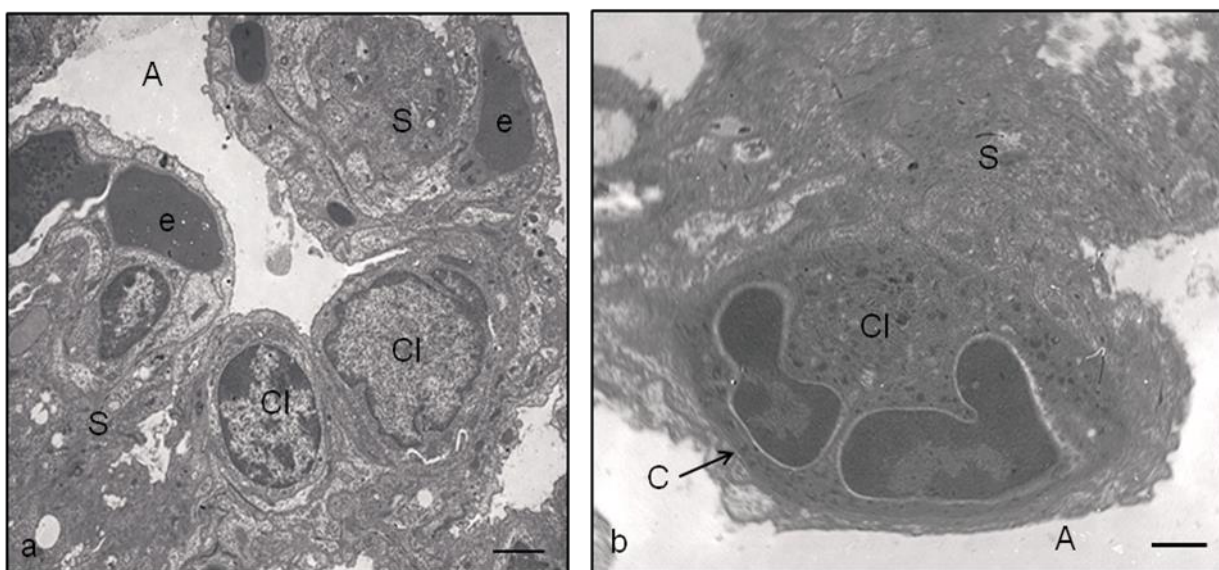


Figura 22. Espessamento de septo interalveolar e células inflamatórias no pulmão. Micrografias de tecido pulmonar de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem I de DENV-2. **(a)** Redução do espaço alveolar (A) devido ao espessamento dos septos interalveolares (S), presença de célula inflamatória mononucleada no capilar (CI). Barra = μm . **(b)** Célula inflamatória polimorfonucleada (CI) no capilar (C). Barra = $0,71\mu\text{m}$. Eritrócito (e), espaço alveolar (A), septo interalveolar (S).

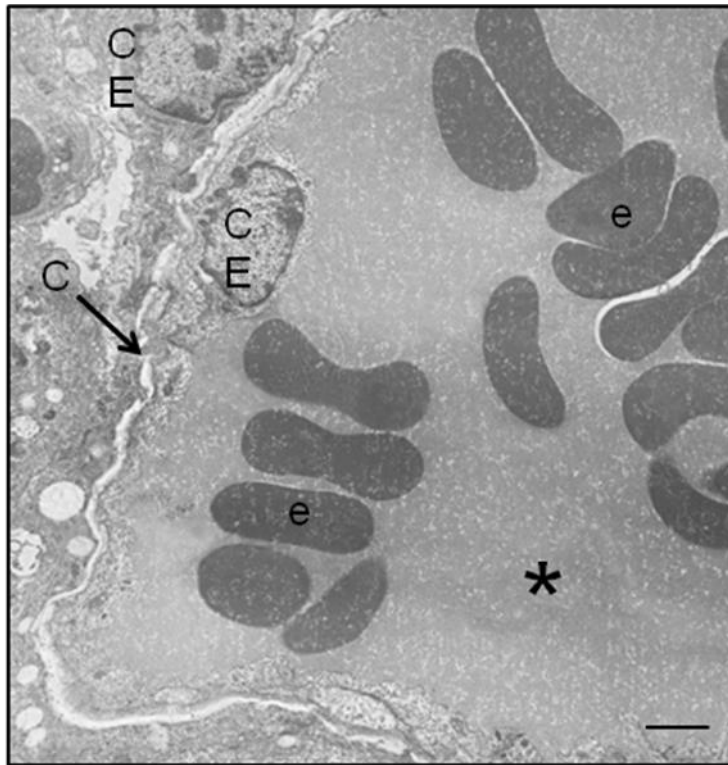


Figura 23: Acúmulo de líquido no vaso sanguíneo. Micrografia de tecido pulmonar de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem I de DENV-2. Presença de líquido no vaso sanguíneo (*). Célula endotelial (CE), eritrócitos (E). Barra = 1,4µm.

Análises ultraestruturais de pulmão de camundongos infectados com a linhagem II de DENV-2 revelaram espessamento de septo interalveolar (Figura 24), pneumonia intersticial com a presença de células polimorfonucleadas e mononucleadas e células inflamatórias polimorfonucleadas (Figura 24) e plaquetas circulando no capilar (Figura 25).

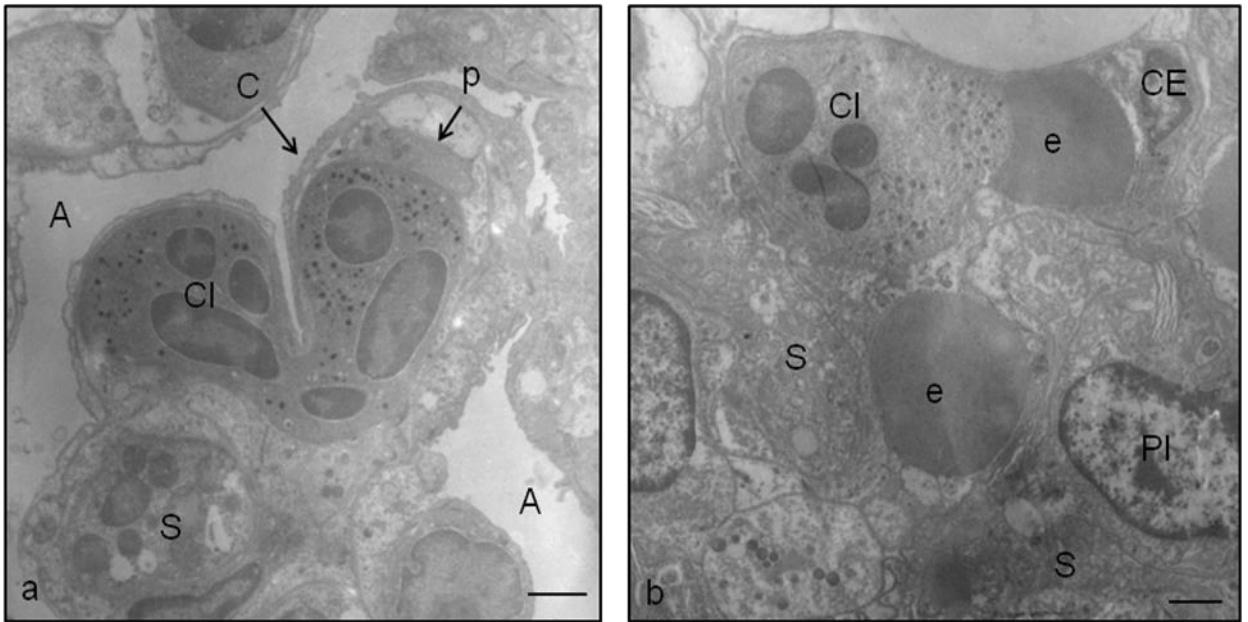


Figura 24: Espessamento de septo interalveolar e células inflamatórias no pulmão. Micrografias de pulmão de camundongos BALB/c infectados pelas vias IP **(a)** e IV **(b)** com a Linhagem II de DENV-2. **(a)** Célula inflamatória polimorfonucleada (CI) e plaquetas (p) no capilar (C). Barra = 2,4 μ m. **(b)** Célula inflamatória pólomfonucleada (CI) no capilar. Barra = 1,3 μ m. Septo interalveolar (S), pneumócito (PI), eritrócito (e), célula endotelial (CE).

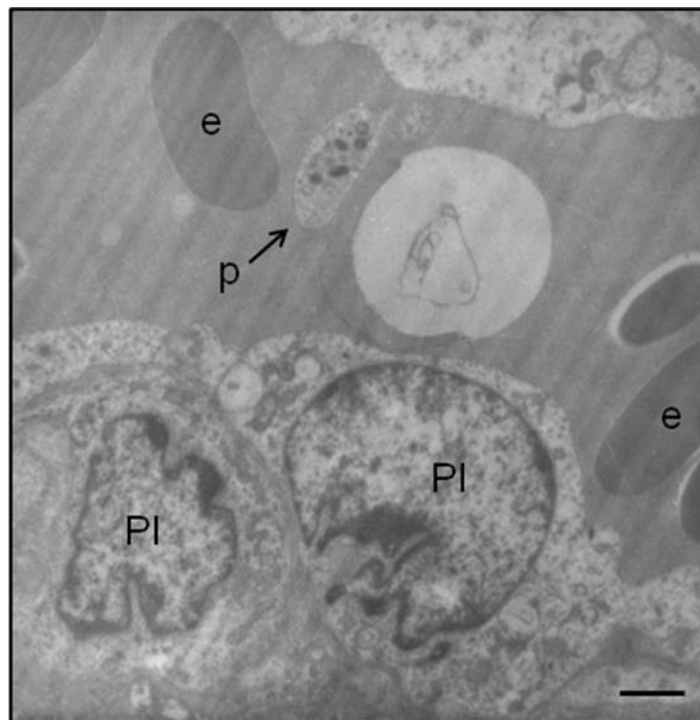


Figura 25: Plaqueta no capilar em pulmão. Micrografia de pulmão de camundongo BALB/c infectado pela via IV com a Linhagem II de DENV-2. Plaqueta (p) no capilar (C). Eritrócito (e), pneumócito I (PI). Barra = 2,1 μ m.

O Quadro 3 relaciona as alterações morfológicas observadas em pulmão de animais infectados com as linhagens I ou II de DENV-2 pelas vias IV ou IP.

Quadro 3: Alterações ultraestruturais observadas em pulmão de camundongos BALB/c infectados experimentalmente, em duplicata, pelas Linhagens I ou II de DENV-2.

DENV-2	Via de inoculação	Características ultraestruturais observadas
Linhagem I	Inoculação Intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acúmulo de líquido no capilar ✓ Células inflamatórias mononucleadas no interstício e no capilar e polimorfonucleadas no capilar ✓ Espessamento de septo interalveolar
	Inoculação Intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias polimorfonucleadas no capilar ✓ Espessamento de septo interalveolar
Linhagem II	Inoculação Intravenosa	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias mononucleadas circulando e no interstício e polimorfonucleadas no capilar ✓ Espessamento de septo interalveolar ✓ Plaquetas circulando no capilar
	Inoculação Intraperitoneal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células inflamatórias mononucleadas circulando no capilar e no interstício e polimorfonucleadas circulando no capilar ✓ Espessamento de septo interalveolar ✓ Plaquetas circulando no capilar

5 DISCUSSÃO

A introdução do genótipo do Sudeste Asiático de DENV-2 no Rio de Janeiro em 1990, resultou na ocorrência dos primeiros casos de dengue grave no estado e no país (Nogueira *et al.* 1990, Zagne *et al.*, 1994) e, sua re-emergência em 2007, causou a epidemia mais grave de dengue em 2008 (Teixeira *et al.*, 2009). Alguns genótipos de DENV são mais comumente associados com dengue grave e, o DENV-2 de origem asiática têm sido associado com epidemias ou casos de dengue grave (Rico-Hesse *et al.*, 2003; Balmaseda *et al.*, 2006). Apesar dos DENV-2 de 2007-2008 ainda pertencerem ao genótipo do Sudeste Asiático, duas Linhagens distintas dentro deste genótipo foram descritas (Oliveira *et al.*, 2010, Faria *et al.*, 2013). Variações genéticas são observadas, mas não foram identificadas diferenças consistentes no genoma que pudessem ser correlacionadas à gravidade da doença (Mangada & Igarashi, 1998; Pandey *et al.*, 2000; Raekiansyah *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2013). Neste sentido, ainda não estão bem definidos quais são os fatores que determinam porque certos indivíduos apresentam dengue e outros desenvolvem dengue grave, e o estabelecimento de modelos animais pode ser de grande relevância para estudos sobre a patogênese da doença.

Modelos murinos imunocompetentes não são capazes de produzir viremia eficientemente quando inoculados com amostras provenientes de isolados clínicos (Ashour *et al.*, 2010; Zompi *et al.*, 2012). A maioria dos modelos propostos pela literatura é de camundongos neonatos, humanizados ou imunodeficientes (Sriurairatna *et al.*, 1973; Tan *et al.*, 2010; Rajmane *et al.*, 2013), que utilizam vias invasivas de inoculação, como a intracraniana (Falgout *et al.*, 1990; Raut *et al.*, 1996) ou cepas de vírus neuroadaptadas em camundongos neonatos (Raut *et al.*, 1996; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2012).

Contudo, estudos prévios realizados no Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (IOC, Fiocruz) utilizando camundongos BALB/c infectados com cepas de DENV não neuroadaptadas e inoculadas pelas vias IV ou IP detectaram viremia do 2º ao 11º dia pós-infecção (Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005), além de alterações teciduais similares àquelas observadas em casos humanos (Barth *et al.*, 2006; Barreto *et al.*, 2007, 2009; Paes *et al.*, 2009; Rasinhas *et al.*, 2013).

Quarenta amostras de coração de camundongos BALB/c infectados pelas duas Linhagens de DENV-2 (n=20 para cada Linhagem) foram testados. O RNA viral foi detectado em 15 amostras e em um número maior de amostras infectadas pela

Linhagem I. No entanto, a diferença na detecção entre as duas Linhagens não foi significativa.

A média dos títulos virais detectados foi maior em camundongos infectados pela Linhagem II quando a via de inoculação foi a intravenosa. Em camundongos infectados pela via intraperitoneal, foi mais alta a média dos títulos de corações infectados com a Linhagem I. Em duas amostras de coração, o título viral obtido foi mais elevado do que dos inóculos utilizados para a infecção experimental, sugerindo de fato, replicação viral neste tecido. Tal observação corrobora os achados de Póvoa *et al.* (2014), que demonstrou replicação do DENV ao detectar a proteína NS3 em células de amostras de coração provenientes de pacientes de dengue que vieram a óbito.

Os resultados de estudos ultraestruturais de coração de camundongos BALB/c infectados pela via IV com as Linhagens I ou II do DENV-2 não demonstraram grandes discrepâncias no perfil de alterações morfológicas induzidas por ambas as Linhagens. Acúmulo de líquido no capilar, CE apresentando vesículas de transporte e emitindo prolongamentos de membrana, e PSD no citoplasma de CEs e em cardiomiócitos adjacentes foram alterações descritas nos órgãos de camundongos infectados por ambas as Linhagens. Em camundongos infectados com a Linhagem II foi possível observar, além das alterações supracitadas, células inflamatórias mononucleadas e plaquetas circulando no capilar e no interstício e inclusões perinucleares em cardiomiócitos. Nestes animais, PSD foram somente observadas em CE.

As alterações ultraestruturais observadas em corações de camundongos inoculados pela via IP pelas Linhagens I e II de DENV-2 também foram semelhantes. Em corações de camundongos infectados pela Linhagem I, notou-se células inflamatórias mononucleadas circulando no capilar e livres no interstício, acúmulo de líquido e plaquetas no capilar e CE produzindo vesículas de transporte (vesículas eletrólucidas) e emitindo prolongamentos de membrana plasmática. Em algumas áreas de amostras estudadas, as fibras dos cardiomiócitos se encontravam desorganizadas, contudo, na maioria dos casos estas se apresentavam sem qualquer alteração. Em camundongos infectados pela Linhagem II tais alterações também foram observadas, no entanto as fibras musculares estavam organizadas em todas as amostras analisadas, células inflamatórias encontravam-se contidas no capilar, algumas CE apresentavam PSD em seu citoplasma e inclusões perinucleares foram observadas em cardiomiócitos.

Tais resultados corroboram os achados de Rasinhas *et al.* (2013), que ao estudar amostras de coração de camundongos BALB/c infectados pelos DENV- 1, -2 ou -3 pela via IV, observou as mesmas alterações, com exceção das PSD em CE ou cardiomiócitos. No presente estudo não foi possível observar se cardiomiócitos apresentavam citoplasma rarefeito, como descrito por Rasinhas, devido à condição da fixação do órgão, que não foi completamente eficiente.

Estudos têm demonstrado que pacientes com infecções primárias e secundárias pelos DENV podem desenvolver disfunção cardíaca severa, incluindo hipotensão e arritmias, ainda que, envolvimento cardíaco mais pronunciado esteja associado às infecções secundárias (Kularatne *et al.*, 2007). As alterações mais comumente observadas são miocardite e pericardite (Obeyesekere and Hermon, 1972; Nagaratnam *et al.*, 1973; Obeyesekere and Hermon, 1973; Goh *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008). As alterações histológicas mais reportadas são edema intersticial com infiltrado inflamatório e necrose das fibras do miocárdio (Weerakoon *et al.*, 2011, Póvoa *et al.*, 2014). O mecanismo pelo qual se dá o envolvimento do miocárdio durante a dengue ainda não foi elucidado. Os vírus podem invadir o miocárdio diretamente, comprometendo as fibras musculares cardíacas ou causar reação de hipersensibilidade ou autoimune (Obeyesekere and Hermon, 1973). Múltiplos fatores, tais quais citocinas, TNF α e radicais livres de oxigênio são liberados durante infecções virais agudas, o que pode representar papel importante na patogênese de miocardite viral (Dhan *et al.*, 1990; Kasim *et al.*, 1991; Kuhl *et al.*, 1995; Matsumoria & Sasayama, 1995). Além do mais, é cada vez mais aparente que miocardiopatia dilatada é possivelmente resultante de miocardite viral aguda (Greissman *et al.*, 1995; Kuhl *et al.*, 1995; Miric *et al.*, 1995).

Neste estudo, PSD foram observadas em CE do coração e cardiomiócitos de camundongos infectados pelas duas Linhagens do DENV-2. Estudos ultraestruturais sobre replicação viral realizados em cultura de células C6/36 reportam partículas virais contidas em vesículas endossomais e em cisternas do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi (Barth *et al.*, 2000); contudo, as PSD observadas neste estudo, encontravam-se livres no citoplasma. Apesar de estudos prévios confirmarem a presença do DENV em células cardíacas (Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009; Póvoa *et al.*, 2014) e em células endoteliais de coração e outros órgãos (Jessie *et al.*, 2004; Balsitis *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014), ensaios de imunomarcção deverão ser realizados para a confirmação de que as partículas observadas são de fato DENV.

A presença do DENV já foi verificada em amostras de fígado humano e murino através da detecção do genoma viral, do antígeno viral ou da fita complementar do RNA do vírus (Miagostovich *et al.*, 1997; Barreto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2005, 2009; de Macedo *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014). Neste estudo, o RNA do DENV-2 pôde ser recuperado em amostras de fígado de murinos infectados, no entanto, em um número maior de amostras dos animais infectados pela Linhagem I. Fígados de camundongos inoculados pela via IV apresentaram, em média, título mais alto quando infectados pela Linhagem II. Em camundongos inoculados pela via IP, a média mais alta foi verificada quando os camundongos foram infectados pela Linhagem I.

Em um estudo realizado por Póvoa e colaboradores (2014), a replicação do DENV foi comprovada em hepatócitos através de ensaio de hibridização *in situ* que demonstrou a presença da fita complementar do RNA do vírus. Alguns dos títulos de RNA recuperados das amostras deste estudo foi superior àqueles dos inóculos utilizados para a infecção dos animais, sendo possível sugerir que houve replicação do vírus.

Células inflamatórias mononucleadas no capilar e no interstício, acúmulo de líquido no capilar e hepatócitos apresentando inclusões lipídicas e microesteatoses foram alterações morfológicas encontradas em fígado de camundongos infectados pela via IV pelas duas Linhagens de DENV-2. Células inflamatórias polimorfonucleadas no capilar, presença de plaquetas no capilar e livres no interstício foram observadas somente em fígado de animais infectados pela Linhagem II. A infecção pela Linhagem I não causou nenhuma alteração distinta daquelas causadas pela infecção com a outra Linhagem.

Em camundongos infectados com duas Linhagens pela via IP foi possível observar células inflamatórias mononucleadas no capilar e no interstício, acúmulo de líquido no capilar e microesteatoses. Plaquetas no capilar e células inflamatórias polimorfonucleadas foram observadas somente em camundongos infectados pela Linhagem I e inclusões lipídicas em hepatócitos foram observados apenas em animais infectados pela Linhagem II.

Em modelo murino, o comprometimento do fígado, como alterações de funções hepáticas e da morfologia do tecido também ocorre (Chen *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012). Infiltrado de células mononucleares, inclusões lipídicas em hepatócitos, microesteatoses e acúmulo de

líquido no capilar, verificados durante este estudo, já foram previamente reportados (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012). Focos de hemorragia, vacuolização do citoplasma de hepatócitos, colapso parcial de capilares sinusóides, e dilatação de vasos sanguíneos (Na *et al.*, 1999; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2009) não foram verificados durante este estudo.

O envolvimento do fígado durante a infecção pelos DENV tem sido reportado em diversos estudos de casos humanos e é mais comumente caracterizado pelo aumento dos níveis das enzimas do fígado ALT e AST, hepatomegalia e icterícia. Casos de hepatite severa a moderada, falência hepática fulminante e hepatite colestática já foram descritos (Kuo *et al.*, 1992; de Souza *et al.*, 2007; Parkash *et al.*, 2010; Sedhain *et al.*, 2011; Bowman *et al.*, 2012; Manoj *et al.*, 2014; Yudhishdran *et al.*, 2014). Alterações das funções hepáticas são comuns em pacientes de dengue devido ao efeito direto da infecção das células deste tecido pelos DENV ou à resposta imune desregulada do hospedeiro à infecção (Wong *et al.*, 2008).

As alterações morfológicas já descritas em amostras provenientes de casos humanos, tais como inclusões lipídicas na região perinuclear de hepatócitos, microesteatoses, infiltrado mononuclear no espaço periportal, edema no capilar (Póvoa *et al.*, 2014; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005), também foram observadas neste estudo, em amostras de fígado de camundongos infectados pelas duas Linhagens de DENV-2. O espessamento de mitocôndrias, reportado em estudos realizados em cultura de células HepG2 (El-Bacha *et al.*, 2007; Póvoa *et al.*, 2014) não foi notado em nossas amostras. A vacuolização do citoplasma não pode ser verificada em hepatócitos, devido ao estado de preservação do material.

A detecção do DENV em amostras de fígado através de MET já foi descrita por Limonta *et al.* (2012), porém, ainda que em todas as amostras de fígado analisadas a fim de se observar alterações morfológicas, o RNA do DENV tenha sido detectado, PSD não foram observadas.

A presença do vírus no pulmão dos camundongos foi demonstrada através da detecção do genoma viral em animais infectados pelas Linhagens I e II. Estudos prévios demonstraram o isolamento dos DENV no pulmão de camundongos experimentalmente infectados (Barreto *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2006) e PSD foram observadas em retículo endoplasmático rugoso de macrófagos alveolares (Barreto *et al.*, 2007).

Ao compararmos os títulos virais detectados em tecido pulmonar de camundongos inoculados pela via IV, observamos uma média nos títulos mais elevada quando a infecção foi realizada com a Linhagem I. O contrário foi observado quando a via de inoculação foi a intraperitoneal. A média dos títulos verificados foi maior nos tecidos infectados com a Linhagem II. A replicação de DENV em pulmão já foi demonstrada previamente, através da identificação da fita complementar do RNA viral em macrófagos alveolares (Póvoa *et al.*, 2014). As cargas virais verificadas em amostras de tecido pulmonar de dois camundongos infectados pela Linhagem I pela via IV superaram aquela verificada nos inóculos utilizados para infecção experimental, o que sugere que nestas amostras houve replicação viral.

As alterações morfológicas verificadas em tecido pulmonar infectado pela via IV pelas duas Linhagens de DENV-2 foram, em geral, semelhantes: espessamento de septo interalveolar, células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleadas nos capilares. Somente em pulmão de camundongos infectados com a Linhagem II foi possível observar plaquetas nos capilares. Quando a via de inoculação de escolha foi a IP, não houve detecção do genoma viral em nenhuma amostra infectada pela Linhagem II, logo, estudos morfológicos não foram realizados. Em camundongos infectados com a Linhagem I foi possível verificar, assim como em amostras infectadas pela via IV, espessamento de septo interalveolar, plaquetas contidas no capilar e células inflamatórias nos capilares e livres no interstício, edema no capilar e no espaço alveolar além de presença de prolongamentos de membrana citoplasmática em células endoteliais.

Nossos resultados confirmam os achados de Barreto *et al.* (2004) e Barth *et al.* (2006), que observaram espessamento de septo interalveolar, recrutamento de plaquetas e infiltrado inflamatório mononuclear em pulmão de camundongos BALB/c infectados com o DENV-2 não neuroadaptado e com os resultados preliminares (não publicados) de experimentos realizados com o DENV-1, que também mostram alterações semelhantes. Atrasheuskaya *et al.* (2003) observou células inflamatórias e debris nucleares nos alvéolos e congestão de vasos do septo interalveolar. Tais alterações não foram verificadas em nossas amostras, entretanto são confirmações de que em modelo murino, assim como em casos humanos, pode haver envolvimento do pulmão durante infecção pelos DENV.

Alterações morfológicas verificadas a partir amostras provenientes de casos de óbito em humanos, como espessamento de septo interalveolar e infiltrado inflamatório mononuclear (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2014)

assemelham-se aos achados do presente trabalho. Em amostras de tecido pulmonar de humanos, PSD e partículas virais em CE do pulmão foram identificadas em estudos ultraestruturais em MET por Limonta *et al.* (2012) e Póvoa *et al.* (2014), respectivamente. Outros estudos já identificaram o genoma viral e antígenos do DENV em diferentes tipos celulares de amostras de pulmão provenientes necrópsias (Miagostovich *et al.*, 1997; Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011).

Neste estudo, o RNA viral também foi detectado em amostras de cérebro dos camundongos infectados pelas duas Linhagens de DENV-2. Dentre as amostras positivas, uma amostra de camundongo inoculado com a Linhagem I pela via IP apresentou o título maior ($5,0 \times 10^{12}$ cópias de RNA/ml) que aquele do inóculo utilizado para realizar a infecção. Tanto o genoma quanto antígenos virais do DENV já foram detectados em amostras de cérebro de camundongos infectados experimentalmente (Lin *et al.*, 1998; Na *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1999; Barreto *et al.*, 2004; Shresta *et al.*, 2006), e a partir de casos fatais humanos (Miagostovich *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011), sugerindo que o DENV pode infectar células deste órgão tanto em humanos quanto em camundongos.

Neste estudo, uma maior positividade foi observada em cérebros de camundongos infectados pela Linhagem I, no entanto, a diferença observada entre ambas as Linhagens não foi significativa ($p=0,16$). Os títulos virais obtidos neste estudo variaram entre $3,13 \times 10^0$ e $5,0 \times 10^{12}$ cópias de RNA/ml. Ao convertemos as médias dos títulos de cópias de RNA/ml para PFU/ml, de acordo com Richardson *et al.* (2006), que diz que o número de cópias de RNA superam as unidades formadoras de placa (PFU) em cerca de 1000 a 5000 unidades, resultados obtidos variaram entre $4,76 \times 10^0$ PFU/ml e $1,00 \times 10^9$ PFU/ml e, um estudo por Shresta *et al.* (2006) obteve títulos entre 10^2 e 10^5 PFU/ml em tecido nervoso de camundongos infectados experimentalmente. Quando analisamos os títulos resultantes da infecção feita pela via IV, ficou demonstrado que as Linhagens I e II infectaram o mesmo número de cérebros de camundongos e a média dos títulos observados foi mais elevada em amostras infectadas pela Linhagem I. Resultado semelhante foi observado entre os títulos induzidos pela via IP, entretanto, apenas o resultado observado para tecidos infectados por esta via foi estatisticamente significativo ($p=0,04$).

Manifestações neurológicas podem ocorrer durante a infecção pelo DENV e casos de encefalite associados à dengue, além de outras manifestações menos

frequentes, têm sido relatadas. Estudos prévios reportaram o isolamento do DENV a partir do líquido cefalorraquidiano de crianças diagnosticadas com encefalite associada à doença. (Lum *et al.*, 1996; Salomon *et al.*, 2000; Cam *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2014).

Nenhum sinal de alteração neurológica foi observado nos camundongos infectados pelas duas Linhagens do DENV-2 durante o período entre a infecção e eutanásia. Entretanto, sinais de encefalite, paralisia e cegueira já foram reportados em trabalhos desenvolvidos com camundongos (Falgout *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1998; Na *et al.*, 1999; Jonhson *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2013). Tal fato pode estar relacionado à via de inoculação invasiva escolhida ou à escolha de camundongos humanizados ou imunodeficientes como modelo experimental. De mais a mais, casos de paraparesia, quadriparesia e hemiplagia, ainda que reversíveis, já foram observados em humanos infectados pelos DENV (Gutch *et al.*, 2012).

Através de MET, Limonta *et al.* (2012) detectou PSD em uma amostra proveniente de caso humano de óbito e Sriurairatna *et al.* (1973), em cérebro de camundongos neonatos infectados intracranialmente. No entanto, apesar do RNA do DENV ter sido detectado em amostras pareadas às que foram observadas ao MET, não foi possível observar tais partículas em nenhuma delas.

O envolvimento do baço durante a infecção pelo DENV já foi reportado (Gulati *et al.*, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Esplenomegalia e ruptura esplênica espontânea são manifestações raras que já foram verificadas em pacientes com dengue. O baço encontra-se frequentemente congestionado em casos de FHD e hematoma subcapsular é observado em 15% dos casos de óbito (Gulati *et al.*, 2007; de Moura Mendonça *et al.*, 2011; Bhaskar *et al.*, 2012; Mukhopadhyay *et al.*, 2014).

O genoma viral foi detectado em 11 amostras de baço de camundongos infectados experimentalmente pelas duas Linhagens de DENV-2 e, um maior número de resultados positivos foi observado entre os camundongos infectados com a Linhagem I. Um estudo prévio com modelo murino também reportou a presença do vírus neste órgão (Shresta *et al.*, 2006). Há na literatura, descrição de casos humanos de dengue onde o vírus pode ser detectado em células do baço (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014).

Independente da via de inoculação utilizada, a média dos títulos de DENV-2 observados foi mais elevada em baços infectados pela Linhagem I. A análise da detecção e quantificação do DENV-2 em baço de camundongos infectados pela via

IV revela que a Linhagem II infectou maior número de baços. A média dos títulos virais induzidos pela infecção com a Linhagem II foi mais elevada. No entanto, tais resultados não foram estatisticamente significativos.

Em um experimento realizado com camundongos infectados experimentalmente por duas Linhagens de DENV-2, Shresta *et al.* (2006) isolou e quantificou o DENV a partir de amostras de baço e reportou títulos entre 10^2 e 10^4 PFU/ml. As médias dos títulos (em PFU/ml, convertidas de acordo com Richardson, 2006) observados nas amostras infectadas pelas Linhagens I ou II variaram entre $1,46 \times 10^{-1}$ PFU/ml e $3,32 \times 10^4$ PFU/ml. Um título de $5,00 \times 10^{12}$ foi detectado em um camundongo inoculado através da via IP com a Linhagem I do DENV-2. Tais observações sugerem que houve replicação viral já que o inóculo utilizado para infectar os camundongos com a Linhagem II apresentava o título $7,49 \times 10^8$ cópias de RNA/ml.

Em uma infecção primária, em casos humanos de dengue, os vírus podem ser encontrados circulando no sangue periférico já na época do aparecimento dos primeiros sintomas. A viremia dura cerca de 5 dias com o último dia coincidindo com o início da fase febril (Vaughn *et al.*, 1997, 2002). As amostras de soro testadas neste trabalho foram coletadas 72 horas p.i. e outros estudos realizados com camundongos reportam a detecção da viremia entre o 2º e o 11º dias após a infecção (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2006; Shresta *et al.*, 2006).

O genoma viral pôde ser identificado apenas em quatro amostras de soro de camundongos infectados pela Linhagem I. É possível que tal resultado esteja relacionado ao curto período de tempo entre a infecção e a eutanásia, que foi de 72h p.i., tempo este estabelecido de acordo com estudos prévios realizados por Barth e colaboradores (2006) onde uma cinética foi aplicada e notou-se que neste tempo as alterações teciduais eram mais evidentes. É possível especular ainda, que a baixa porcentagem de amostras positivas deva-se também ao fato de que os vírus estejam infectando neste tempo as células dos diferentes órgãos.

Dentre as quatro amostras positivas para o RNA do DENV-2, três eram provenientes de camundongos infectados pela Linhagem I e a média dos títulos detectados foi mais elevada em soros infectados pela Linhagem I. Este resultado não está em acordo com os achados de Nunes *et al.* (2012), que em um estudo comparativo entre viremias induzidas pelas duas Linhagens de DENV-2 realizado com amostras de soro de casos humanos de dengue, concluiu que soro de pacientes infectados pela Linhagem II apresentavam viremia mais alta. Uma amostra

de camundongo infectado pela Linhagem I, pela via IV, apresentou título de $1,0 \times 10^{13}$ cópias de RNA/mL, título este maior que o título detectado no inóculo utilizado para infectar os animais ($1,09 \times 10^7$ cópias de RNA/ml), sugerindo replicação viral. Neste mesmo animal, o genoma viral foi detectado em 4 órgãos (coração, fígado, pulmão e cérebro), mostrando que houve disseminação do vírus em diferentes tecidos. No entanto, as cargas virais detectadas nestes tecidos foram mais baixas. Em estudos realizados com amostras de soro de pacientes diagnosticados com dengue, a média dos títulos observados amostras de infecções primárias pelo DENV-2 variou entre 10^6 e 10^7 cópias de RNA/mL, no 3º dia de doença (Tricou *et al.*, 2011) e 10^3 e 10^2 cópias de RNA/mL nos 2º e 6º dias de doença, respectivamente (Yeh *et al.*, 2006). Este último trabalho reportou títulos que se aproximam dos observados em nossas amostras cujos títulos virais detectados foram mais baixos ($1,20 \times 10^3$; $3,96 \times 10^3$ e $1,17 \times 10^4$ cópias de RNA/mL). Laue e colaboradores (1999) também detectaram título viral semelhante (10^3 cópias de RNA/mL) em amostras de sangue coletadas logo nos primeiros dias após o aparecimento dos sintomas.

A atual situação de hiperendemicidade com circulação de cepas virais de origem asiática ressalta a investigação do papel destes vírus na ocorrência dos casos graves e fatais. Ficou demonstrado neste estudo, que as diferentes Linhagens virais podem apresentar padrões de disseminação distintos e resultar em viremias distintas no modelo murino utilizado e, diante da multi-fatorialidade da patogênese da doença, mais estudos são sugeridos.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Independente da Linhagem de DENV-2 inoculada, o coração foi o órgão mais frequentemente acometido quando a via de inoculação foi IV;
- ✓ Coração, baço, cérebro e fígado foram os órgãos mais acometidos quando os camundongos Balb/c foram infectados pela Linhagem I pela via IP quando comparados àqueles infectados pela Linhagem II;
- ✓ Independente da via de inoculação e do órgão analisado, foram observados maiores títulos virais em amostras teciduais de camundongos infectados pela Linhagem I;
- ✓ Os títulos virais induzidos pela Linhagem I de DENV-2 foram mais elevados em soro, pulmão e cérebro, e pela Linhagem II em coração, fígado e baço;
- ✓ Não foram observadas diferenças no perfil das alterações morfológicas induzidas por ambas as Linhagens de DENV-2 no tecido cardíaco dos camundongos infectados; porém PSD foram observadas no citoplasma de células endoteliais de cardiomiócitos;
- ✓ As alterações morfológicas já descritas no fígado de casos humanos também foram observadas no fígado de camundongos infectados pelas duas Linhagens de DENV-2;
- ✓ Títulos virais mais elevados no tecido pulmonar de camundongos inoculados pela via IV foram induzidos pela infecção da Linhagem I, no entanto, quando a via foi IP, os maiores títulos foram induzidos pela Linhagem II;
- ✓ genoma viral foi detectado no cérebro dos camundongos infectados pelas duas Linhagens de DENV-2 e, em um caso, com título viral maior do que o inóculo, porém sinais de alteração neurológica não foram observados;
- ✓ As duas Linhagens foram detectadas no baço, porém uma maior positividade e maior título viral, foram observados em camundongos infectados pela Linhagem I;
- ✓ Uma baixa detecção viral foi observada no soro dos camundongos infectados por ambas Linhagens, porém entre as amostras positivas, a Linhagem I foi a mais detectada e com maiores títulos virais.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Processar as amostras da triplicata do estudo para a realização de qRT-PCR e estudos morfológicos;
- ✓ Realizar ensaios de imunomarcção em amostras de coração para confirmar a presença de partículas do DENV em CE e cardiomiócitos, bem como nos outros órgãos estudados;
- ✓ Processar amostras de cérebro e baço utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão com o objetivo de analisar alterações morfológicas;
- ✓ Realizar isolamento viral a partir de sobrenadante proveniente de macerados de tecidos de camundongos infectados com as duas Linhagens do DENV-2.
- ✓ Realizar estudos morfométricos para avaliar possíveis diferenças quantitativas das alterações teciduais induzidas pelas duas Linhagens de DENV-2.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2): 376-81.

An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, Yasui K. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology.* 1999; 263(1): 70-7.

Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, Te V, Y B, Try PL, Buchy P. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(12):e1993.

Araújo FM, Nogueira RM, de Araújo JM, Ramalho IL, Roriz ML, de Melo ME, Coelho IC. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Dec; 101(8): 925-8.

Araújo JM, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Zanotto PM, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(4): 716-25.

Arya, 2005 - Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005; 5(2): 209-19.

Ashour J, Morrison J, Laurent-Rolle M, Belicha-Villanueva A, Plumlee CR, Bernal-Rubio D, Williams KL, Harris E, Fernandez-Sesma A, Schindler C, García-Sastre A. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. *Cell Host Microbe.* 2010; 8(5): 410-21.

Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immun and Med Microbiol.* 2003; 35: 33-42.

Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses – an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013; 30: 3.

Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, Cuadra R, Rocha J, Pérez MA, Silva S, Rocha C, Harris E. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(3): 449-56.

Balsitis SJ, Coloma J, Castro G. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2009; 80(3): 416–424.

Balsitis, 2010 - Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, Johnson S, Diamond MS, Beatty PR, Harris E. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog.* 2010; 6(2): e1000790.

Barreto DF, Takiya CM, Paes MV, Farias-Filho J, Pinhão AT, Alves AM, Costa SM, Barth OM. Histopathological aspects of Dengue-2 virus infected mice tissues and complementary virus isolation. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004; 36(2): 121-30.

Barreto DF, Takiya CM, Schatzmayr HG, Nogueira RM, Farias-Filho Jda C, Barth OM. Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with denguevirus serotype 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(2): 175-82.

Barreto D F; Schatzmayr, H G; Takiya, C M; Jácome FC; Silva, MEV; Faria, NRC; Nogueira, RMR; Barth, O M. Histopathological and ultrastructural studies of lung tissue of mice reinfected with dengue virus serotype 1 or 2. *Virus Reviews and Research.* 2009; 14: 21-32.

Barreto DF, Barth MO, Schatzmayr HG. Modelo animal experimental para o estudo da patogênese dos vírus dengue sorotipos 1 e 2. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2010.

Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados*. 2008; 22(64): 53-72.

Barth OM, Barreto DF, Paes MV, Takiya CM, Pinhão AT, Schatzmayr HG. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(8): 905-15.

Barth, OM. Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2000.

Basílio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, Paes MV. Pathologic Study of a Fatal Case of Dengue-3 Virus Infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005; 9(4): 341-7.

Bente DA, Melkus MW, Garcia JV, Rico-Hesse R. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol*. 2005; 79(21): 13797-9.

Bhaskar E, Moorthy S. Spontaneous splenic rupture in dengue fever with non-fatal outcome in an adult. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(4): 369-72.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504-7.

Bhoi SK, Naik S, Kumar S, Phadke RV, Kalita J, Misra UK. Cranial imaging findings in dengue virus infection. *J Neurol Sci*. 2014; 342(1-2): 36-41.

Bray M, Men R, Lai CJ. Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge. *J Virol*. 1996; 70(6): 4162-6.

Bowman S, Salgado C, DeWaay DJ. Dengue fever presenting with hepatitis. *Am J Med Sci.* 2012; 344(4): 335-6.

Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(6): 848-51.

Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(1): 132-4.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol.* 1990; 44: 649-688.

Chen HC, Lai SY, Sung JM, Lee SH, Lin YC, Wang WK, Chen YC, Kao CL, King CC, Wu-Hsieh BA. Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol.* 2004; 73(3): 419-31.

Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol.* 2007; 81(11): 5518-26.

Chen LH, Wilson ME. Recent Advances and New Challenges in Travel Medicine. *Curr Infect Dis Rep.* 2002; 4(1): 50-58.

Chen R, Vasilakis N. Dengue-quo tu et quo vadis? *Viruses.* 2011; 3(9): 1562-608.

Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997; 3(8): 866-71.

Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006; 80(23): 11418-31.

Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JL, Armôa GR, Freire MS, Alves AM. Protection against dengue type 2 virus induced in mice

immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine*. 2006; 24(2): 195-205.

Cox J, Mota J, Sukupolvi-Petty S, Diamond MS, Rico-Hesse R. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. *J Virol*. 2012; 86(14): 7637-49.

de Macedo FC, Nicol AF, Cooper LD, Yearsley M, Pires AR, Nuovo GJ. Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15(4):223-8.

De Moura Mendonça LS, de Moura Mendonça ML, Parrode N, Barbosa M, Cardoso RM, de Araújo-Filho JA. Splenic rupture in dengue hemorrhagic fever: report of a case and review. *Jpn J Infect Dis*. 2011; 64(4): 330-2.

de Oliveira BCEPD. Funcionalidade dos componentes estruturais da quimera viral flavivírus-mixovírus. Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)] - Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2004.

De Paula SO, Pires Neto RJ, Corrêa JAC. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. *Trans R S Trop Med Hyg*. 2002; 96: 266-9.

De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis*. 2004; 8(6): 390-8.

De Souza LJ, Nogueira RM, Soares LC, Soares CE, Ribas BF, Alves FP, Vieira FR, Pessanha FE. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Braz J Infect Dis*. 2007; 11(4): 407-410.

del Angel RM, Reyes-del Valle J. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10): e1003551. doi: 10.1371/journal.ppat.1003551

Dhan R, Khanna M, Chaturvedi UC, Mathur A. Effect of dengue virus-induced cytotoxin on capillary permeability. *J Exp Pathol*. 1990; 71: 83-88.

dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RM, Edgil D, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7): 991-5.

dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, Simões JB, Sampaio SA, Santos CR, Nogueira RM. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Viol J*. 2011; 8: 387.

Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(9): 4171-5.

Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(7):2323-30.

Dussart P, Lavergne A, Lagathu G, Lacoste V, Martial J, Morvan J, Cesaire R. Reemergence of dengue virus type 4, French Antilles and French Guiana, 2004-2005. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(11): 1748-51.

El-Bacha T, Midlej V, Pereira da Silva AP, Silva da Costa L, Benchimol M, Galina A, Da Poian AT. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772(10): 1158-66.

Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D, Kanesa-Thanan N, Vaughn DW, Innis BL, Sun W. Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69(6): 48-60.

Edelman R, Hombach J. Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas: summary of a World Health Organization Technical Consultation. *Vaccine*. 2008; 26(33): 4113-9.

Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol.* 1990; 64(9): 4356-63.

Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simões JB, Nogueira Fde B, da Rocha Queiroz Lima M, dos Santos FB. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(3): e2095.

Figueiredo ML, Alfonso HL, Amarilla AA, Figueiredo LT, Aquino VH, Costa CA, Luz SL. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. *Virol J.* 2013; 10: 60.

Frias-Staheli N, Dorner M, Marukian S, Billerbeck E, Labitt RN, Rice CM, Ploss A. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. *J Virol.* 2014; 88(4): 2205-18.

Gonçalves D, Prado RQ, Xavier EA, de Oliveira NC, Guedes PMM, da Silva JS, Figueiredo LTM, Aquino VH. Immunocompetent Mice Model for Dengue Virus Infection. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:525947. doi: 10.1100/2012/525947. Epub 2012 May 15.

Ghosh A, Dar L. Dengue vaccines: Challenges, development, current status and prospects. *Indian J Med Microbiol.* 2015; 33(1): 3-15.

Greissman A, Silver P, Nimkoff L, Sagy M. Transvenous right ventricular pacing during cardiopulmonary resuscitation of pediatric patients with acute cardiomyopathy. *Pediatr Emerg Care.* 1995; 11: 17-19.

Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1984; 33(1): 158-65.

Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis.* 1995; 1(2): 55-7.

Gubler DJ. Human behaviour and cultural context in disease control. *Trop Med Int Health*. 1997; 2(11): A1-2.

Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11(3): 480-496.

Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2002; 10(2):100-3.

Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* 2006; 277: 3-16.

Gulati S, Maheshwari A. Atypical manifestations of dengue. *Trop Med Int Health*. 2007; 12(9): 1087-95.

Gutch M, Agarwal A, Amar A. Hypokalemic quadriparesis: An unusual manifestation of dengue fever. *J Nat Sci Biol Med.* 2012; 3(1): 81–83.

Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(1): 33-42.

Guzmán MG, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis.* 2004; 8(2): 69-80.

Guzmán MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003; 27(1): 1-13.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegriño JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(12): 7-16.

Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2014 Sep; 12. pii: S0140-6736(14)60572-9. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9. [Epub ahead of print]

Halstead SB. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *Rapp Trimest Statist Sanit Mondo* 1992; 45: 292-8.

Holland, PM et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(16): 7276-80.

Horstick O, Martinez E, Guzman MG, Martin JL, Ranzinger SR. WHO Dengue Case Classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathog Glob Health*. 2015 Jan 28:2047773215Y0000000003.

Huang KJ, Li SY, Chen SC, Liu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Lei HY. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol*. 2000; 81(9): 2177-82.

Huang Q, Fu WL, Chen B, Huang JF, Zhang X, Xue Q. Inactivation of dengue virus by methylene blue/narrow bandwidth light system. *J Photochem Photobiol B*. 2004; 77(1-3): 39-43.

Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*. 1978; 40(3): 531-44.

Jaiswal S, Pearson T, Friberg H, Shultz LD, Greiner DL, Rothman AL, Mathew A. Dengue virus infection and virus-specific HLA-A2 restricted immune responses in humanized NOD-scid IL2rgammanull mice. *PLoS One*. 2009; 4(10): 7251.

Jaiswal S, Pazoles P, Woda M, Shultz LD, Greiner DL, Brehm MA, Mathew A. Enhanced humoral and HLA-A2-restricted dengue virus-specific T-cell responses in humanized BLT NSG mice. *Immunology*. 2012; 136(3): 334-43.

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004; 189(8): 1411-1418.

Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*. 2004; 149(5): 915-27.

Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol*. 1999; 73(1): 783-6.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4977-4983.

Kanesa-Thanan N, Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Vaughn DW, Coster TS, Kim-Ahn GJ, Dubois DR, Putnak JR, King A, Summers PL, Innis BL, Eckels KH, Hoke CH Jr. Phase 1 studies of Walter Reed Army Institute of Research candidate attenuated dengue vaccines: selection of safe and immunogenic monovalent vaccines. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69(6): 17-23.

Kasim YA, Anky Tri Rini KE, Sumarmo SP. Hyperventilation in children with Dengue Haemorrhagic Fever (DHF). *Paediatr Indones*. 1991; 31: 245–252.

Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect*. 2005; 38(1): 5-16.

King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, Innis BL. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999; 30(4): 718-28.

King CC, Chao DY, Chien LJ, Chang GJ, Lin TH, Wu YC, Huang JH. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *Virol J*. 2008; 5: 63.

Kularatne SAM, Pathirage MMK, Kumarasiri PVR, Gunasena S Mahindawanse SI. Cardiac complications of a dengue fever outbreak in Sri Lanka, 2005. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101(8): 804-808.

Kularatne SA, Imbulpitiya IV, Abeysekera RA, Waduge RN, Rajapakse RP, Weerakoon KG. Extensive haemorrhagic necrosis of liver is an unpredictable fatal complication in dengue infection: a postmortem study. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 141.

Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36(1): 153-9.

Kuo CH, Tai DI, Chang-Chien CS, Lan CK, Chiou SS, Liaw YF. Liver biochemical tests and dengue fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47(3): 265-70.

Kuruvilla JG, Troyer RM, Devi S, Akkina R. Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology.* 2007; 369(1): 143-52.

Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(8): 2543-7.

Lee CH, Teo C, Low AF. Fulminant dengue myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2009 Aug 21; 136(3): 69-71. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.05.023. Epub 2008 Aug 13.

Legrand N, Ploss A, Balling R, Becker PD, Borsotti C, Brezillon N, Debarry J, de Jong Y, Deng H, Di Santo JP, Eisenbarth S, Eynon E, Flavell RA, Guzman CA, Huntington ND, Kremsdorf D, Manns MP, Manz MG, Mention JJ, Ott M, Rathinam C, Rice CM, Rongvaux A, Stevens S, Spits H, Strick-Marchand H, Takizawa H, van Lent AU, Wang C, Weijer K, Willinger T, Ziegler P. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe.* 2009; 6(1): 5-9.

Li XF, Deng YQ, Zhao H, Ye Q, Wang HJ, Li SH, Zhu SY, Shi PY, Qin ED, Zhang B, Qin CF. Noninvasive bioluminescence imaging of dengue virus infection in the brain of A129 mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(10): 4589-96.

Lima M da R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(7): e738.

Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Limonta D, dos Santos FB. A new approach to dengue fatal cases diagnosis ns1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 May 3; 5(5): e1147.

Limonta D, Falcón V, Torres G, Capó V, Menéndez I, Rosario D, Castellanos Y, Alvarez M, Rodríguez-Roche R, de la Rosa MC, Pavón A, López L, González K, Guillén G, Diaz J, Guzmán MG. Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. *Infection*. 2012; 40(6): 689-94.

Lin YL, Liao CL, Chen LK, Yeh CT, Liu CI, Ma SH, Huang YY, Huang YL, Kao CL, King CC. Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol*. 1998; 72(12): 9729-37.

Lindenbach & Rice, 2001 - Lindenbach Ad, Rice CM. Molecular biology of Flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003; 59: 23-61.

Lindow JC, Durbin AP, Whitehead SS, Pierce KK, Carmolli MP, Kirkpatrick BD. Vaccination of volunteers with low-dose, live-attenuated, dengue viruses leads to serotype-specific immunologic and virologic profiles. *Vaccine*. 2013; 31(33): 3347-52.

Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*. 2005; 280(25): 23698-708. Epub 2005 Apr 26

Lum LC, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54: 256-9.

Mangada MN, Igarashi A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology*. 1998; 244(2): 458-66.

Makino Y, Tadano M, Saito M, Maneekarn N, Sittisombut N, Sirisanthana V, Poneprasert B, Fukunaga T. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol Immunol*. 1994; 38(12): 951-5.

Malik R, Gogna A, Meher J, Singh KK, Sharma SK. Dengue encephalopathy - still an enigma? *Infect Dev Ctries*. 2014; 8(8): 1076-8.

Manoj EM, Ranasinghe G, Ragunathan MK. Successful use of N-acetyl cysteine and activated recombinant factor VII in fulminant hepatic failure and massive bleeding secondary to dengue hemorrhagic fever. *J Emerg Trauma Shock*. 2014; 7(4): 313–315.

Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Marchevsky RS, Mesquita RP, Schatzmayr HG. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol*. 1997; 16(4): 204-8.

Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol*. 1999; 14(3): 183-9.

Matsumoria A, Sasayama S. Immunomodulating agents for the management of heart failure with myocarditis and cardiomyopathy—lesson from animal experiments. *Eur Heart J*. 1995; 16: 140–143.

Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog*. 2008; 4(2): e17.

Mirić M, Misković A, Vasiljević JD, Keserović N, Pesić M. Interferon and thymic hormones in the therapy of human myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1995; 16: 150–152.

Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. Neurological manifestations of dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2006; 244(1-2): 117-22.

Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991 Oct; 29(10): 2107-10.

Morrison J, García-Sastre A. STAT2 signaling and dengue virus infection. *JAKSTAT.* 2014; 3(1): e27715. Epub 2014 Jan 21.

Mota AK, Miranda Filho AL, Saraceni V, Koifman S. Maternal mortality and impact of dengue in Southeast Brazil: an ecological study, 2001-2005. *Cad Saude Publica.* 2012; 28(6): 1057-66.

Mota J, Rico-Hesse R. Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever. *PLoS One.* 2011; 6(6): e20762.

Mukhopadhyay M, Chatterjee N, Maity P, Patar K. Spontaneous splenic rupture: A rare presentation of dengue fever. *Indian J Crit Care Med.* 2014; 18(2): 110-2.

Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* 2013; 5: 299-309.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India.* 2015; 71(1):67-70.

Nagaratnam N, Siripala K, de Silva N. Arbovirus (dengue type) as a cause of acute myocarditis and pericarditis. *Br Heart J.* 1973; 35(2): 204-206.

Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol.* 1997; 148(4): 273-7.

Nishiura H, Halstead SB. Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. *J Infect Dis.* 2007; 195(7): 1007-13.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990; 85(2) :253.

Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86(2): 269.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes *Epidemiol Infect.* 1993 Aug; 111(1): 163-70.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Cunha RV, Zagne SM, Gomes FP, Nicol AF, Coelho JC, Schatzmayr HG. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93(4): 418.

Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(7): 925-6.

Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, de Souza LJ, Guimarães FR, de Araújo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira G Jr, Miagostovich MP. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(9): 1376-81.

Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Chokephaibulkit K, Perng GC. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009; 40(2): 253-62.

Noisakran S, Onlamoon N, Songprakhon P, Hsiao HM, Chokephaibulkit K, Perng GC. Cells in dengue virus infection in vivo. *Adv Virol.* 2010;2010:164878.

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Cardoso JF, Sousa EC Jr, Nunes KN, Rodrigues SG, Abecasis AB, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(11): 1858-64.

Nunes PCG. Epidemias causadas pelo vírus dengue tipo 2 (DENV-2) no Estado do Rio de Janeiro: estudo da viremia após a re-emergência de uma nova linhagem. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz; 2012.

Obeyesekere I, Hermon Y. Myocarditis and cardiomyopathy after arbovirus infections (dengue and chikungunya fever). Br Heart J. 1972; 34(8): 821-827.

Obeyesekere I, Hermon Y. Arbovirus heart disease: myocarditis and cardiomyopathy following dengue and chikungunya fever--a follow-up study. Am Heart J. 1973; 85(2): 186-94.

Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC Jr, Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, Schatzmayr HG, Tanuri A, Ribeiro Nogueira RM. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. Cien Saude Colet. 2010; 15(2): 389-96.

OMS (World Health Organization). 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/index.html>. Acesso em 17/01/2015.

OMS (World Health Organization), 2014. Media Centre/Fact Sheets. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em 04/10/2014

OMS (World Health Organization), 2014 . Global Alert and Response. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>. Acesso em 04/10/2014

OMS (World Health Organization), 2014. Dengue Control. <http://www.who.int/denguecontrol/en/>. Acesso em 04/10/2014

OMS (World Health Organization), 2014 – Media Centre/Fact Sheets – Dengue and severe dengue. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em 04/10/2014

Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1983; 25(1): 53-4.

Paes MV, Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC, Takiya CM, Farias-Filho JC, Schatzmayr HG, Alves AM, Barth OM. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*. 2005; 338(2): 236-46.

Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM, Basílio-de-Oliveira CA, Schatzmayr H, Barth OM, Alves AM. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest*. 2009; 89(10): 1140-51.

Pandey BD, Igarashi A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol*. 2000; 44(3): 179-88.

Parkash O, Almas A, Wasim SM, Hamid JS, Akhtar J, Alishah H. Severity of acute hepatitis and its outcome in patients with dengue fever in a tertiary care hospital Karachi, Pakistan (South Asia). *BMC Gastroenterol*. 2010; 10(43). Published online 2010 May 7.

Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, Vázquez S, Yoksan S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(12): 30-8.

Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11(4): 369-77.

Potisopon S, Priet S, Collet A, Decroly E, Canard B, Selisko B. The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(18):11642-56.

Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*. 2014 Apr 15; 9(4): e83386.

Prestwood TR, Prigozhin DM, Sharar KL, Zellweger RM, Shresta S. A mouse-passaged dengue virus strain with reduced affinity for heparan sulfate causes severe disease in mice by establishing increased systemic viral loads. *J Virol.* 2008; 82(17): 8411-21.

Putnak J, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Hough HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garçon N, Gheysen D, Kanesthasan N, McDonnell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine.* 2005; 23(35): 4442-52.

Raekiansyah M, Pramesyanti A, Bela B, Kosasih H, Ma'roef CN, Tobing SY, Rudiman PI, Alisjahbana B, Endi TP, Green S, Kalayanarooj S, Rothman AL, Sudiro TM. Genetic variations and relationship among dengue virus type 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue disease in Indonesia and Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36(5): 1187-97.

Rajmane Y, Shaikh S, Basha K, Reddy GE, Nair S, Kamath S, Sreejesh G, Rao H, Ramana V, Kumar AS. Infant mouse brain passaged Dengue serotype 2 virus induces non-neurological disease with inflammatory spleen collapse in AG129 mice after splenic adaptation. *Virus Res.* 2013; 173(2): 386-97.

Ramos, 1998 - Ramos C., Sanchez G., Pando R.H., et al. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol* 1998; 4: 465-8.

Raut CG, Deolankar RP, Kolhapure RM, Goverdhan MK. Susceptibility of laboratory-bred rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta Virol.* 1996; 40(3): 143-6.

Rasinha, A da C. Análises morfológicas de tecido cardíaco de camundongos BALB/c com quadro de infecção primária e secundária pelo vírus dengue sorotipos 1, 2 e 3. Monografia [Graduação em Ciências Biomédicas] - Universidade Federal Fluminense; 2013.

Repik PM, Dalrymple JM, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32(3): 577-89.

Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005; 79(8): 4557-67.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* 1985; 229(4715): 726-33

Richardson J, Molina-Cruz A, Salazar MI, Black W 4th. Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(1): 132-41.

Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 1990; 174(2): 479-93.

Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003; 59: 315-41.

Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999; 257(1): 1-6.

Sabchareon A, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Margolis HS, Letson GW. Dengue infection in children in Ratchaburi, Thailand: a cohort study. I. Epidemiology of symptomatic acute dengue infection in children, 2006-2009. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(7): e1732.

Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952 Jan; 1(1): 30-50.

Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, Xhaja K, Schmidt D, Martin KJ, Allen PD, Rodriguez JA, Dinsmore JH, López JR, Bosch I. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29(3): 238-42.

Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LTT, Raengsakulrach B, Loan HT, Day NPJ, Farrar J, Myint KSA, Warrell MJ, James WS, Nisalak A, White NJ. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*. 2000; 355(9209): 1053-1059.

Sariol CA, White LJ. Utility, limitations, and future of non-human primates for dengue research and vaccine development. *Front Immunol*. 2014; 5: 452.

Satarasinghe RL, Ramesh R, Riyaz AA, Gunarathne PA, de Silva AP. Hypothyroidism is a predisposing factor for fenofibrate-induced rhabdomyolysis--patient report and literature review. *Drug Metabol Drug Interact*. 2007; 22(4): 279-283.

Schatzmayer HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81(2):245-6.

Sedhain A, Adhikari S, Regmi S, Chaudhari SK, Shah M, Shrestha B. Fulminant hepatic failure due to dengue. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*. 2011; 9(34): 73-5.

Shersta S, Kyle JL, Beatty PR, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*. 2004; 2: 262-273.

Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol*. 2006; 80(20): 10208-17.

Souza LJ, Coelho JM, Silva EJ, Abukater M, Almeida FC, Fonte AS, Souza LA. Acute hepatitis due to dengue virus in a chronic hepatitis patient. *Braz J Infect Dis*. 2008; 12(5): 456-9.

Sriurairatna S, Bhamarapavati N, Phalavadhtana O. Dengue virus infection of mice: morphology and morphogenesis of dengue type-2 virus in suckling mouse neurones. *Infect Immun.* 1973; 8(6): 1017-28.

Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene.* 1992; 122(2): 281-8.

Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 2012; 366(15): 1423-32.

Sun W, Cunningham D, Wasserman SS, Perry J, Putnak JR, Eckels KH, Vaughn DW, Thomas SJ, Kanesa-Thanan N, Innis BL, Edelman R. Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naive adults. *Hum Vaccin.* 2009; 5(1): 33-40.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2009. Nota Técnica: Situação Epidemiológica. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf
Acessado em 07/11/2014

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, p 231-253, 2010.

SVS. Situação Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525. 2013.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Boletim Epidemiológico - Volume 45 - nº 17 - 2014 - Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 29 de 2014. (<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/04/BE-2014-45--17---Dengue-SE29.pdf>). 2014.

Tan GK, Ng JK, Trasti SL, Schul W, Yip G, Alonso S. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Apr 27; 4(4): e672.

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):938-40.

Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009; 25(1): 7-18.

Theofilopoulos AN, Brandt WE, Russell PK, Dixon FT. Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. *J Immunol.* 1976; 117(3): 953-61.

Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol.* 2004; 78(22): 12647-56.

Thomas SJ, Endy TP. Vaccines for the prevention of dengue: development update. *Hum Vaccin.* 2011; 7(6): 674-84.

Thomas SJ, Eckels KH, Carletti I, De La Barrera R, Dessy F, Fernandez S, Putnak R, Toussaint JF, Sun W, Bauer K, Gibbons RV, Innis BL. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88(1): 73-88.

Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Sep;5(9):e1309.

Tristão-Sá R, Zagne SMO. Classificação da Dengue. In: Souza LJd, editor. *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2008. p. 67-74.

Trung DT, Thao le TT, Hien TT, Hung NT, Vinh NN, Hien PT, Chinh NT, Simmons C, Wills B. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Oct; 83(4): 774-80

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis.* 1997; 176(2): 322-30.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000; 181(1): 2-9.

Varatharaj A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. *Neurol India.* 2010; 58: 585-591.

Veza AC, Rosen L, Repik P, Dalrymple J, Bishop DH. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 29(4): 643-52.

Waterman SH, Margolis H, Sejvar JJ. Surveillance for Dengue and Dengue-Associated Neurologic Syndromes in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 4: 14-16.

Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(4): 523-40.

Weerakoon KG, Kularatne SA, Edussuriya DH, Kodikara SK, Gunatilake LP, Pinto VG, Seneviratne AB, Gunasena S. Histopathological diagnosis of myocarditis in a dengue outbreak in Sri Lanka, 2009. *BMC Res Notes.* 2011; 4: 268.

Wengler G, Gross HJ. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology.* 1978; 89(2): 423-37.

WHO (World Health Organization - US). Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control – New Edition Geneva: World Health Organization; 2009.

WHO (World Health Organization - US) 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases, Pages 140. Geneva

WHO (World Health Organization - US), 2014 - <http://www.who.int/topics/dengue/en/>.
Wilson ME, Chen LH. Dengue: update on epidemiology. *Curr Infect Dis Rep.* 2015; 17(1): 457.

Wong M, Shen E. The utility of liver function tests in dengue. *Ann Acad Med Singapore.* 2008; 37(1): 82-3.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. - *Nat Med.* 2000; 6(7): 816-20.

Yamanaka A, Konishi E. A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.* 2009; 27(28): 3735-43.

Yeh WT, Chen RF, Wang L, Liu JW, Shaio MF, Yang KD. Implications of previous subclinical dengue infection but not virus load in dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 48(1): 84-90.

Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 2008; 319(5871): 1834-7.

Yudhishdran J ,Navinan R, Ratnatilaka A, Jeyalakshmy S. Dengue haemorrhagic fever presenting with cholestatic hepatitis: two case reports and a review of literature. *BMC Res Notes.* 2014; 7: 568.

Zagne SM, Alves VG, Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88(6): 677-9.