

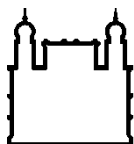
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Estudo do tropismo do vírus dengue tipo 4 em modelo murino
BALB/c: infecção experimental, análises morfológicas e de viremia**

Arthur da Costa Rasinhas

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Arthur da Costa Rasinhas

Estudo do tropismo do vírus dengue tipo 4 em modelo murino BALB/c: infecção experimental, análises morfológicas e de viremia

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

Orientador: Dr^a Flávia Barreto dos Santos

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2017

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

R224 Rasinhas, Arthur da Costa

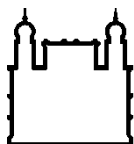
Estudo do tropismo do vírus dengue tipo 4 em modelo murinho BALB/c: infecção experimental, análises morfológicas e de viremia / Arthur da Costa Rasinhas. – Rio de Janeiro, 2017.
xviii, 88 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Bibliografia: f. 84-106

1. Vírus dengue sorotipo 4. 2. Modelo animal. 3. Linhagem BALB/c. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ARTHUR DA COSTA RASINHAS

Estudo do tropismo do vírus dengue tipo 4 em modelo murino BALB/c: infecção experimental, análises morfológicas e de viremia

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia Barreto dos Santos

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dr. Marcelo Pelajo Machado – Presidente (IOC/Fiocruz)

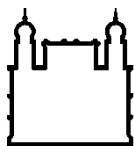
Dr^a. Marcia Attias (UFRJ)

Dr. Eduardo de Mello Volotão (IOC/Fiocruz)

Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (IOC/Fiocruz)

Dr^a. Silvia Maria Baeta Cavalcanti (UFF)

Rio de Janeiro, de de 20



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

"I became insane, with long intervals of horrible sanity"

Edgar Allan Poe

AGRADECIMENTOS

À toda equipe do programa de pós-graduação em biologia parasitária, IOC, 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 orientadora, Dr^a. Flávia Barreto dos Santos que me ajudou com sua calma infundável a manter minha sanidade durante as intempéries e turbulências destes dois anos;

À minha co-orientadora Dr^a. Débora Ferreira Barreto-Vieira, que me aceitou como aluno de iniciação científica durante momentos tempestuosos da minha graduação e me ajudou a descobrir nova paixão pela microscopia eletrônica de transmissão;

À Dr^a. Ortrud Monika Barth, pelos diversos ensinamentos e pela experiência transmitida não somente durante a execução deste trabalho como desde os tempos de iniciação científica;

À toda equipe do Laboratório de Morfologia e Morfogenese Viral, pelo constante apoio e infinita paciência durante o período de experimentação animal, processamento do material e análise dos resultados;

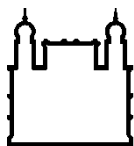
À doutoranda Priscila Conrado Guerra Nunes por toda a ajuda na realização das análises moleculares;

Ao técnico José da Costa Farias-Filho, pelo imenso auxílio com a produção da massa viral e cultura de células;

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado pelo auxílio com as análises histopatológicas e ao técnico Igor José da Silva, pelo apoio durante o processamento das amostras;

À toda equipe da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, pelo suporte e paciência durante a captura das imagens apresentadas neste trabalho;

Aos meus familiares e a todos que de algum jeito contribuíram com a conclusão deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

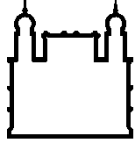
Estudo do tropismo do vírus dengue tipo 4 em modelo murino BALB/c: infecção experimental, análises morfológicas e de viremia

Resumo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Arthur da Costa Rasinhas

Desde sua introdução no território brasileiro, no ano de 1981, o DENV-4 permaneceu ausente do cenário epidemiológico nacional por quase 25 anos, até sua reintrodução em 2010. Esse evento marca a cocirculação dos 4 sorotipos conhecidos no Brasil e embora os mecanismos por trás da patogênese do vírus ainda não sejam completamente compreendidos, a interação entre anticorpos oriundos de infecções heterotípicas é um fator essencial para a evolução de quadros brandos de DEN em quadros hemorrágicos e de choque. A dificuldade no estudo da interação do vírus com o hospedeiro se deve principalmente à ausência de um modelo animal experimental que reproduza adequadamente a infecção por DENV como observada em casos humanos. Modelos atuais fazem uso de animais imunodeficientes, vias de inoculação invasivas e inóculos virais neuroadaptados, condições que não apenas dificultam a compreensão da patogênese como também impossibilitam a utilização de tais modelos para testes de candidatos a vacinas e fármacos. O presente estudo tem como objetivo analisar o potencial tropismo do DENV-4 por fígado, pulmão e coração de camundongos da linhagem BALB/c e avaliar as alterações morfológicas e ultraestruturais geradas pelo vírus nestes órgãos. Para tal, camundongos da linhagem imunocompetente BALB/c foram inoculados por via intravenosa com doses não neuroadaptadas de DENV-4 isolado de caso humano. Alterações observadas nos tecidos estudados apresentaram perfil semelhante ao caracterizado em casos humanos de DEN, e a detecção do vírus nos tecidos revelou a susceptibilidade do modelo ao sorotipo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo do tropismo do vírus dengue tipo 4 em modelo murino BALB/c: infecção experimental, análises morfológicas e de viremia

Abstract

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Arthur da Costa Rasinhas

Ever since its introduction in the Brazilian territory, in 1981, DENV-4 has remained absent from the national epidemiological scene for almost 25 years, until its reintroduction in 2010. This event marks the cocirculation of the 4 known serotypes in Brazil, and although the mechanisms behind the virus' pathogenesis are not yet fully understood, the interaction between antibodies originated from heterotypical infections is an essential factor for the evolution of mild DEN cases into hemorrhagic and shock cases. The difficulty in studying the interaction between virus and host is mainly due to the absence of an experimental animal model that adequately replicates the DENV infection as observed in humans. Current models utilize immunodeficient animals, invasive inoculation routes, and neuroadapted viral inocula, conditions that not only hamper the comprehension of the pathogenesis but also prevent the use of such models for testing vaccine and drug candidates. The present study aims to analyze the potential tropism of DENV-4 for hepatic, pulmonary and cardiac tissue and evaluate the morphological and ultrastructural alterations caused by the virus in said tissues. To achieve this goal, immunocompetent mice of the BALB/c line were inoculated via intravenous route with non neuroadapted doses of DENV-4 isolated from human case. Alterations observed in the analyzed tissue presented similar profile to that shown in human cases of DEN, and the detection of the virus within the tissue show the susceptibility of the model to the serotype.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS E QUADROS	XVI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XVII
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Epidemiologia	19
1.1.1 Dengue no Mundo	19
1.1.2 Dengue no Brasil	21
1.2 O vírus	23
1.3 Genoma	23
1.4 Replicação	24
1.5 Manifestações e classificação de casos de dengue	26
1.6 Patogênese	28
1.7 Patologia	29
1.8 Modelo Experimental para estudos de infecção por DENV	30
1.8.1 Primatas não humanos (PNH)	31
1.8.2 Modelos murinos imunodeficientes humanizados	31
1.8.3 Modelos murinos imuno/interferon-deficientes	31
1.8.4 Modelos murinos imunocompetentes	32
1.8.5 BALB/c	33
1.9 Vacinas	35
1.9.1 Vacina de DNA	35
1.9.2 Vacina inativada	38
1.9.3 Vacina de subunidade	38

1.9.4	Vacina atenuada	38
1.9.5	Vacina X Modelo murino BALB/c	38
1.10	Justificativa.....	39
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo Geral.....	40
2.2	Objetivos Específicos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Considerações Éticas	40
3.2	Cepa Viral.....	41
3.3	Produção de Massa Viral	41
3.4	Experimentação animal	41
3.5	Desenho Experimental.....	41
3.6	Controle de temperatura.....	43
3.7	Infecção experimental.....	43
3.8	Coleta de Saliva	43
3.9	Eutanásia e coleta de órgãos	43
3.10	Fixação por perfusão	44
3.11	Acondicionamento de tecidos para análises moleculares	44
3.12	Acondicionamento e processamento de amostras para análises em microscópio fotônico de campo claro.....	44
3.13	Acondicionamento e processamento de amostras para análise em microscópio eletrônico de transmissão.....	45
3.14	Obtenção de secções semifinas e ultrafinas	46
3.15	Contrastação positiva	46
3.16	Extração de ácidos nucleicos	47
3.17	RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Análise de temperatura corporal.....	48
4.2	Análise molecular de tecidos e saliva de camundongo BALB/c infectado experimentalmente com DENV-4 por qRT-PCR	52
4.3	Análise histopatológica de tecidos de camundongo BALB/c infectados experimentalmente com DENV-4.....	54

4.3.1	Análise histopatológica de tecido hepático	54
4.3.2	Análise histopatológica de tecido pulmonar.....	57
4.2.1	Análise histopatológica de tecido cardíaco	60
4.4	Análise ultraestrutural de tecidos de camundongo BALB/c infectado experimentalmente com DENV-4	63
4.4.1	Análise ultraestrutural de tecido hepático	63
4.4.2	Análise ultraestrutural de tecido pulmonar.....	67
4.4.1	Análise ultraestrutural de tecido cardíaco	71
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	82
7	PERSPECTIVAS	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global do risco de infecção por DENV no mundo	21
Figura 2: Esquema da partícula do DENV, micrografia eletrônica apresentando partículas de DENV	23
Figura 3: Representação estrutural do genoma do DENV	24
Figura 4: Esquema da replicação dos Flavivírus	26
Figura 5: Fluxograma da classificação de casos de DEN de acordo com a OMS	27
Figura 6: Esquema estrutural do desenho experimental do estudo	42
Figura 7: Gráfico dos valores da temperatura dos camundongos do grupo 1	49
Figura 8: Gráfico dos valores da temperatura dos camundongos do grupo 2	50
Figura 9: Gráfico dos valores da temperatura dos camundongos do grupo 3	51
Figura 10: Corte histológico de fígado de camundongo BALB/c controle negativo, sem apresentação de alterações morfológicas	54
Figura 11: Corte histológico de fígado de camundongo BALB/c infectado, apresentando congestão portal	55
Figura 12: Corte histológico de fígado de camundongo BALB/c infectado, apresentando áreas de infiltrado inflamatório	56
Figura 13: Corte histológico de fígado de camundongo BALB/c infectado, apresentando líquido contido no capilar e eritrócitos no interstício	56

- Figura 14:** Corte histológico de pulmão de camundongo BALB/c controle 57
negativo, sem apresentação de alterações morfológicas
- Figura 15:** Corte histológico de pulmão de camundongo BALB/c infectado, 58
apresentando áreas de hemorragia e espessamento do septo interalveolar
- Figura 16:** Corte histológico de pulmão de camundongo BALB/c infectado, 59
apresentando áreas de hemorragia
- Figura 17:** Corte histológico de coração de camundongo BALB/c controle 60
negativo, sem apresentação de alterações morfológicas
- Figura 18:** Corte histológico de coração de camundongo BALB/c infectado, 61
apresentando áreas de hemorragia
- Figura 19:** Corte histológico de coração de camundongo BALB/c infectado, 62
apresentado infiltrado inflamatório
- Figura 20:** Micrografia eletrônica de fígado de camundongo BALB/c controle 63
negativo, sem apresentação de alterações ultraestruturais
- Figura 21:** Micrografia eletrônica de fígado de camundongo BALB/c infectado, 64
apresentando células inflamatórias mononucleadas ativadas no capilar
- Figura 22:** Micrografia eletrônica de fígado de camundongo BALB/c infectado, 65
apresentando células inflamatórias mononucleadas ativadas e plaquetas no
capilar
- Figura 23:** Micrografia eletrônica de fígado de camundongo BALB/c infectado, 66
apresentando plaquetas e célula inflamatória polimorfonucleada no capilar
- Figura 24:** Micrografia eletrônica de fígado de camundongo BALB/c infectado, 66
apresentando congestão vascular e necrose de hepatócito

- Figura 25:** Micrografia eletrônica de pulmão de camundongo BALB/c controle 67
negativo, sem apresentação de alterações ultraestruturais
- Figura 26:** Micrografia eletrônica de pulmão de camundongo BALB/c infectado, 68
apresentando células inflamatórias e plaqueta no capilar
- Figura 27:** Micrografia eletrônica de pulmão de camundongo BALB/c infectado, 69
apresentando células inflamatórias no capilar e alvéolo e plaquetas no capilar
- Figura 28:** Micrografia eletrônica de pulmão de camundongo BALB/c infectado, 70
apresentando células inflamatórias mononucleadas e plaquetas no capilar
- Figura 29:** Micrografia eletrônica de coração de camundongo BALB/c controle 71
negativo, sem apresentação de alterações ultraestruturais
- Figura 30:** Micrografia eletrônica de coração de camundongo BALB/c 72
infectado, apresentando partículas semelhantes a DENV em fibras cardíacas
- Figura 31:** Micrografia eletrônica de coração de camundongo BALB/c 73
infectado, apresentando plaquetas no interstício e no capilar e célula
inflamatória ativada
- Figura 32:** Micrografia eletrônica de coração de camundongo BALB/c 74
infectado, apresentando células inflamatórias mononucleadas e plaquetas no
interstício
- Figura 33:** Micrografia eletrônica de coração de camundongo BALB/c 74
infectado, apresentando alterações na morfologia dos discos intercalares

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Parâmetros de termociclagem para a reação de qRT-PCR	48
Quadro 2: Análise qualitativa da detecção do vRNA nos diversos tecidos e saliva de camundongos BALB/c	52
Quadro 3: Análise quantitativa da detecção do vRNA nos diversos tecidos e saliva de camundongos BALB/c	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	amplicação imune dependente de anticorpo
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Ae. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
CD	célula dendrítica
CDC	do inglês, centers for disease control
CE	célula endotelial
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
CEUA	Comitê de Ética para a Utilização de Animais de Laboratório
Células NK	célula natural killer
CL	célula de Langerhans
DC-SIGN	do inglês, dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DEN	Dengue
DENV	vírus dengue
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FHD	febre hemorrágica do dengue
GSK	GlaxoSmithKline
IC	via de inoculação intracraniana
IFN- α/β	interferon alfa/beta
IFN- γ	interferon gama
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
IP	via de inoculação intraperitoneal
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IV	via de inoculação intravenosa
Kb	kilobases
LMMV	Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral

L-SIGN	do inglês, liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin
Mo	leucócito do tipo monócito
MΦ	macrófago
OMS	Organização Mundial de Saúde
h.p.i	horas pós infecção
PNH	primatas não humanos
PSD	partículas semelhantes ao vírus dengue
RE	retículo endoplasmático
qRT-PCR	reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real
RT-PCR	reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SC	via de inoculação subcutânea
SCD	síndrome do choque por dengue
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
vRNA	RNA viral

1 Introdução

Os vírus dengue (DENV) são arbovírus pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, sendo divididos em quatro sorotipos antigenicamente distintos: vírus dengue 1 (DENV-1), DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Reiner et al., 2016; WHO, 2016).

A infecção por um sorotipo garante imunidade homotípica duradoura e imunidade heterotípica de curta duração (Guzman et al., 2010). O vírus é transmitido pela picada do mosquito do gênero *Aedes*, mais especificamente *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) e *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) e a infecção resulta na doença conhecida como dengue (DEN) (San Martín et al., 2010). Além da DEN, mosquitos do gênero *Aedes* são notórios por transmitirem outras arboviroses, como chikungunya, febre amarela e zika (Zara et al., 2016).

A DEN é uma doença emergente em muitas partes do mundo, prevalecendo em áreas urbanas pobres, subúrbios e regiões rurais, embora possa também ser identificada em áreas mais ricas em países tropicais e subtropicais. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que, anualmente, cerca de 100 milhões de infecções ocorram nos mais de 100 países nos quais a DEN é endêmica, entretanto, outras fontes sugerem que este número esteja mais próximo de 390 milhões de infecções ao ano em todo o mundo, quase quatro vezes mais do que o número sugerido pela OMS (Bhatt et al., 2013). Segundo o “Centers for Disease Control” (CDC) cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde há risco de transmissão de DEN (CDC, 2014).

1.1 Epidemiologia

1.1.1 Dengue no Mundo

Os primeiros relatos de uma doença com características semelhantes à DEN ocorreram em três continentes (Ásia, África e América do Norte) em 1779 e 1780. Entretanto, existem relatos de uma doença que se enquadre neste perfil em enciclopédias médicas chinesas datadas da dinastia Jin (265 a 420 dC). Outra doença desconhecida, responsável por surtos no Caribe, em 1635 e no Panamá, em 1699, pode ser associada ao DENV (Gubler, 2006).

A entrada dos seres humanos nas florestas e o surgimento de assentamentos provavelmente induziu a migração do DENV para o ambiente rural, onde até hoje é transmitido a humanos por mosquitos peridomésticos, como *Ae. albopictus*. Outro

fator decisivo para a disseminação da doença foi o tráfico de escravos entre a África e as Américas, o que levou a introdução do mosquito africano *Ae. aegypti*, no Novo Mundo no século XVII. O mosquito rapidamente se instalou nos centros urbanos, se revelando um excelente vetor para a DEN e a febre amarela (Gubler, 2006).

A primeira transmissão de DENV por *Ae. aegypti* foi descrita por Bancroft, em 1906, e confirmada por Siler e Simmons, que, em 1926 e em 1931, estabeleceram o período de incubação em mosquitos por meio da transmissão do vírus a voluntários humanos. Em 1944, Sabin e Schlesinger isolaram o vírus em camundongos pela primeira vez, e definiram a existência de mais de um sorotipo por estudos de imunidade cruzada em voluntários humanos (Lindenbach et al., 2013).

Uma doença apresentando quadro clínico à síndrome do choque por dengue (SCD) foi relatado na Austrália, em 1897, na cidade de Charters Towers, onde, poucos anos antes, a corrida do ouro e o plantio de cana de açúcar, e o conseqüente surgimento rápido de novos centros urbanos permitiu que o mosquito *Ae. Aegypti* rapidamente se multiplicasse e se estabelecesse no continente australiano (Halstead, 1992).

Já no século XX, a Segunda Guerra Mundial foi um fator determinante para a dispersão da doença. Durante os primeiros momentos do conflito, a movimentação de combatentes do sudeste asiático permitiu a dispersão dos diferentes sorotipos do DENV para locais como o Japão e as ilhas do oceano Pacífico. Atualmente pouco se sabe sobre a dispersão dos sorotipos do vírus em momentos anteriores à Segunda Guerra Mundial, mas não há dúvidas de que as conseqüências trazidas pela guerra tiveram um grande impacto sobre o crescimento da densidade populacional e da área ocupada por *Ae. aegypti*, assim como a transmissão endêmica de todos os quatro sorotipos do DENV nas regiões tropicais do continente asiático. Em 1990, o DENV já havia se espalhado para o norte da China, para o sul da Austrália e para quase todas as ilhas do Pacífico.

Na África e no Oriente Médio, áreas de epidemia incluem o Quênia, Moçambique, Somália e Iémen. No continente americano, em meio a tentativas mal e bem sucedidas de erradicação do vetor, o vírus foi (re)introduzido em diversos países, como Cuba, México, Estados Unidos, Colômbia, Equador, Peru, Paraguai, Bolívia, Argentina, Brasil, várias ilhas caribenhas e maior parte da América Central, (Halstead, 1992; Gubler e Clark, 1995).

Atualmente a distribuição do DENV atingiu uma escala pandêmica, fato este devido principalmente à globalização, à urbanização e à estratégias ineficazes de controle vetorial (Simmons et al., 2012; Murray et al., 2013) (Figura 1).

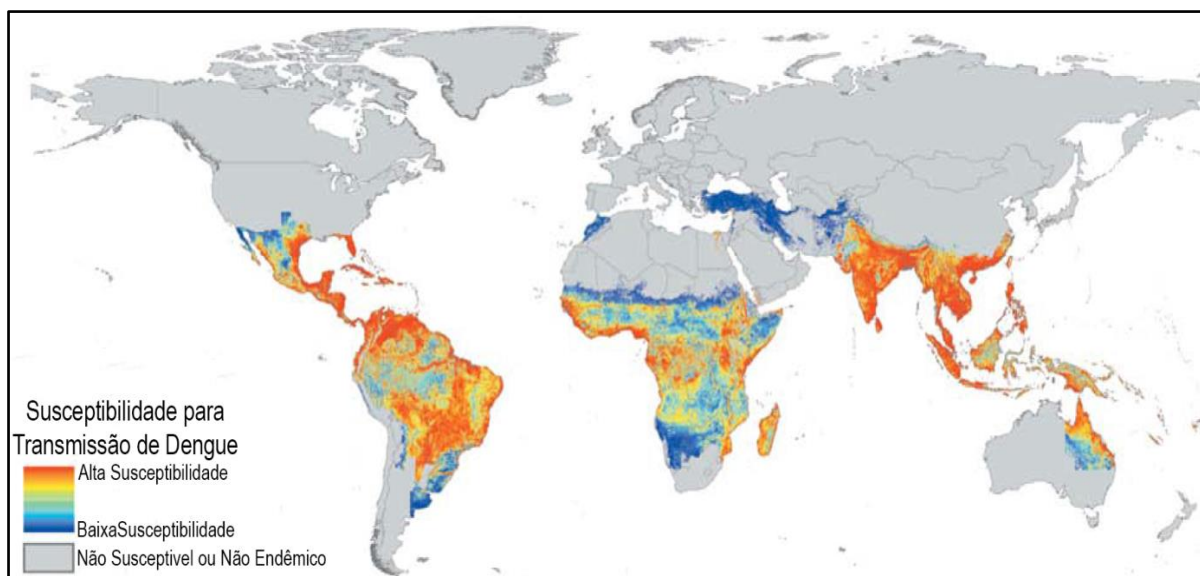


Figura 1: Distribuição global do risco de infecção por DENV (modificado de Simmons et al., 2012).

1.1.2 Dengue no Brasil

A presença do DENV no Brasil pode ser observada ainda no século XIX, quando, no estado do Rio de Janeiro, foram descritas epidemias nos anos de 1846, 1847 e 1848, na cidade do Rio de Janeiro, em 1886, no município de Valença, e em 1922-23, em Niterói. Três campanhas de erradicação foram introduzidas, que, embora objetivando o controle da febre amarela, resultaram também na eliminação do DENV. Por décadas o Brasil esteve livre do vírus, entretanto a relutância de alguns países, como os Estados Unidos, a Venezuela, e algumas ilhas do Caribe em participar das campanhas de erradicação, resultou na continuidade da circulação do DENV na região da América Central. Eventualmente, com o abandono dos programas de erradicação, o vetor voltou a expandir sua área de influência, retornando à América do Sul ao longo do tempo (Schatzmayr e Cabral, 2012). Segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), atualmente o Brasil é responsável por 85% dos casos de DEN no continente sul americano, sendo também o país com o maior índice de incidência da doença (PAHO, 2016).

O DENV voltou a ser detectado no território brasileiro em 1981-82, quando os sorotipos 1 e 4 foram responsáveis por um surto na cidade de Boa Vista, Roraima.

Programas locais de controle de vetor obtiveram sucesso na contenção do surto (Osana et al., 1983), e nos quatro anos seguintes não foi detectada atividade do DENV no Brasil. Em 1986, o vírus se tornou novamente um problema de saúde pública, quando o DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, no município de Nova Iguaçu, tendo sido isolado no mesmo ano (Schatzmayer et al., 1986; Nogueira et al., 1988).

Após a introdução do DENV-1 em 1986, seguido por anos de baixa circulação, o sorotipo 1 reapareceu em 2009, e em 2010 foi responsável pela epidemia com o maior número de notificações no país (~1,3 milhões de casos) até então (dos Santos et al., 2011).

A introdução do sorotipo DENV-2 no Brasil se deu em 1990, e o vírus foi isolado pela primeira vez na cidade de Niterói, no estado do Rio de Janeiro (Nogueira et al., 1990; Nogueira et al., 1991), desencadeando nova epidemia e sendo responsável pelos primeiros casos de dengue grave (Lenzi e Coura, 2004). Em 2007, a reemergência do DENV-2 causou, no ano de 2008, a mais grave epidemia registrada no país até então (SVS/MS, 2008).

Em 2000, o DENV-3 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, e seu isolamento se deu a partir do soro de um paciente residente do município de Nova Iguaçu, que apresentava sinais e sintomas clássicos, (Miagostovich et al., 2006; Nogueira et al., 2007). O sorotipo foi responsável por uma grave epidemia, sendo notificados mais de 160.000 casos em menos de 3 meses (Lenzi e Coura, 2004).

O DENV-4, apesar de ter sido detectado pela primeira vez no território brasileiro em 1981-82, no norte do país, sua reintrodução ocorreria apenas muitos anos mais tarde, em 2010, quando ressurgiu, novamente no estado de Roraima, e foi isolado pela primeira vez em Niterói, em março de 2011 (Nogueira e Eppinghaus, 2011). Após sua reintrodução, nos anos de 2011 e 2012 o DENV-4 foi responsável por epidemias na maioria dos estados brasileiros (SVS/MS, 2012). A detecção do DENV-4 marcou a circulação simultânea dos 4 sorotipos no território brasileiro.

Em 2015, foram registrados no país 1.479.950 casos de DEN, 1.481 casos de dengue grave, 19.449 casos de dengue com sinais de alerta e 814 óbitos. Em 2016, até a semana epidemiológica 49 foram registrados 1.487.673 casos de DEN em todo o país, 826 casos de dengue grave, 8.116 casos de dengue com sinais de alerta, e 609 óbitos (SVS/MS, 2015; 2016).

1.2 Vírus

Os DENV são partículas esféricas, com diâmetro variando de 40-60nm, e apresentando envelope lipídico e nucleocapsídeo icosaédrico, que mede cerca de 30nm de diâmetro (Figura 2a) (Barth, 2010). Em micrografias eletrônicas o vírus pode ser observado como uma partícula esférica de superfície finamente granulada, apresentando nucleocapsídeo eletrondenso (Figura 2b) (Kuhn et al., 2002; Lindenbach et al., 2003; Barth, 2010; Lindenbach et al., 2013).

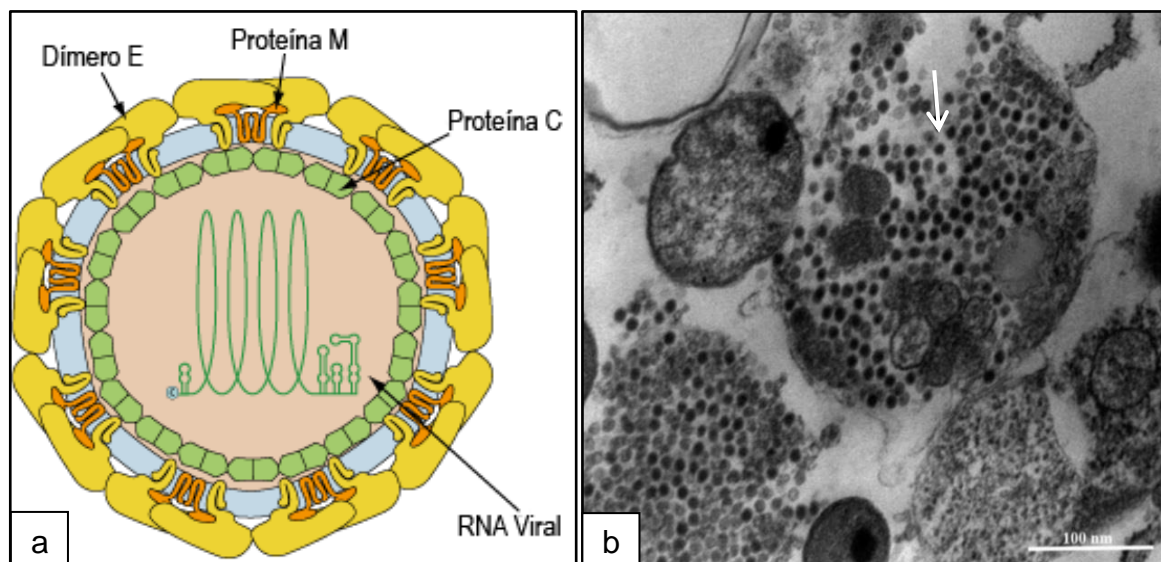


Figura 2: (a) Esquema da partícula do DENV, discriminando suas proteínas estruturais e seu genoma (modificado de ViralZone, 2016); (b) Partículas de DENV (seta) no interior de células de mosquito *Ae. albopictus* (C6/36) infectadas (Barreto-Vieira e Barth, 2015).

1.3 Genoma

Os DENV possuem um genoma constituído por uma fita simples de RNA polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases (kb) de comprimento. O genoma codifica três proteínas estruturais, a do nucleocapsídeo (C), e duas inseridas no envelope viral, a proteína da membrana (M) e a proteína do envelope (E), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Guzman et al., 2010; de Araújo et al., 2012) (Figura 3).

A expressão das proteínas NS é fundamental para a manutenção dos mecanismos de replicação e patogênese do DENV (Wan et al., 2013), sendo estas capazes de induzir modificações no retículo endoplasmático (RE) do hospedeiro, onde a replicação viral ocorre (Tarantino et al., 2016).

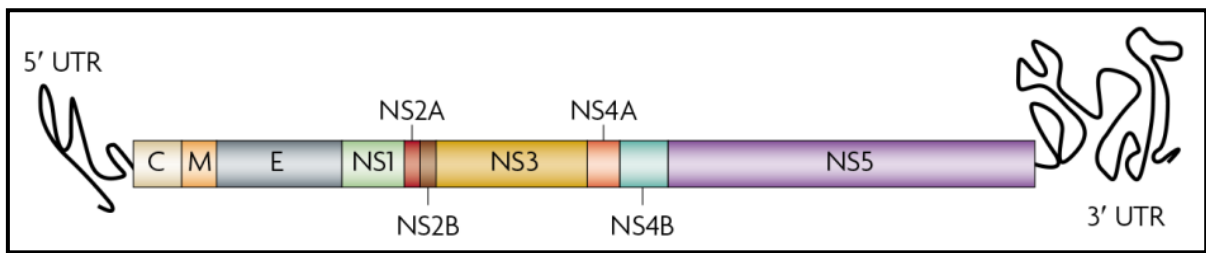


Figura 3: Representação estrutural do genoma do DENV, discriminando as proteínas estruturais C, M e E, proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 e regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3' (Guzman et al., 2010).

1.4 Replicação

O DENV é capaz de se replicar em um amplo espectro de tipos celulares, incluindo monócitos (Mo), macrófagos (MΦ) e células dendríticas (CD), além de linfócitos e células endoteliais (CE) (Libraty et al., 2001; Marovich et al., 2001; Gulati et al., 2007; Balsitis et al., 2009; Nielsen, 2009; Salgado et al., 2010; Schmid et al., 2014; Simmons et al., 2015). Antígenos virais já foram detectados em tecido hepático, esplênico, pulmonar e renal, além de linfonodos, timo e pele (Jessie et al., 2004). Acredita-se que CD apresentem um papel essencial na disseminação do DENV pelo organismo, pois é geralmente o primeiro tipo celular a entrar em contato com o vírus após a inoculação (Morrison et al., 2012; Zubair et al., 2016).

A replicação dos flavivírus tem início com a interação entre o vírion e a célula hospedeira, resultando na fusão do envelope viral à membrana da célula, e culminando em sua endocitose (Figura 4). A entrada do DENV na célula hospedeira ocorre através de endocitose mediada por receptor. Os possíveis candidatos a tal receptor abrangem receptores de manose, receptores Fc-γ, receptores de vitamina D e receptores “Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin” (DC-SIGN) (Dejnirattisai et al., 2011; Prada-Arismendy et al., 2012; Bäck et al., 2013; Lindenbach et al., 2013).

A proteína E possui um papel essencial no reconhecimento antigênico do vírus e no processo de ligação e fusão à membrana da célula hospedeira. Uma vez ocorrida a endocitose, o vírus sofre diversas mudanças conformacionais irreversíveis, mediadas pelo baixo pH do endossomo. Alterações na estrutura da proteína E resultam na fusão do envelope do vírus à membrana endossomal e na liberação do nucleocapsídeo no meio intracelular (Lindenbach et al., 2013; Zhang et al., 2015; Valadão et al., 2016).

Uma vez no meio intracelular, o nucleocapsídeo libera o RNA viral (vRNA) no citoplasma, que é identificado pela célula hospedeira como RNA mensageiro, e traduzido em uma única poliproteína. Esta poliproteína é direcionada às membranas do RE, onde é processada por proteases do hospedeiro e do vírus, para formar as proteínas estruturais e não estruturais. A infecção da célula pelo vírus desencadeia diversas alterações na configuração citoplasmática e as membranas do RE apresentam um papel essencial na replicação do vírus. A morfogênese viral ocorre no interior do RE, e as partículas virais imaturas, formadas por nucleocapsídeo e vRNA, emergem da sua membrana como formas não infecciosas (Lindenbach et al., 2003; Barth, 2010; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Apte-Sengupta et al., 2014).

A maturação da partícula viral ocorre durante a sua passagem pela via exocítica, no complexo de Golgi. O baixo pH da rede trans Golgi desencadeia uma alteração conformacional nas proteínas do envelope, o que permite que a protease furina presente no meio intracelular realize a clivagem da proteína prM (proteína precursora da proteína de membrana M) no peptídeo pr e na proteína M (Zybert et al., 2008; Lindenbach et al., 2013). O peptídeo pr atua como um inibidor da exocitose prematura da partícula viral, e permanece ligado ao envelope do vírus até o momento da sua saída da célula. O processamento de prM e a liberação de pr são eventos essenciais para a garantia da infectividade do vírus (Pierson e Kliegan, 2013).

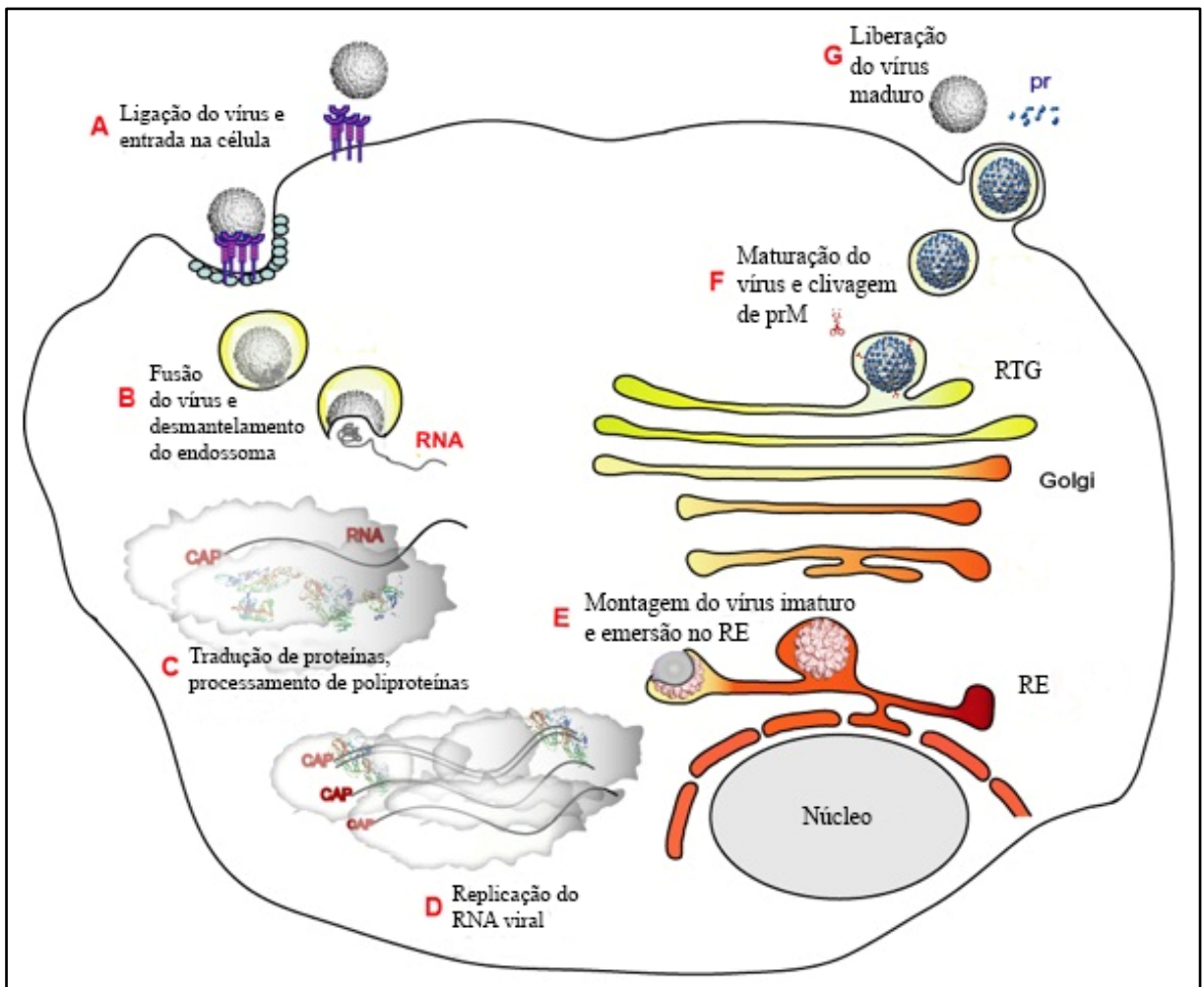


Figura 4: Esquema demonstrando a replicação de um Flavivírus no interior da célula hospedeira (modificado de Richard J Kuhn Lab, 2016). **RE:** Retículo endoplasmático; **RTG:** Rede trans Golgi; **pr:** Peptídeo pr.

1.5 Manifestações e classificação de casos de dengue

Caracterizada por seu amplo espectro de manifestações clínicas, a DEN pode apresentar uma evolução imprevisível. Tais manifestações podem variar desde febre branda, auto limitada, com recuperação espontânea a um quadro muito severo de extravasamento de plasma, concomitante a um quadro de hemorragia.

A grande maioria das infecções pelos DENV permanece assintomática ao longo do curso da doença, sem a apresentação de sinais clínicos notáveis (Burke et al., 1988; Cardoso, 1998). Quando presentes, tais manifestações apresentam-se após um período de incubação de 3-15 dias (Bäck et al., 2013) e podem englobar sintomas brandos, normalmente febre aguda, possivelmente acompanhada de cefaléia, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, leucopenia e trombocitopenia branda. Em casos raros, podem emergir sintomas mais severos, como extravasamento de plasma, quadros

trombocitopênicos graves (<100.000 plaquetas/m³), hemorragias espontâneas na pele e em outros órgãos (melena, epistaxe), dor abdominal, hipotensão e choque.

A necessidade de uma caracterização adequada dos casos, de modo a permitir a triagem apropriada de pacientes e um tratamento eficaz, fez com que a OMS, em 2009, reformulasse a escala de classificação da DEN (Figura 5).

Casos de DEN são atualmente caracterizados como dengue sem sinais de alerta – caracterizada por apresentar, além de febre, até dois sintomas brandos, entre náusea, vômito, erupção cutânea, dor localizada, teste do torniquete positivo e leucopenia – e dengue com sinais de alerta – com sinais que incluem dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluidos, sangramento de mucosas, letargia ou inquietação, aumento do fígado e diminuição da contagem de plaquetas – ambos podendo progredir para um quadro mais severo classificado como dengue grave, caracterizado por severo extravasamento de plasma (que pode evoluir para um quadro de choque), hemorragia intensa e falência de órgãos (WHO, 2009).

A nova escala de classificação foi reavaliada pela OMS em 2012, sendo utilizada em diversos países para diagnóstico de quadros de DEN (WHO, 2012).

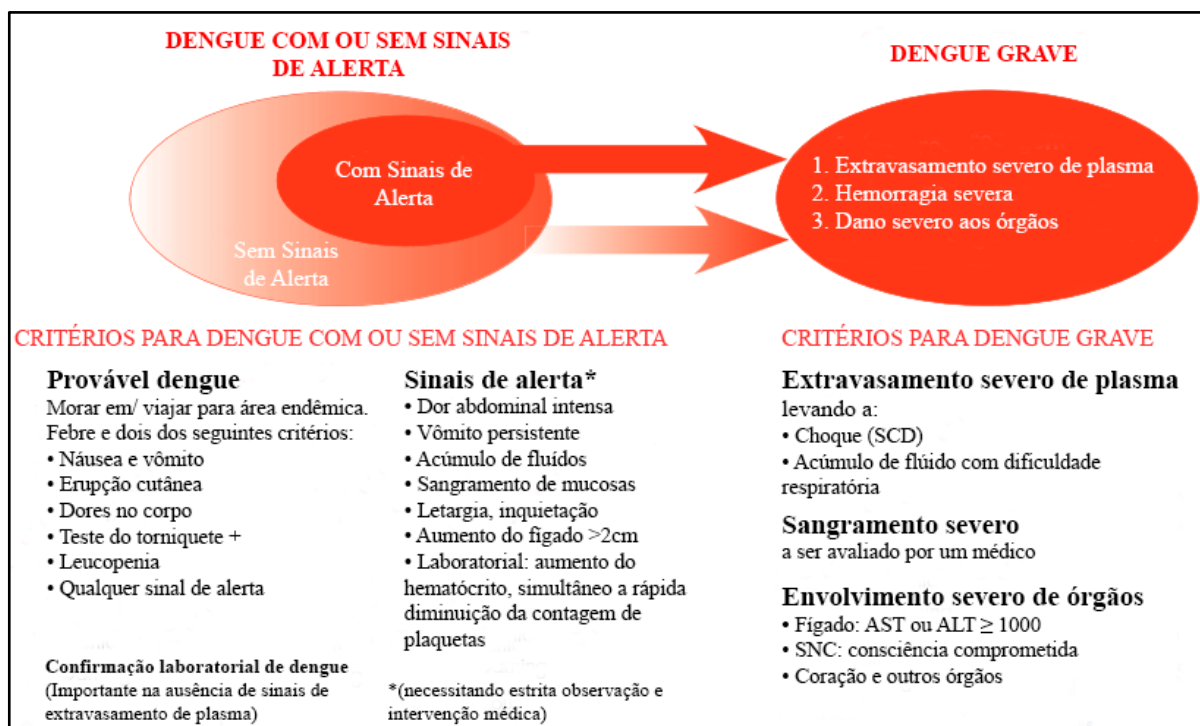


Figura 5: Fluxograma da classificação da dengue sugerida pela OMS em 2009 (modificado de WHO, 2009). **SCD:** Síndrome do choque por dengue, **AST:** Aspartato aminotransferase; **ALT:** Alanina aminotransferase.

1.6 Patogênese

Durante a década de 1960, foi identificada no sudeste asiático uma síndrome febril aguda sistêmica grave, responsável pela morte de diversas crianças. O quadro clínico foi rapidamente associado ao DENV e denominado febre hemorrágica do dengue (FHD), sendo atualmente classificado como dengue grave. Desde então, diversas teorias vem sendo formuladas, tentando explicar os mecanismos por trás dos casos mais graves de DEN (Halstead, 2015; Halstead e Cohen, 2015).

Atualmente, duas hipóteses são mais comumente aceitas, uma delas sugerindo a associação de casos severos de infecções por DENV ao grau de virulência de cepas distintas. Diferentes graus de virulência em cepas de DENV-2 foram reportados na década de 1980, na África, Vietnã e Malásia, e durante a década de 1990, a origem evolucionária destas cepas foi devidamente traçada e suas distinções genéticas confirmadas (Rico-Hesse, 1990; Rico-Hesse et al., 1997; Rico-Hesse, 2003).

Outra hipótese sugere que a gravidade da infecção por DENV está ligada à pré-existência de anticorpos heterotípicos gerados por uma infecção primária por DENV, quadro denominado amplificação dependente de anticorpo (ADE) (Halstead et al., 1973, Halstead e O'Rourke, 1977). A presença destes anticorpos não neutralizantes durante uma infecção secundária heterotípica permite que o DENV se ligue com facilidade a receptores Fcγ de Mo e MΦ, resultando na produção de uma carga viral muito mais elevada. Ademais, a reação cruzada de linfócitos T de memória gerados por uma infecção posterior por DENV pode culminar na super ativação de vias pró-inflamatórias (Williams et al., 2009; Schmid et al., 2014; Yacoub et al., 2016) e no aumento da ativação de Mo (Oliveira et al., 2016). Outros fatores importantes em casos de ADE são a aquisição passiva de anticorpos *in utero* (Kliks et al., 1989) e a transmissão vertical da doença, que podem levar ao agravamento de casos de DEN em crianças, devido à reatividade cruzada (Jain e Chatuverdi, 2010). É importante ressaltar que, enquanto infecções secundárias por sorotipo heterólogo são normalmente associadas a dengue grave, infecções primárias por DENV também podem evoluir para a forma mais severa da doença (Kurane, 2007).

De um modo geral, os mecanismos associados à patogênese do DENV ainda não são totalmente compreendidos. Isso se deve principalmente à inexistência de um modelo animal que reproduza adequadamente a infecção como ocorre em pacientes humanos (Thein et al., 1997; Simmons et al., 2012; Mawson, 2013; Zubair et al., 2016).

Devido à presença de quadros hemorrágicos e de extravasamento plasmático em infecções por DENV, o papel de CE na patogênese da DEN é amplamente estudado (Srikiatkachorn et al., 2014). O antígeno viral foi detectado com sucesso em CE de tecido cardíaco (Salgado et al., 2010) e de tecido esplênico (Balsitis et al., 2009) e replicação viral foi reportada *in vitro*, em culturas de CE (Jessie et al., 2004). O receptor “Liver/Lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Integrin” (L-SIGN), presente em CE linfonodais, hepáticas e pulmonares é sugerido como peça fundamental na infecção por DENV nesses tecidos (Dejnirattisai et al., 2011; Salazar et al., 2014). Níveis elevados de diversas citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e diversas interleucinas (IL), também podem ser detectados em pacientes com dengue grave, sendo associados ao mau funcionamento de CE (Kurane, 2007; Williams et al., 2009; Dejnirattisai et al., 2011).

1.7 Patologia

As principais estruturas atingidas pelo DENV são vasos sanguíneos e plaquetas (Sun e Kochel, 2013; Kadam, et al., 2016; Sreekanth et al., 2016), entretanto, a análise histopatológica dos vasos não demonstra dano às CE (Rothman e Ennis, 1999).

Alterações hepáticas resultantes da infecção por DENV podem variar de elevações assintomáticas das enzimas hepáticas a falência hepática fulminante. O quadro de hepatite aguda está presente em grande parte dos pacientes (Sam et al., 2013; Fernando et al., 2016)

Em muitos casos, icterícia pode ser observada nos primeiros dias da doença (Kadam, et al., 2016). Quadros de falência hepática e colecistite acalculosa estão entre as ocorrências mais raras (Yudhishdran et al., 2014). A análise histopatológica de tecido hepático revela diversas alterações teciduais, tais como esteatose, necrose e hiperplasia de hepatócitos, presença de infiltrado celular, e necrose de células de Kupffer (Basílio de Oliveira et al., 2005; Póvoa et al., 2014).

Em pulmão, as alterações observadas geralmente incluem casos de pneumonia intersticial, com presença de áreas de congestão alveolar. Mais raramente podem estar presentes quadros de hemorragia pulmonar e hemoptise, que, embora relevantes, possuem poucas descrições na literatura (Marchiori et al., 2009). Quanto às alterações histopatológicas, pode ser observado espessamento de septo alveolar,

hemorragia no espaço alveolar, presença de infiltrado inflamatório mononuclear e hiperplasia de MΦ alveolares (Basílio de Oliveira et al., 2005; Póvoa et al., 2014).

Manifestações cardíacas em infecções associadas ao DENV estão entre as menos comuns, entretanto, quando presentes, são geralmente associadas a quadros mais severos (Arora et al., 2016). Devido à infecção viral de cardiomiócitos e de CE, tais manifestações podem levar a casos de distúrbio da condução átrio ventricular, arritmia supraventricular e miocardite (Salgado et al., 2010), este último estando associado à degradação de fibras cardíacas. Enquanto quadros de miocardite aparentam ser, em grande parte, benignos durante o curso da doença, podendo inclusive permanecer assintomáticos (Gamakaranage et al., 2012), o quadro pode muitas vezes apresentar uma evolução muito grave, resultando em casos de insuficiência cardíaca aguda com hipocinesia global e cardiomiopatia dilatada (Shivanthan et al., 2015). Também podem ser observadas áreas focais de infiltrado mononuclear e edema intersticial (Weerakoon et al., 2011; Póvoa et al., 2014).

1.8 Modelo experimental para estudos de infecção por DENV

A inexistência de um modelo experimental animal adequado que replique o espectro da infecção por DENV como observada em humanos é um problema relatado constantemente na literatura (Rico-Hesse et al., 1997; Rothman e Ennis, 1999; Yauch e Shresta, 2008; Williams et al., 2009; Simmons et al., 2012; Bäck et al., 2013; del Angel e Reyes-del Valle, 2013; Wan, et al., 2013; Póvoa et al., 2014; Salazar et al., 2014), o que dificulta imensamente a compreensão dos mecanismos de imunopatogênese do vírus, assim como a elaboração de fármacos e vacinas eficazes contra a DEN (Oliveira et al., 2016).

Com o passar do tempo, diversos modelos vêm sendo propostos, cada um oferecendo diferentes abordagens para o estudo da patogênese e da patologia do DENV, assim como para o desenvolvimento de fármacos e vacinas.

1.8.1 Primatas não humanos (PNH)

PNH apresentam íntima relação genética com seres humanos e resposta imune similar. Apesar disso, tentativas de estabelecer um modelo de DENV em PNH não obtiveram sucesso, reproduzindo apenas quadros brandos de infecção. Os

achados patológicos envolvendo PNH normalmente envolvem quadros de linfadenopatia e esplenomegalia, observados em diferentes espécies de primatas do velho e do novo mundo. Sintomas e sinais observados em humanos, como rash cutâneo, febre, ou alterações comportamentais não são observados, ou apresentam dificuldade de aferição (Clark et al., 2013). Entretanto, PNH são capazes de desenvolver resposta imune de anticorpos anti-DENV semelhante à resposta humana (Zompi e Harris, 2012), sendo, portanto, considerados modelos viáveis para testes de imunogenicidade, segurança e eficácia de vacinas, através da análise da produção de anticorpos (Zellweger e Shresta, 2014).

1.8.2 Modelos murinos imunodeficientes humanizados

A linhagem de camundongos imunodeficientes NOD/SCID é caracterizada principalmente pela sua deficiência na produção de linfócitos B, linfócitos T e da proteína C5 do sistema complemento, além de defeitos no funcionamento de células “Natural Killer” (NK), defeitos na produção e funcionamento de células apresentadoras de antígenos (Bente et al., 2005). Devido a essas condições, o modelo se revelou um ótimo receptor para enxertos humanos e para expressão de genes humanos. Contudo, enquanto o DENV pode ser inoculado em células tumorais enxertadas em camundongos NOD/SCID, sendo inclusive capaz de se replicar, o vírus infecta apenas as células tumorais enxertadas, posteriormente migrando para o cérebro e gerando quadro de paralisia (Zompi e Harris, 2012).

Camundongos NOD/SCID receptores de transplante autólogo de fígado fetal e timo, inoculados com células humanas hematopoiéticas e infectados com DENV-2 desenvolveram sinais brandos de infecção por DENV e apresentaram viremia (Frias-Stahelli et al., 2014).

1.8.3 Modelos murinos imuno/interferon-deficientes

Modelos murinos interferon-deficientes normalmente englobam a linhagem de camundongos AG129 e IFNAR^{-/-}, a primeira linhagem apresentando deficiência de receptores de interferon alfa e beta (IFN- α/β) e IFN- γ (Sarathy et al., 2014; 2015) e a segunda linhagem, deficiência apenas de receptores IFN α/β (Zellweger e Shresta, 2014). Devido a importância da resposta de interferon no controle da infecção viral (Johnson e Roehrig, 1999), resultados obtidos através de uma linhagem imunodeficiente devem ser cuidadosamente interpretados (Milligan et al., 2015).

Camundongos AG129 apresentam intensa replicação de todos os sorotipos de DENV em tecido esplênico, tecido muscular, linfonodos e medula óssea (Williams et al., 2009), além de aumento de permeabilidade vascular, contagem reduzida de plaquetas, aumento do hematócrito e hemorragia intestinal e em muitos casos o quadro evolui ao óbito (Zellweger e Shresta, 2014). Níveis elevados de mortalidade podem estar associados à intensa produção de TNF- α , responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, especialmente no intestino delgado (Watanabe et al., 2015). Na presença de quadro de ADA, e quando infectados com doses muito elevadas de DENV, camundongos AG129 apresentam uma síndrome de extravasamento vascular intensa, com características semelhantes a dengue grave em humanos (de Alwis et al., 2014).

Camundongos da linhagem IFNAR^{-/-}, por sua vez, não desenvolvem paralisia após infecção com DENV-2 pela via intravenosa (IV), entretanto, quando infectados com dose de inóculo viral elevada, ou em casos de ADA, são capazes de reproduzir uma doença semelhante a dengue grave (Zellweger e Shresta, 2014). A infecção experimental intradérmica de camundongos IFNAR^{-/-} com DENV-2 resulta na detecção do vírus em células de Langerhans (CL), M Φ , CD, Mo, além da detecção de quantidades muito elevadas de partículas virais em células CD45⁺ na derme (Schmid e Harris, 2014).

1.8.4 Modelos murinos imunocompetentes

Devido ao baixo custo e fácil acesso e manuseio, modelos murinos imunocompetentes, especialmente se comparados a sua variante imunodeficiente ou a PNH, são mais viáveis como modelo de infecção experimental por DENV. Entretanto, modelos imunocompetentes enfrentam um grave problema para sua validação por apresentaram baixa susceptibilidade ao DENV. Tentativas de estabelecer tais modelos normalmente fazem uso de vias de inoculação extremamente invasivas, como a intracraniana (IC), ou da inoculação de doses muito elevadas do vírus (>10⁹ PFU), geralmente resultando em quadros neurovirulentos de DENV (Balsitis et al., 2010), que culminam em paralisia e na morte do animal (Clark et al., 2013; de Alwis et al., 2014).

Modelos murinos imunocompetentes utilizados em infecção experimental com DENV abrangem a linhagem A/J, a linhagem C57BL/6 e a linhagem BALB/c.

Em camundongos da linhagem A/J inoculados pela via IV com cepa não neuroadaptada de DENV-2 foi detectado elevado grau de ativação de células NK, linfócitos B e linfócitos T, produção de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) DENV específico e produção tardia de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ (Shresta et al., 2004). Além disso, camundongos A/J infectados com inóculos de DENV-2 em concentração de 10⁸ PFU pela via IV apresentam trombocitopenia, viremia e paralisia (Huang et al., 2000).

Camundongos C57BL/6 apresentaram replicação viral e viremia quando infectados por via subcutânea (SC) com cepa não neuroadaptada de DENV-2 (Christofferson et al., 2013) e quando infectados por via intraperitoneal (IP) com cepa neuroadaptada de DENV-1 esta linhagem apresentou redução da contagem de plaquetas, aumento dos níveis de AST e ALT no plasma, aumento dos níveis de citocinas (TNF- α e IFN- γ), presença de microesteatose e infiltrado inflamatório no fígado e focos de hemorragia esplênica (Gonçalves et al., 2012). A inoculação de doses muito elevadas (>3x10⁹ PFU) de DENV-2 nessa linhagem pode também induzir quadros de dano endotelial e hemorragia tissular (Zompi e Harris, 2012).

1.8.5 BALB/c

Desde a década de 80, estudos vêm sendo conduzidos tentando estabelecer a linhagem Bagg Albino (BALB/c) como modelo para infecção experimental com DENV. Hotta demonstrou que camundongos BALB/c “nude” inoculados pela via IP com doses de 10⁷ a 10^{7.8} PFU de DENV-1 apresentam títulos virais elevados no cérebro (10⁸ PFU/g) e em tecido cardíaco (10⁴ PFU/g). Além disso, perante análise de microscopia eletrônica de transmissão, a presença de partículas semelhantes a DENV (PSD) foi observada em neurônios (Hotta et al. 1981). Alguns anos mais tarde, a análise por imunofluorescência indireta de células de camundongos BALB/c infectados pela via IP com DENV-2 neuroadaptado revelou a presença de antígenos virais no citoplasma de M Φ peritoneais (Hotta e Hotta, 1982) e em linfócitos T citotóxicos (Pang et al., 1988).

Estudos prévios demonstram que a inoculação experimental de camundongos BALB/c com cepas não neuroadaptadas de DENV-2 em títulos baixos, por via IP ou IV foi capaz de reproduzir alterações histopatológicas semelhantes às observadas em infecção por DENV, sem que nenhum camundongo viesse a óbito. Alterações como pneumonia intersticial, zonas focais de hemorragia, hiperplasia do epitélio bronquiolar,

presença de filopódios em CE e recrutamento de plaquetas e células inflamatórias puderam ser observadas em análise de pulmão (Barreto et al., 2002, 2007; Barth et al., 2006), enquanto em fígado foi observada a presença de hepatócitos com áreas de esteatose difusa, congestão portal e centrolobular, presença de plaquetas nos capilares, recrutamento de células inflamatórias e áreas de necrose. Ademais, a análise bioquímica das enzimas hepáticas AST e ALT revelou um aumento nos níveis de ambas em animais infectados (Paes et al., 2005, 2009; Barth et al., 2006).

Quando infectados pela via IP com inóculos neuroadaptados de DENV-2, camundongos BALB/c apresentaram manifestações clínicas, como arqueamento do dorso, eriçamento da pelagem e adinamia. Entre 5 e 6 dias pós inoculação foram observados sinais graves da doença, com presença de anorexia, perda de peso, paralisia e morte. Foi detectada a presença de DENV-2 no sangue dos animais e o título virêmico aumentou gradativamente do dia 2 pós-infecção ao dia 6 pós-infecção. Animais infectados também demonstraram quadros trombocitopênicos graves. Perante análise histopatológica, foi observada em fígado a presença de vacuolização em hepatócitos e de edema intracelular, colapso dos capilares sinusoidais e perda da parede do endotélio (Atrasheuskaya et al., 2003).

Camundongos BALB/c inoculados pela via SC com doses de 10^5 PFU de DENV-2 neuroadaptado apresentaram em tecido hepático hiperplasia de células de Kupffer e presença de infiltrado inflamatório próximo aos dutos biliares, além de níveis elevados de IL-1 β e TNF- α . Foi também detectada uma pequena elevação nos níveis de AST e ALT (França et al., 2010).

Estudos realizados em camundongos BALB/c, infectados experimentalmente pela via IP com inóculos neuroadaptados de DENV-3 demonstraram a detecção do vírus em baço, fígado, além de títulos virêmicos elevados. Foi observado um aumento nos níveis das citocinas IFN- γ , IL-6 e TNF- α em soro e baço. O anticorpo anti-NS3 foi detectado em tecido hepático, especialmente em hepatócitos. Dano hepático foi observado através de análise histopatológica, revelando áreas multifocais de necrose e hemorragia, e presença de infiltrado inflamatório próximo a vasos sanguíneos e no parênquima hepático (Costa et al., 2012).

Um estudo realizado em camundongos BALB/c infectados com cepas não neuroadaptadas de duas linhagens distintas de DENV-2 pelas vias IP e IV revelou a presença do vRNA em coração, fígado, pulmão, cérebro e baço, detectados através de análise molecular. A análise histopatológica revelou no coração a presença de

células inflamatórias e plaquetas nos capilares, acúmulo de líquido nos capilares, CE emitindo prolongamentos de membrana, e presença de PSD em CE e cardiomiócitos. No fígado foi observada a presença de células inflamatórias mononucleadas e plaquetas em capilares, inclusões lipídicas e microesteatose em hepatócitos e inclusões eletrondensas perinucleares em CE. Em pulmão foi observado o espessamento do septo interalveolar, acúmulo de líquido nos vasos e presença de células inflamatórias e plaquetas (Jácome et al., 2015).

A análise de fígados de camundongos BALB/c infectados pela via IC com cepa de DENV-2 neuroadaptada apresentou presença de infiltrado inflamatório, microesteatose, necrose e disfunções circulatórias. (Oliveira et al., 2016).

Infecções *in vitro* com inóculos neuroadaptados de DENV-4 realizadas em CE de origem cerebral de camundongos neonatos revelaram a presença de alterações morfológicas e fisiológicas em CE, sugerindo a possibilidade de comprometimento da barreira hematoencefálica (Velandia-Romero et al., 2016).

1.9 Vacinas

A vacinação é considerada a estratégia ideal para o controle do DENV, tendo em vista os avanços alcançados no combate a outras arboviroses com o desenvolvimento da vacina da febre amarela e da vacina da encefalite japonesa. (del Angel e Reyes-Del Vale, 2013). Contudo, o desenvolvimento da vacina da DEN tem se revelado uma tarefa bastante desafiadora, devido principalmente ao papel da interação entre anticorpos heterólogos e o DENV em infecções secundárias (White et al., 2007; Whitehead et al., 2007; Alves et al., 2016; Russel e Halstead, 2016).

1.9.1 Vacina de DNA

Vacinas de DNA possuem vantagens sobre outros métodos de imunização pois, além de gerarem resposta imune duradoura, também garantem a apresentação do antígeno por moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe I, gerando resposta de linfócitos T citotóxicos (Pérez-Vélez et al., 2009). Também na imunização com vacinas de DNA tetravalentes não há risco de um sorotipo viral interferir na replicação de outro sorotipo ou na ocorrência de dominância da resposta imune contra antígenos de um sorotipo. Além disso, existem relatos de efeitos sinérgicos quando há a combinação de vacinas de DNA e outras estratégias de imunização (Azevedo et al., 2013; Putri et al., 2015).

1.9.2 Vacina inativada

Vacinas inativadas consistem em formulações compostas de partículas virais inativadas. Por esse motivo, apresentam a grande vantagem de não haver risco de reversão à virulência. Além disso, vacinas inativadas são capazes de gerar resposta imune balanceada, característica essencial no desenvolvimento de uma vacina tetravalente (Wan et al., 2013).

Atualmente, uma colaboração entre a GlaxoSmithKline (GSK), a Fiocruz e o Walter Reed Army Research Institute vem tentando desenvolver duas vacinas tetravalentes inativadas (TDENV-PIV e DPIV), com estudos de fase I envolvendo a TDENV-PIV sendo realizados nos Estados Unidos e em Porto Rico. A vacina é administrada em duas doses, a segunda dose sendo aplicada 4 semanas após a primeira (Schwartz et al., 2015; Lim et al., 2016).

1.9.3 Vacina de subunidade

Vacinas de subunidade são formuladas a partir de proteínas de fusão recombinantes, normalmente entre proteínas do vírus e outra proteína ou sequência proteica desejada. Embora sejam consideradas mais seguras quando comparadas a vacinas atenuadas, também apresentam menor potencial imunogênico, sendo necessária a aplicação de doses de reforço ou da utilização de adjuvantes (Wan et al., 2013; Ghosh e Dar, 2015). Também podem ser utilizadas em conjunto com outras variedades vacinais, gerando títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes (Raviprakash et al., 2009).

1.9.4 Vacina atenuada

Atualmente, uma das perspectivas mais promissoras para o desenvolvimento de uma vacina contra o DENV se encontra em vacinas de vírus vivo atenuado. Tais vacinas são capazes de induzir a geração de uma resposta imune humoral e celular duradoura, semelhante à infecção natural (Whitehead et al., 2007).

A atenuação do DENV é realizada através de passagens seriadas do vírus em cultura de célula. Após um número adequado de passagens o vírus torna-se incapaz de produzir viremia, enquanto ainda capaz de induzir resposta imune. (Bancroft et al., 1981; Bhamarapravati et al., 1987). O equilíbrio entre um grau seguro de atenuação e imunogenicidade varia de acordo com cada sorotipo. Alternativamente, a atenuação pode ser realizada através de deleções direcionadas de nucleotídeos específicos,

resultando na redução do potencial de replicação do vírus (del Angel e Reyes-Del Vale, 2013).

A vacina atenuada recombinante tetravalente CYD-TDV ou Dengvaxia (Sanofi-Pasteur), baseada na vacina YF17D de febre amarela, já foi registrada pelo governo de diversos países (dentre estes, o Brasil), tendo passado por testes clínicos de fase III em cinco países do sudeste asiático e cinco países da América Latina (WHO, 2016), apresentando eficácia de 56,5% e 60,8%, respectivamente (Coudeville et al., 2016). Esta eficácia é notavelmente menor contra os sorotipos 1 e 2, e em análise realizada no sudeste asiático no terceiro ano após a vacinação, a eficácia caiu para 16,7%. Também no terceiro ano pós-vacinação áreas de teste no sudeste asiático apresentaram um aumento do número de hospitalizações por DEN em crianças vacinadas (Ferguson et al., 2016; Halstead, 2016). Tendo em vista tal redução na eficácia, um aspecto importante a ser observado durante estudos futuros é a possibilidade de casos de amplificação por vacina, ou seja, reações cruzadas entre anticorpos gerados através da vacinação e DENV proveniente de infecções primárias, e na possível evolução de tais casos para um quadro de dengue grave (Halstead, 2016).

Também em estudos clínicos de fase I e II encontra-se a vacina atenuada recombinante tetravalente TDV, desenvolvida pela Takeda (originalmente DENVax, desenvolvida pela Invitrogen). A vacina é administrada em duas doses, em intervalo de 90 dias, apresentando taxas de soroconversão de 60%. Diversos parâmetros, como via de administração e variações na formulação da vacina ainda estão sendo testados (Vannice et al., 2016).

Outra possível perspectiva são as vacinas TV003/TV005 desenvolvidas pelo National Institute of Health e formulada a partir de vírus atenuado apresentando deficiência na replicação, resultante da deleção de 30 nucleotídeos da UTR 3' do genoma viral. Quando aplicadas em dose única, administrações de TV005 foram capazes de gerar resposta de anticorpos para todos os sorotipos em 90% dos voluntários, durante estudos de fase I (Kirkpatrick et al., 2015).

1.9.5 Vacina X modelo murino BALB/c

Diversos estudos também fazem uso da linhagem BALB/c como modelo experimental para testes de candidatos a vacina e fármacos contra DENV.

Quando imunizados com a proteína NS1 de DENV-2 camundongos BALB/c apresentaram desenvolvimento de imunidade homóloga após desafio com doses inoculadas pela via IC de inóculos de DENV-2 neuroadaptado (Schlesinger et al., 1987).

Uma vacina inativada de DENV-2 foi testada em camundongos BALB/c e macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), apresentando imunogenicidade após duas inoculações. Camundongos BALB/c, quando desafiados com doses de DENV-2, não apresentaram sinais da doença, enquanto macacos Rhesus apresentaram viremia (Putnak et al., 1996).

Outro exemplo de geração de imunidade em linhagem BALB/c pode ser observado em estudos com a vacina tetravalente de subunidade recombinante, elaborada a partir de uma proteína de fusão recombinante, resultado da fusão de aminoácidos do domínio B da proteína E de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 a proteína ligadora de maltose. Essa formulação foi inoculada em camundongos BALB/c pela via intramuscular sob a forma tetravalente e monovalente. Formulações monovalentes apresentaram forte resposta de IgG contra o sorotipo homólogo, enquanto formulações tetravalentes da vacina induziram elevada geração de anticorpos neutralizantes contra os sorotipos 1, 2 e 3, porém um título 8 vezes menor contra o sorotipo 4 (Simmons et al., 2001).

Testes realizados em camundongos BALB/c previamente imunizados com vacina de DNA formulada a partir de plasmídeo recombinante baseado em diferentes sequências da proteína NS3 e desafiados com doses neuroadaptadas de DENV-2 inoculadas pela via IC demonstraram diferentes graus de proteção de acordo com a sequência de NS3 utilizada (Costa et al., 2011)

PE1D2, uma vacina de DNA constituída da fusão de ectodomínios da proteína E de DENV-2 a uma sequência sinal da protease ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), foi utilizada na imunização de camundongos BALB/c. Conjuntamente, a vacina YF17D-D2, uma variante quimérica da vacina de febre amarela YF17D foi utilizada na imunização. Quando desafiados com a inoculação intracerebral de doses letais de inóculos neuroadaptados de DENV-2, grupos imunizados com ambas as vacinas apresentaram ausência de óbitos, e presença de sinais clínicos em apenas um animal do grupo (Azevedo et al., 2013).

Camundongos BALB/c imunizados com uma vacina de subunidade tetravalente formulada a partir da fusão do domínio III da proteína E de DENV a região

C-terminal da proteína P64k de *Neisseria meningitidis* apresentaram, após desafio pela via IC com inóculos neuroadaptados de DENV-1, -2, -3 e -4, proteção parcial contra os 4 sorotipos (Lazo et al., 2014).

A vacina tetravalente produzida pela VaxInnate foi testada em camundongos BALB/c e macacos Rhesus, sendo capaz de gerar resposta imunogênica em ambos, embora muito mais significativa e duradoura no modelo murino (Liu et al., 2015).

Camundongos BALB/c inoculados com cepas neuroadaptadas de DENV-2 e posteriormente imunizados com a vacina de DNA pcTPANS1 apresentaram níveis elevados de linfócitos T ativados no baço e no sangue e níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias. Camundongos desafiados com doses letais do inóculo apresentaram taxas de sobrevivência próximas de 100% (Oliveira et al., 2016).

1.10 Justificativa

Desde sua reintrodução no estado de Roraima em 2011 (Temporão et al., 2011), finalmente marcando a co-circulação dos 4 sorotipos de DENV no território brasileiro, o DENV-4 foi detectado em 19 das 27 unidades federativas do Brasil (Fares et al., 2015). Embora o DENV-4 não seja o sorotipo predominante no país, representando apenas 3.3% dos 3.033 casos analisados pela secretaria de vigilância sanitária (SVS/MS) no ano de 2016 (SVS/MS, 2016) sua interação com outros sorotipos co-circulantes pode ser uma fator preocupante quando levada em consideração a interação entre anticorpos heterólogos e possíveis quadros de dengue grave.

O estabelecimento de um modelo animal adequado que reproduza a infecção por DENV de modo análogo ao observado em casos humanos é um marco essencial para a compreensão da patogênese da doença e para o desenvolvimento de fármacos e vacinas. Para tal, é necessária a elucidação dos efeitos histopatológicos, ultraestruturais e moleculares de cada um dos sorotipos sobre o modelo proposto, individualmente e simultaneamente, assim como a manutenção da fidedignidade da via de inoculação do mosquito, da virulência das cepas virais e da imunocompetência do animal.

Estudos prévios realizados em camundongos da linhagem BALB/c imunocompetentes, infectados experimentalmente por via IP e IV com inóculos não neuroadaptados de DENV-2 e DENV-3 apresentam infecção e sinais clínicos como tremores, diarreia e aumento da temperatura corporal, bem como alterações teciduais semelhantes aos observados em casos humanos (Barreto-Vieira et al., 2002; 2007;

Barth et al., 2006; Paes et al., 2005; 2009; Rasinhas et al., 2013; Jácome et al., 2015; Barreto-Vieira et al., 2015; Caldas et al., 2016). No entanto, os modelos animais propostos nestes estudos são, em sua grande maioria, avaliados frente à infecção por DENV-1 e DENV-2. Portanto, neste estudo visamos realizar infecções experimentais de camundongos BALB/c com inóculos de cepa de DENV-4 isolado de caso humano, não neuroadaptado e avaliar as alterações morfológicas geradas pela infecção e a presença de replicação viral nos tecidos estudados.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Realizar infecções experimentais em camundongos BALB/c com cepa de DENV-4, não neuroadaptada e avaliar as alterações morfológicas nos tecidos e a viremia resultantes destas infecções.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar a susceptibilidade da linhagem de camundongos BALB/c à infecção pelo DENV-4.
- Determinar o potencial tropismo do DENV-4 através da observação das alterações morfológicas em tecidos dos camundongos BALB/c infectados.
- Realizar a detecção e quantificação de DENV-4 em amostras de tecido e saliva dos camundongos infectados através da técnica de qRT-PCR.

3 Material e Métodos

3.1 Considerações Éticas

O presente trabalho é parte integrante de projeto corrente do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (LMMV), Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/ Fundação do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais da FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ LW-50/11).

3.2 Cepa Viral

Foi utilizada uma cepa de DENV-4 (BR2972/2013), isolada no Rio de Janeiro, Brasil de um caso positivo ocorrido em 2013, previamente sorotipado e gentilmente cedido pelo Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ.

3.3 Produção de Massa Viral

Para a produção de massa viral, a cepa de DENV-4 foi inoculada em garrafa de 175 cm² contendo células de mosquito *Ae. albopictus* a uma concentração de 5x10⁵ células/mL. O sorotipo foi reconfirmado pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpo monoclonal específico para DENV-4. A titulação foi realizada de acordo com Reed e Muench (1938). Ao final de 3 passagens a cepa apresentou título de 10⁹ TCID₅₀/mL, sendo selecionada para a infecção experimental dos camundongos.

3.4 Experimentação animal

Camundongos da linhagem BALB/c, machos, de 2 meses de idade, pesando entre 20 e 25g foram obtidos no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB), FIOCRUZ. Durante o período de experimentação os animais foram mantidos em estantes ventiladas, localizadas no biotério do pavilhão Hélio e Peggy Pereira, onde condições como temperatura, umidade, alimentação, ventilação, higienização e fotoperíodo são rigorosamente controladas. Após a chegada dos camundongos ao biotério, estes foram divididos em três grupos homogêneos (G1, G2 e G3). Cada um dos grupos foi separado no biotério em 3 caixas de 5 animais, com o objetivo de facilitar o manuseio. A marcação dos animais foi realizada com ácido pícrico diluído em água, este sendo aplicado em partes distintas do corpo dos camundongos (orelhas, patas dianteiras, patas traseiras, etc) com um swab, de modo a permitir a identificação. Alterações físicas e comportamentais observadas, quando presentes, foram devidamente registradas.

3.5 Desenho Experimental

O experimento foi realizado em triplicata, e todos os procedimentos foram realizados de modo semelhante em cada um dos grupos. Durante todo o período de experimentação animal 45 camundongos foram obtidos e subsequentemente divididos em três grupos de 15 animais, denominados G1, G2 e G3, cada um dos grupos com datas específicas de chegada no biotério. Uma vez no biotério, os animais foram novamente divididos em caixas contendo 5 animais, devidamente identificadas. A cada uma destas caixas foi designada uma análise distinta, sendo estas análise histológica e molecular para os animais contidos na caixa 1, análise ultraestrutural para os animais contidos na caixa 2, e controle negativo para os animais contidos na caixa 3 (Figura 6). Dos cinco animais das caixas 3, três foram destinados a controle negativo e dois foram destinados a controle L-15. Os órgãos dos animais da caixa 1,

sendo destinados a duas análises distintas (molecular e histopatológica), foram clivados em duas metades e armazenados de acordo com o estudo objetivado. Durante a eutanásia, cada um dos órgãos coletados foi armazenado de modo condizente à caixa na qual o animal foi contido. Todos os camundongos, a exceção do grupo controle negativo, foram inoculados pela via IV, e eutanasiados 72 horas pós-infecção (h.p.i.). Após o término do período de experimentação animal, um total de 45 fígados, 45 pulmões e 45 corações foram coletados, totalizando 135 órgãos destinados a análises distintas, além de 15 amostras de saliva, integralmente destinadas a análise molecular.

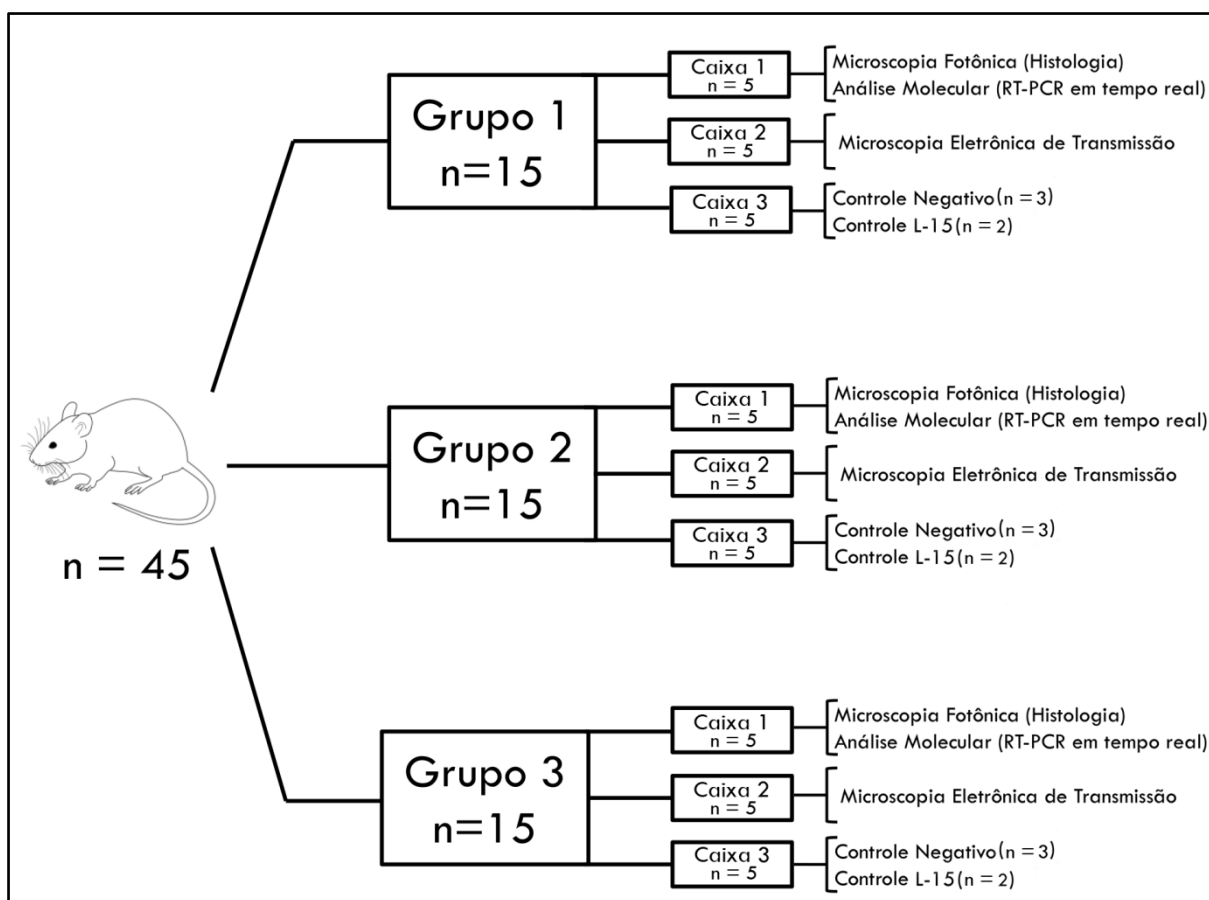


Figura 6: Representação esquemática do desenho experimental para infecção de camundongos BALB/c com DENV-4.

3.6 Controle de temperatura

A temperatura corporal de todos os animais foi verificada em dois momentos do experimento: pré- e pós-infecção. Para esse fim foi utilizado um termômetro de mercúrio comum, cuja extremidade foi embebida em óleo mineral e cuidadosamente

inserida no reto do camundongo por cerca de um minuto. Todas as temperaturas foram devidamente registradas.

3.7 Infecção experimental

No momento da inoculação cada camundongo foi contido em um suporte acrílico, sua cauda sendo cuidadosamente mantida esticada. Uma dose de 100 µL do inóculo, apresentando título viral de 10.000 TCID₅₀/0,1mL, foi acondicionada em uma seringa (1 mL), sendo administrado no camundongo pela veia caudal (via IV), através de uma agulha descartável calibre 13x4,5mm. Camundongos do grupo controle L-15 foram inoculados com 100 µL de meio de cultura Leibovitz L-15 (Sigma, Alemanha). Camundongos do grupo controle negativo não sofreram inoculação. Todo procedimento de infecção experimental foi realizado em cabine biológica de nível de biossegurança 2, no biotério do pavilhão Hélio e Peggy Pereira.

3.8 Coleta de saliva

Os camundongos foram cuidadosamente contidos fisicamente e um swab umedecido com meio de cultura L-15 foi gentilmente inserido na boca de cada animal e mantido por cerca de um minuto. O swab contendo a amostra de saliva foi acondicionado em um microtubo estéril contendo 0,5 mL de meio L-15 e congelado em freezer -70°C para posterior análise molecular. A saliva dos camundongos foi coletada em momento anterior à eutanásia.

3.9 Eutanásia e coleta de órgãos

Todos os camundongos foram eutanasiados 72 horas após a inoculação. Os animais foram transportados do biotério para o laboratório, onde foi realizada a segunda aferição de temperatura. Como anestésico foi utilizado 150 µL de tiopental sódico (Thiopentax), administrado pela via IP através de seringa (1 mL) e agulha descartável calibre 13x4,5 mm. Uma vez que o camundongo se encontra sob o efeito do anestésico, rapidamente é realizado o deslocamento cervical. O camundongo foi então transportado para o interior de uma cabine biológica, onde foi posicionado em decúbito dorsal sobre um suporte de dissecação, cada uma de suas patas sendo fixada ao suporte com uma agulha. A dissecação foi realizada com instrumentos cirúrgicos (fórceps, tesoura e bisturi) estéreis, sendo primeiramente feita uma incisão na linha alba do animal, possibilitando acesso as cavidades. Em seguida foi realizado um corte bilateral do abdômen do camundongo, ascendendo até a extremidade superior do esterno, expondo a cavidade abdominal. A caixa torácica foi quebrada com uma

tesoura, expondo o coração e os pulmões. Os tecidos visados foram removidos um a um e devidamente acondicionados de acordo com o estudo objetivado. Uma vez removidos todos os órgãos, as carcaças dos animais foram coletadas em sacos de autoclave e novamente transportadas para o biotério, onde foram direcionadas para o descarte adequado e incineração.

3.10 Fixação por perfusão

Em camundongos destinados à microscopia eletrônica de transmissão foi realizada a técnica de perfusão, que visa otimizar a fixação dos tecidos biológicos do animal, substituindo o sangue por uma solução fixadora (paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0.2 M, pH 7,2). A abertura da cavidade abdominal é realizada de modo semelhante ao processo cirúrgico descrito na eutanásia, visando expor o coração do camundongo. Uma cânula adaptada a um sistema de fixação por perfusão é inserida no ventrículo esquerdo do animal, o átrio esquerdo sendo imediatamente seccionado e o fluxo da solução fixadora liberado por trinta minutos. Após o procedimento, os órgãos são coletados e devidamente armazenados. A produção do fixador para perfusão é realizada no mesmo dia da eutanásia, em cabine química, assim como todo o processo de fixação por perfusão.

3.11 Acondicionamento de tecidos para análises moleculares

Todos os tecidos direcionados à análise molecular foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) e posteriormente acondicionados em microtubos devidamente identificados e armazenados em freezer -70°C até o momento da extração do RNA.

3.12 Acondicionamento e processamento de amostras para análises em microscópio fotônico de campo claro

Todos os tecidos direcionados à microscopia fotônica foram acondicionados em frascos de vidro devidamente identificados contendo o fixador Millonig e armazenados em geladeira, de modo a garantir a integridade estrutural do tecido até o momento do processamento.

Para o processamento, em uma cabine biológica, os órgãos coletados foram depositados sobre uma placa de vidro, e com um bisturi cirúrgico descartável foram clivados em fragmentos de 3-4 mm. Cada fragmento de tecido foi armazenado em um cassete histológico, estes sendo acondicionados em um recipiente contendo o fixador Millonig. Posteriormente, o tecido foi desidratado em banhos de concentrações crescentes de etanol, clarificado em xilol e incluído em parafina. As secções de tecido

(5µm) foram obtidas com o uso de um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram então analisados em microscópio fotônico de campo claro (Zeiss Axiophot).

3.13 Acondicionamento e processamento de amostras para análise em microscópio eletrônico de transmissão

Todos os tecidos direcionados à microscopia eletrônica de transmissão foram acondicionados em frascos de vidro devidamente identificados contendo o fixador glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2 e armazenados em geladeira, de modo a garantir a integridade estrutural do tecido até o momento do processamento.

O processo de preparação dos órgãos armazenados em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,2M para microscopia eletrônica de transmissão teve início com a clivagem do tecido. Em uma cabine biológica, cada órgão coletado foi clivado em pequenos fragmentos de cerca de 1mm³ com auxílio de um bisturi cirúrgico descartável. De modo a garantir a integridade estrutural do tecido, todo o processo foi realizado em uma placa de Petri contendo um pequeno volume de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,2M. Após clivado, o material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,2M em sacarose 7%, em três lavagens consecutivas de cinco minutos, e pós fixado em tetróxido de ósmio durante trinta minutos. Passado este tempo, o material passou por outra lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,2M em sacarose 7% durante mais cinco minutos. O material foi então desidratado em concentrações crescentes de acetona: dez minutos em acetona 15%, dez minutos em acetona 30%, dez minutos em acetona 50%, trinta minutos em acetona 70% em acetato de uranila 1%, cinco minutos em acetona 90%, e dez minutos (2X) em acetona 100% em sulfato de cobre. Após removida a água do tecido, este foi incluído em resina Epoxi (Electron Microscopy Sciences) para a infiltração. Os fragmentos foram imersos em uma mistura de acetona 100% e resina Epoxi em concentração de 3:1 durante 30 minutos, e posteriormente em uma concentração de 1:3 durante uma noite. No dia seguinte, os tecidos processados foram acondicionados em moldes de silicone contendo resina pura, devidamente identificados, e então mantidos em estufa 60°C durante três dias para polimerização da resina.

3.14 Obtenção de secções semifinas e ultrafinas

Uma vez os blocos retirados da estufa de polimerização, estes foram preparados para o ultramicrotomo (Reichert-Jung). A extremidade do bloco na qual se encontra a secção de tecido foi desbastada sob uma lupa estereoscópica, com auxílio de uma navalha de aço. O bloco preparado foi acondicionado a um suporte de metal acoplado ao ultramicrotomo e cuidadosamente aproximado do fio da navalha de diamante (DiATOME). Cortes ultrafinos (50-70nm) foram coletados diretamente com grades de cobre (300 malhas) e diretamente armazenados para a futura contrastação. Cortes semifinos (0,5µm) por sua vez, foram coletados e então depositados sobre lâminas histológicas de vidro, que foram então depositadas sobre uma platina aquecedora a 60°C por cerca de 2 a 3 minutos, de modo a garantir a aderência dos cortes à lâmina histológica. As lâminas foram coradas com uma gotícula da solução de Azul e Metileno e Azur II (1:1) e submetidas a análise preliminar.

3.15 Contrastação positiva

As grades contendo secções ultrafinas de tecido foram submetidas à técnica de contrastação positiva (Reynolds, 1963), que possibilita a sua observação ao microscópio eletrônico de transmissão. Primeiramente, a grade foi depositada sobre uma gota do sal de metal pesado acetato de uranila por 15 minutos. Este agente contrastante é fotossensível, portanto esta etapa do protocolo foi realizada com a grade coberta por papel alumínio e a luz da cabine química apagada. Passados os 15 minutos, a grade foi submetida a três lavagens com água destilada de um minuto cada. Qualquer excesso de água foi cuidadosamente absorvido com papel filtro e em seguida a grade foi depositada sobre uma gotícula do agente contrastante citrato de chumbo por 4 minutos. O citrato de chumbo precipita quando em contato com CO₂, portanto esta etapa do protocolo foi realizada em um ambiente fechado (uma placa de Petri fechada) onde são depositadas pastilhas de hidróxido de sódio, capazes de neutralizar o CO₂ do ar. Os 4 minutos passados, a grade foi submetida a outra série de três lavagens. A grade foi novamente armazenada e levada ao microscópio eletrônico de transmissão (JEOL-JEM-1011) para análise. Todo o protocolo de contrastação positiva foi realizado em cabine química.

3.16 Extração de ácidos nucleicos

Para a extração de RNA, os órgãos coletados acondicionados em microtubos foram macerados em 500 µL de meio de cultura L-15 suplementado com penicilina-streptomomicina a 2% e fungizona a 1% (Invitrogen, EUA). O material resultante foi

centrifugado durante 15 minutos a uma velocidade de 10.000 RPM a 4°C. A extração foi realizada a partir de 140 µL de sobrenadante de órgãos e amostras de saliva utilizando-se o kit QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Todo o procedimento foi realizado em cabine biológica.

3.17 RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a detecção e quantificação do vRNA, a curva padrão foi construída a partir de uma diluição seriada de RNA extraído de uma amostra de DENV-4 (cepa BR3246/13) de título conhecido ($1,12 \times 10^6$ TCID₅₀/0.1mL), gentilmente cedida pelo Laboratório de Flavivírus, IOC/Fiocruz. O protocolo empregado seguiu o recomendado pelas instruções do kit comercial *SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR* (Invitrogen Corporation, EUA) utilizando-se os iniciadores DENJ-4R (5'TCCACCTGAGACTCCTTCCA3') e DENJ-4F (5'TTGTCTAATGATGCTGGTTCG3'), e sonda DENJ-4P (6-FAM 5'TTCCTACTCCTACGCATCGATTCCG3' BHQ-1). De acordo com a posição do genoma, o fragmento amplificado apresentava extensão de 84 nucleotídeos.

Para a reação de amplificação, uma mistura de reação foi preparada utilizando 1 µL de cada iniciador a 50 µM; 12,5 µL de mistura de reação 2x (0,4 µM de cada dNTP e 6 µM de MgSO₄); 0,5 µL da enzima Super Script III RT/Platinum Taq Mix®; 3,5 µL de água destilada livre de DNase/Rnase; 1 µL de MgSO₄ a 5 mM e 0,75 µL da sonda a 9 µM. Numa microplaca óptica (PE Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de 96 micropoços, primeiramente, foram adicionados 20 µL da mistura, contendo os iniciadores, sonda, água e o conjunto comercial de diagnóstico *SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR* (Invitrogen, EUA) em cada poço. Posteriormente, foram acrescentados 5 µL do RNA extraído, totalizando assim um volume final de 25 µL/poço. As amostras e a curva padrão foram aplicadas em duplicatas. As placas foram colocadas na plataforma *LineGene 9660* (Bioer, 44 China) para a reação de qRT-PCR, seguindo os parâmetros de ciclagem disponíveis na Quadro 1.

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Transcrição reversa	50°C	15 minutos	1
Ativação da enzima	95°C	2 minutos	1

Desnaturação	95°C	15 segundos	40
Hibridização/Extensão	60°C	1 minuto	40

Quadro 1: Parâmetros de termociclagem

4 Resultados

Durante todo o período de experimentação animal, nenhum dos camundongos veio a óbito, de modo que todos os camundongos foram eutanasiados ao término dos experimentos. Nenhuma alteração neurológica, como paralisia ou cegueira, assim como nenhum outro sinal clínico, como petéquias, tremores ou diarreia foram observados durante o período entre a infecção e a eutanásia.

4.1 Análise de temperatura corporal

Foi detectado um aumento da temperatura corporal em camundongos BALB/c infectados com DENV-4, um indicativo de quadro de febre. Animais das caixas 1 e 2 (grupos infectados) apresentaram, de um modo geral, um aumento da temperatura corporal 72 h.p.i. pós-infecção com DENV-4 (2ª aferição) quando comparada a temperatura corporal pré-infecção (1ª aferição). Essa alteração pode ser observada de modo conciso nas caixas 1 e 2 do grupo 1 e nas caixas 1 e 2 do G3, onde cada caixa apresentou um aumento médio de temperatura de 1,66°C, 2,04°C, 1,62°C e 1,44°C, respectivamente (Figuras 7, 8 e 9). Em animais das caixas 1 e 2 do grupo 2 não foram observadas alterações regulares de temperatura.

Camundongos das caixas 3 (caixas controle) não apresentaram aumentos significativos de temperatura, o aumento médio por caixa sendo de 0,46°C no grupo 1, 0,04°C no grupo 2 e 0,36°C no grupo 3. A identificação dos camundongos encontra-se abreviada, sendo ela a seguinte: Orelha (Ore), Pata Dianteira (PD), Pata Traseira (PT), Cabeça (Cab) e Dorso (Dor).

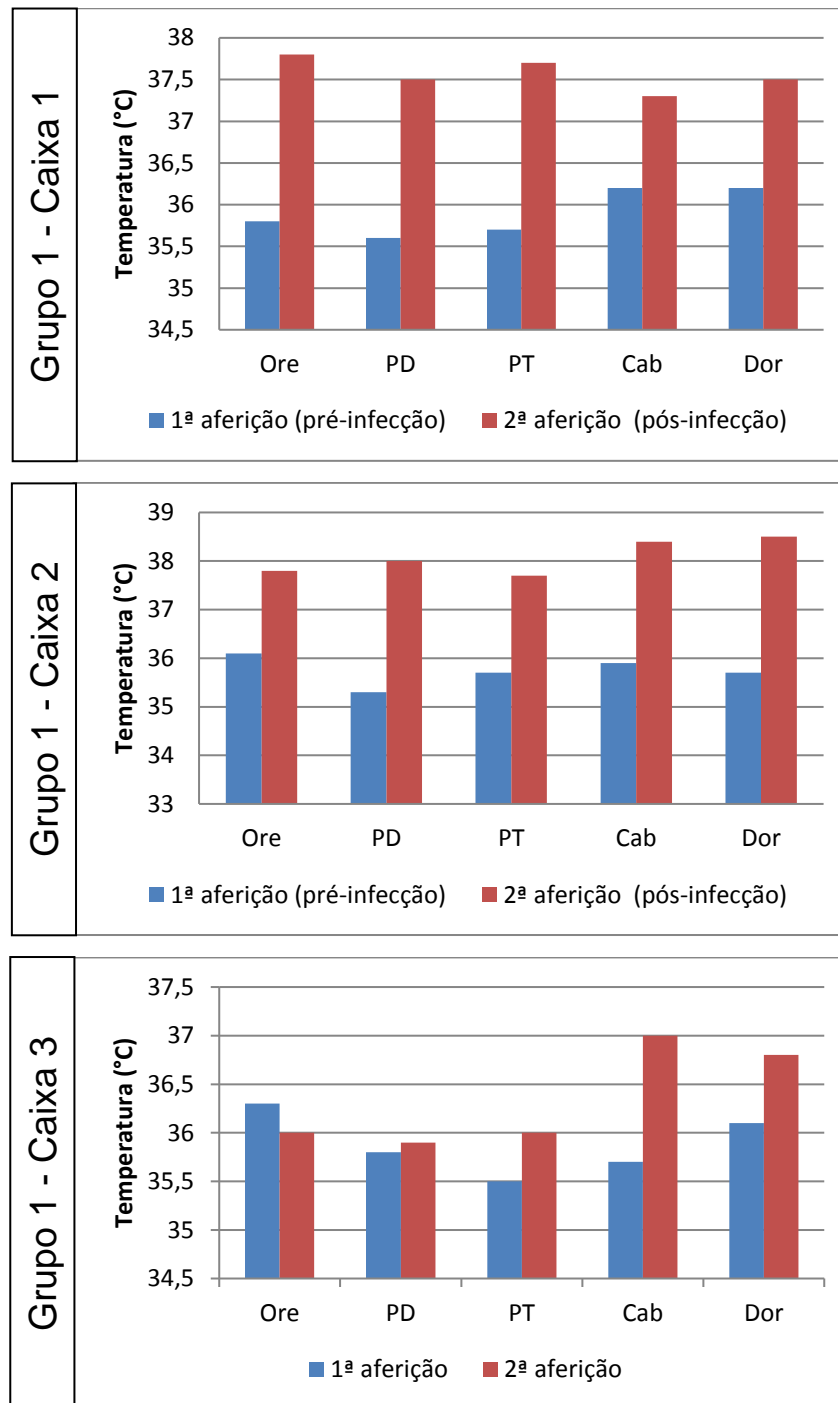


Figura 7: Gráfico dos valores da temperatura dos camundongos do grupo 1. **Ore:** orelha; **PD:** pata dianteira; **PT:** pata traseira; **Cab:** cabeça; **Dor:** dorso.

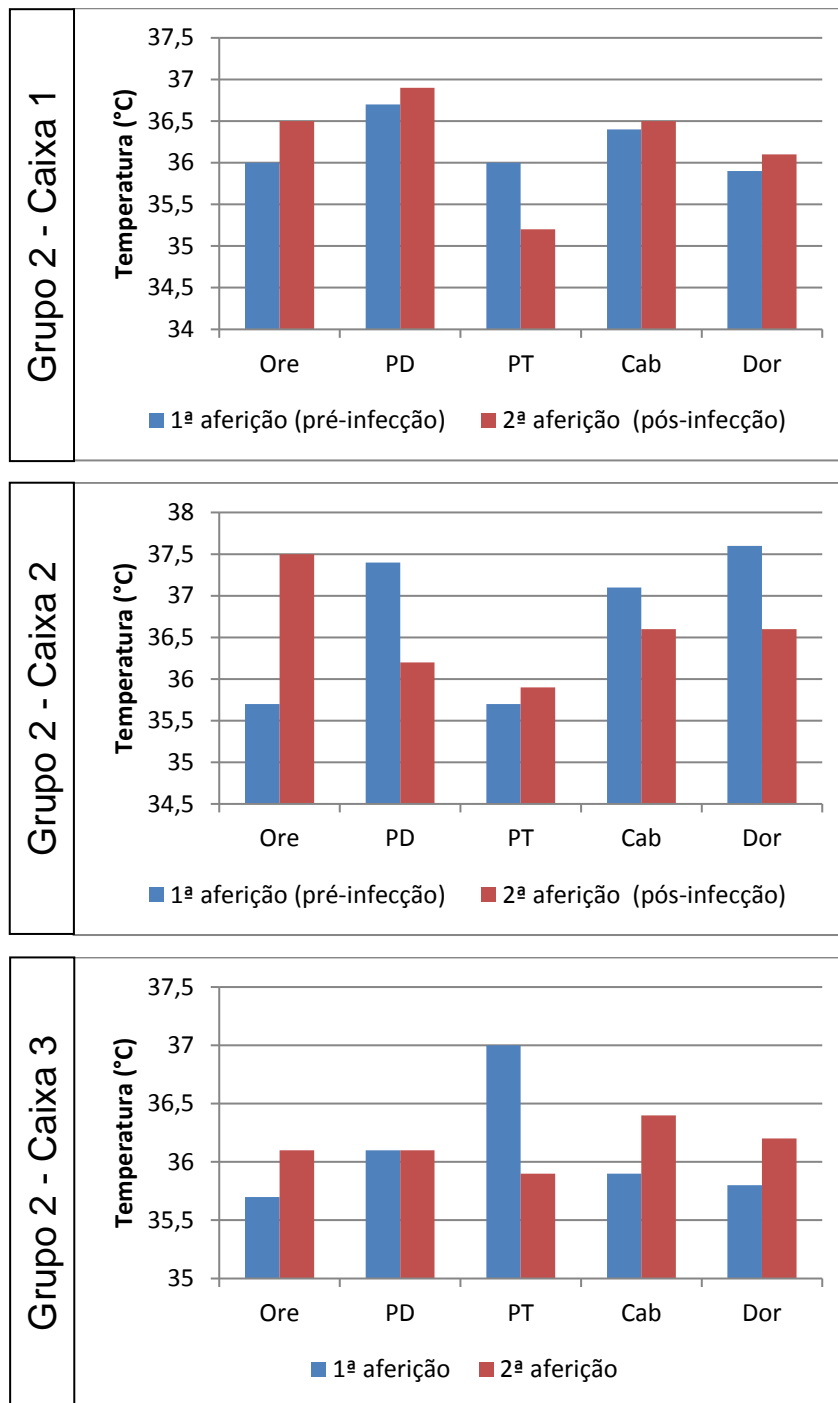


Figura 8: Gráfico dos valores da temperatura dos camundongos do grupo 2. **Ore:** orelha; **PD:** pata dianteira; **PT:** pata traseira; **Cab:** cabeça; **Dor:** dorso.

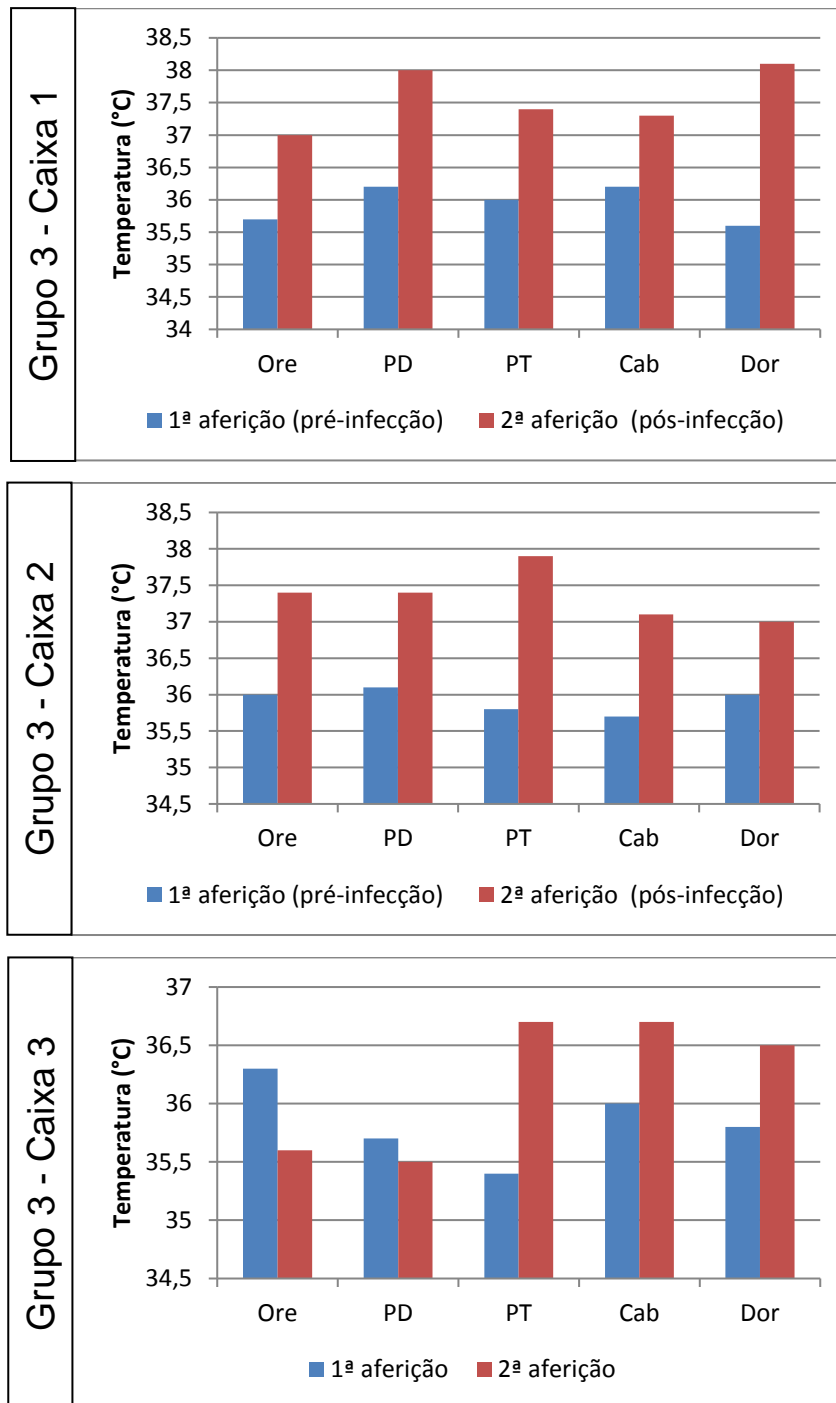


Figura 9: Gráfico dos valores da temperatura dos camundongos do grupo 3. **Ore:** orelha; **PD:** pata dianteira; **PT:** pata traseira; **Cab:** cabeça; **Dor:** dorso.

4.2 Análise molecular de tecidos e saliva de camundongo BALB/c infectado experimentalmente com DENV-4 por RT-PCR em tempo real

Os resultados do teste RT-PCR em tempo real demonstraram que o RNA viral de DENV-4 foi detectado em todos os grupos de camundongos infectados, apresentando um total de 18 amostras positivas de tecido, de um total de 41 testadas (43,9%), e duas amostras positivas de saliva, de um total de 15 testadas (13,3%). O genoma viral foi detectado em quatro amostras de fígado (26,6%), sete amostras de pulmão (46,6%) e sete amostras de coração (46,6%) (Quadro 2). Tecido pulmonar e tecido cardíaco se revelaram mais susceptíveis à infecção experimental por DENV-4, apresentando maior recuperação do vRNA.

Quadro 2: Valores qualitativos da Detecção de DENV-4 por qRT-PCR em diferentes tecidos e saliva de camundongos infectados.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupos 1, 2 e 3
Amostra	Total por grupo Positivo/Testado (%)			Total por amostra Positivo/Testado (%)
Fígado	2/2 (100)	1/4 (25)	1/5 (20)	4/11 (36,36)
Pulmão	3/5 (60)	2/5 (40)	2/5 (40)	7/15 (46,6)
Coração	2/5 (40)	2/5 (40)	3/5 (60)	7/15 (46,6)
Saliva	1/5 (20)	0/5 (0)	1/5 (20)	2/15 (13,3)

Os títulos virais observados demonstraram variações de valores exponenciais entre 10^3 e 10^{10} . A presença do vRNA foi detectada em quatro amostras de fígado, três delas apresentando títulos acima de 10^7 . Títulos virais muito elevados, variando de 10^8 a 10^{10} foram observados em sete dos 15 corações testados. Títulos igualmente elevados foram observados em seis dos 15 pulmões testados, com apenas uma amostra apresentando título de 10^3 (Quadro 3). As duas amostras de saliva positivas apresentaram títulos de $5,76 \times 10^9$ e $8,41 \times 10^9$. Em alguns animais foi observada a presença do vRNA em mais de um órgão.

Quadro 3: Valores quantitativos da detecção de DENV-4 por qRT-PCR em diferentes tecidos de camundongos infectados. **NR:** Não realizado; **ND:** Não detectado; **(*):** Detecção do vRNA em múltiplos órgãos.

Grupo	Camundongo	Fígado	Pulmão	Coração	Saliva
		Título Viral (cópias de RNA/ml)			
1	Orelha (*)	NR	$3,33 \times 10^9$	$2,32 \times 10^9$	ND
	Pata Dianteira (*)	$9,66 \times 10^9$	$1,57 \times 10^7$	ND	ND
	Pata Traseira	NR	ND	$4,96 \times 10^8$	ND
	Dorso	NR	$1,07 \times 10^{10}$	ND	ND
	Cabeça	$3,71 \times 10^8$	ND	ND	$5,76 \times 10^9$
2	Orelha	NR	ND	ND	ND
	Pata Dianteira	ND	ND	ND	ND
	Pata Traseira	$9,08 \times 10^7$	ND	ND	ND
	Dorso (*)	ND	$1,83 \times 10^7$	$4,02 \times 10^9$	ND
	Cabeça (*)	ND	$3,92 \times 10^3$	$1,01 \times 10^{10}$	ND
3	Orelha	ND	ND	$3,61 \times 10^8$	$8,41 \times 10^9$
	Pata Dianteira	ND	ND	$5,93 \times 10^8$	ND
	Pata Traseira (*)	ND	$8,69 \times 10^9$	$9,79 \times 10^9$	ND
	Dorso (*)	$4,62 \times 10^3$	$8,18 \times 10^8$	ND	ND
	Cabeça	ND	ND	ND	ND

4.3 Análise histopatológica de tecidos de camundongo BALB/c infectados experimentalmente com DENV-4

Não foram observadas alterações histopatológicas em tecidos de camundongos dos grupos controle negativo e controle L-15 (Figuras 10a, 10b, 14, 17).

4.3.1 Análise histopatológica de tecido hepático

Em amostras de fígado de camundongos BALB/c infectados com DENV-4 foi observada perante análise sob o microscópio fotônico de campo claro a presença de congestão portal (Figuras 11a, 11b, 11c), infiltrado inflamatório (Figuras 12a, 12b, 12c), líquido no capilar (Figuras 13a) e pontos focais de hemorragia (Figuras 13b).

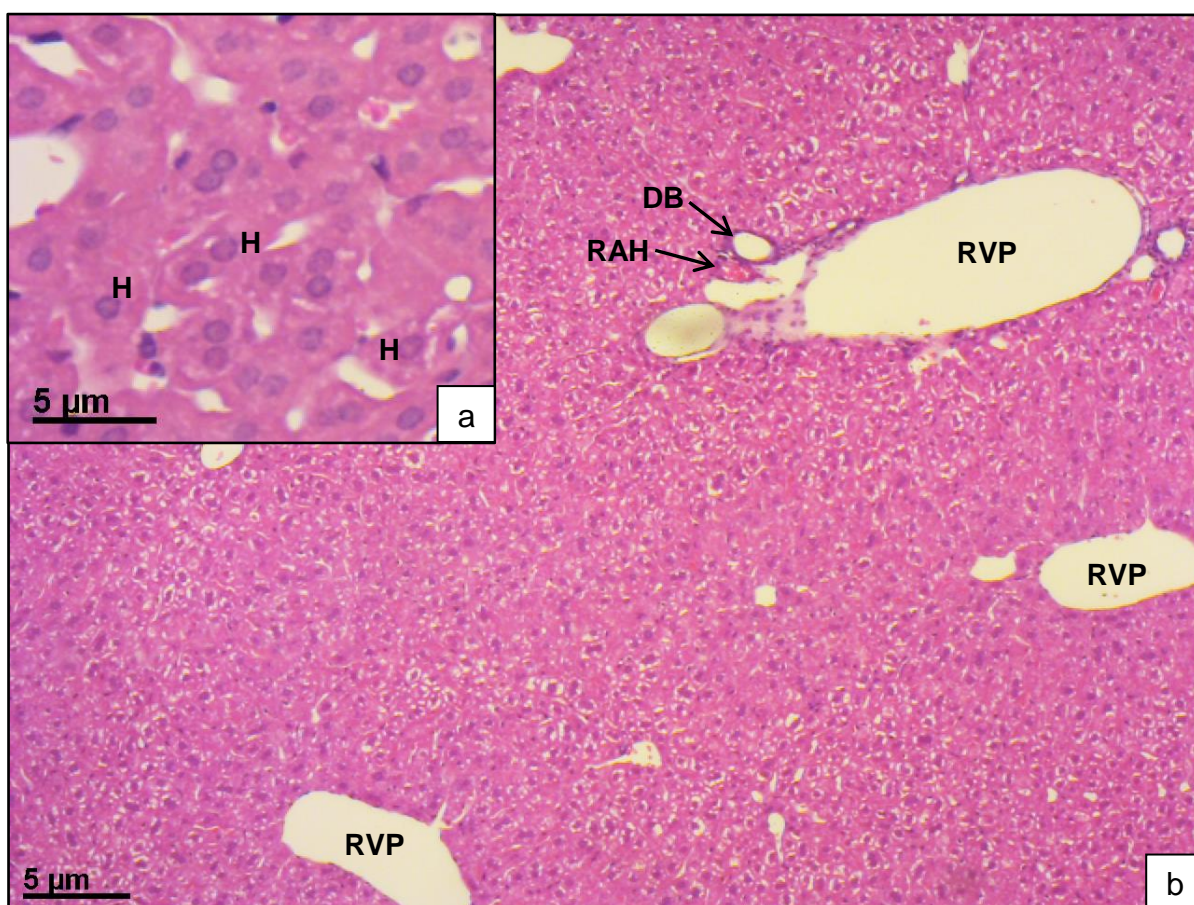


Figura 10: Corte histológico de tecido hepático de camundongo BALB/c controle negativo corado com hematoxilina e eosina. Hepatócitos (H); ramo da veia porta (RVP); ramo da artéria hepática (RAH); ducto biliar (DB).

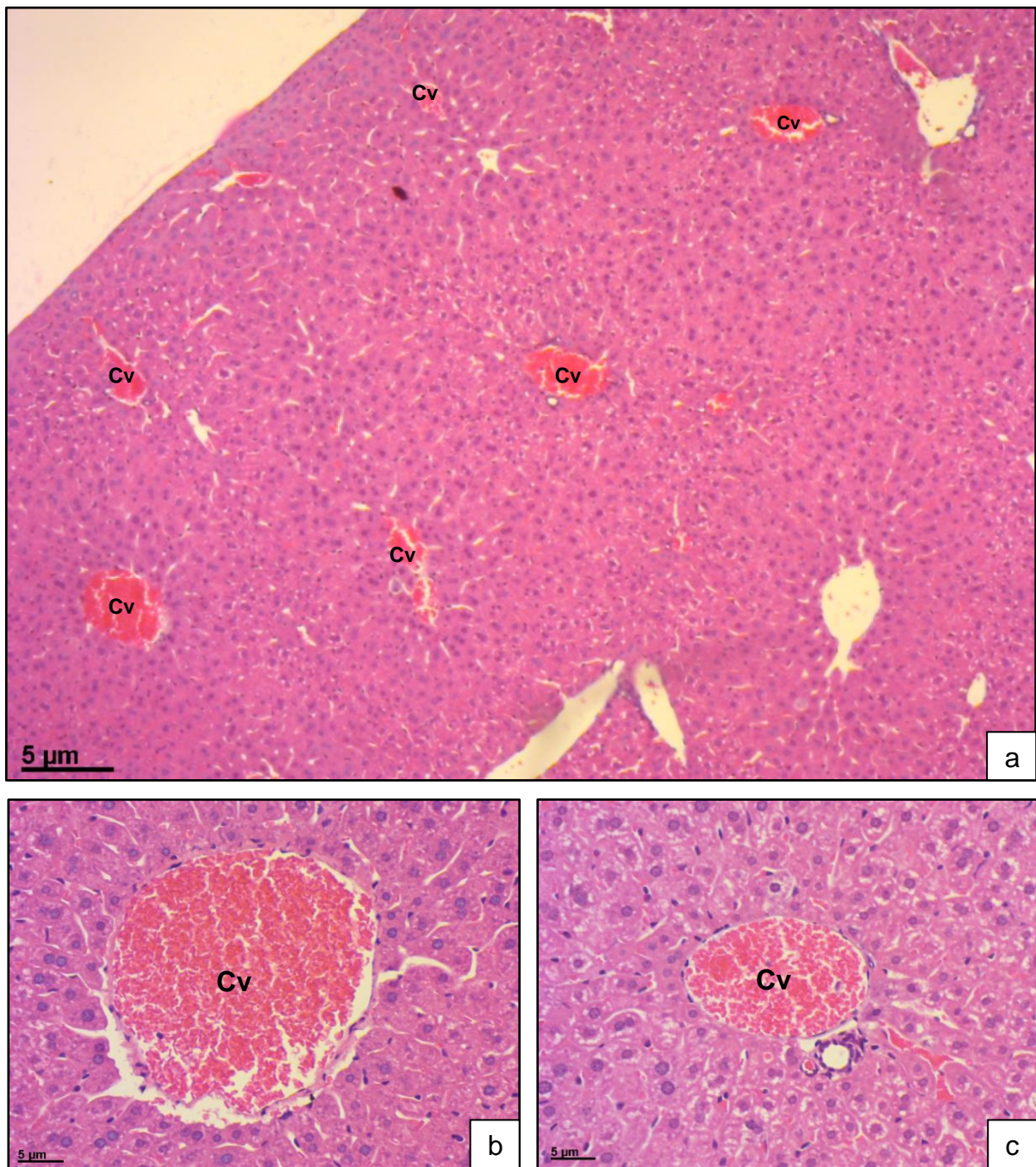


Figura 11: Áreas de congestão portal. Corte histológico de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado com DENV-4 corado com hematoxilina e eosina. **(a, b, c)** Vasos apresentando congestão vascular (CV).

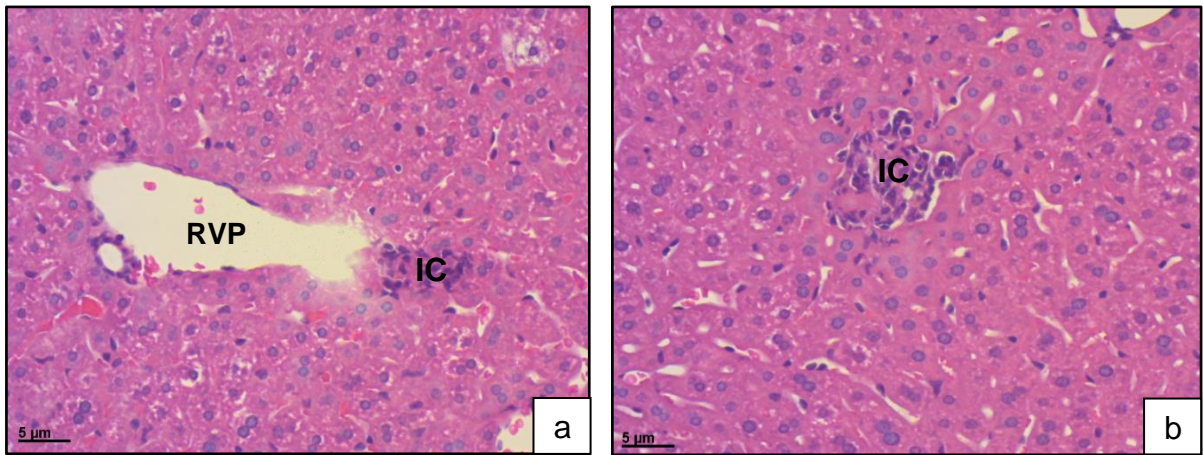


Figura 12: Presença de infiltrado inflamatório. Corte histológico de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado com DENV-4 corado com hematoxilina e eosina. **(a)** Infiltrado inflamatório (IC) próximo a um ramo da veia porta (RVP). **(b)** Infiltrado inflamatório (IC) no interstício.

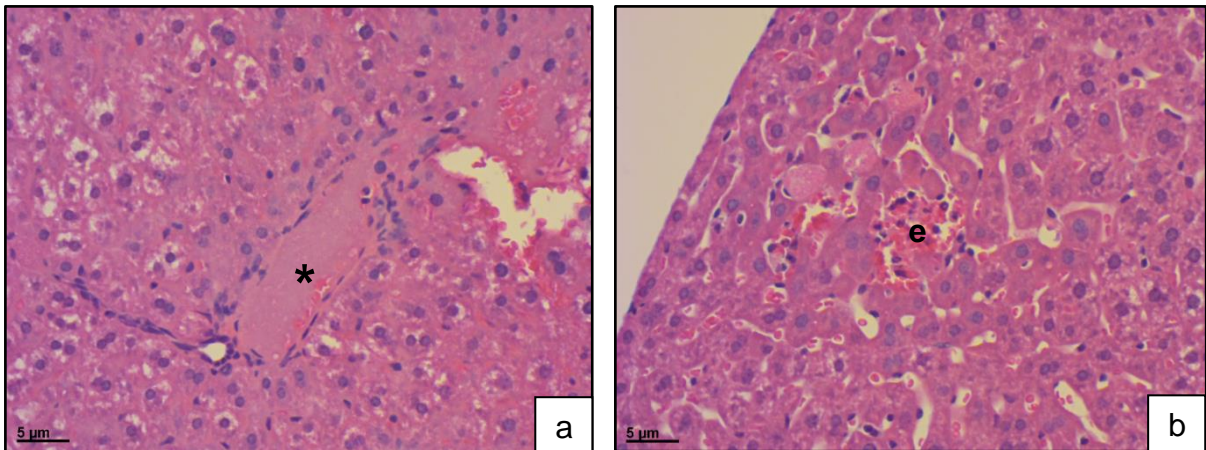


Figura 13: Presença de líquido no capilar e de eritrócitos no interstício. Corte histológico de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado com DENV-4 corado com hematoxilina e eosina. **(a)** líquido no contido no capilar (*). **(b)** Eritrócitos (e) no interstício do tecido hepático.

4.3.2 Análise histopatológica de tecido pulmonar

Em amostras de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV-4 foi observada a presença de áreas de hemorragia (Figuras 15a, 15b, 16a, 16b), espessamento do septo alveolar (Figuras 15c).

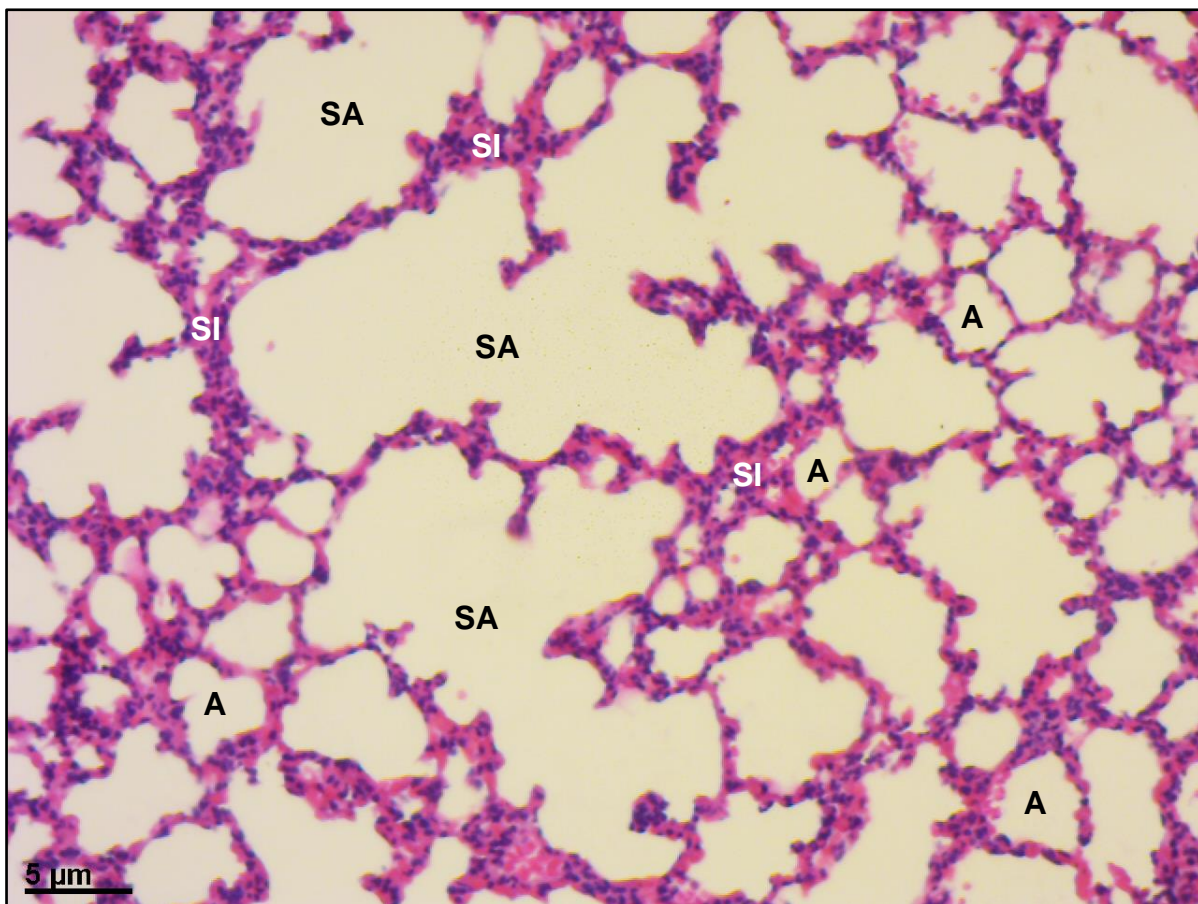


Figura 14: Corte histológico de tecido pulmonar de camundongo BALB/c controle negativo corado com hematoxilina e eosina. Saco alveolar (SA); septo interalveolar (SI); alvéolo (A).

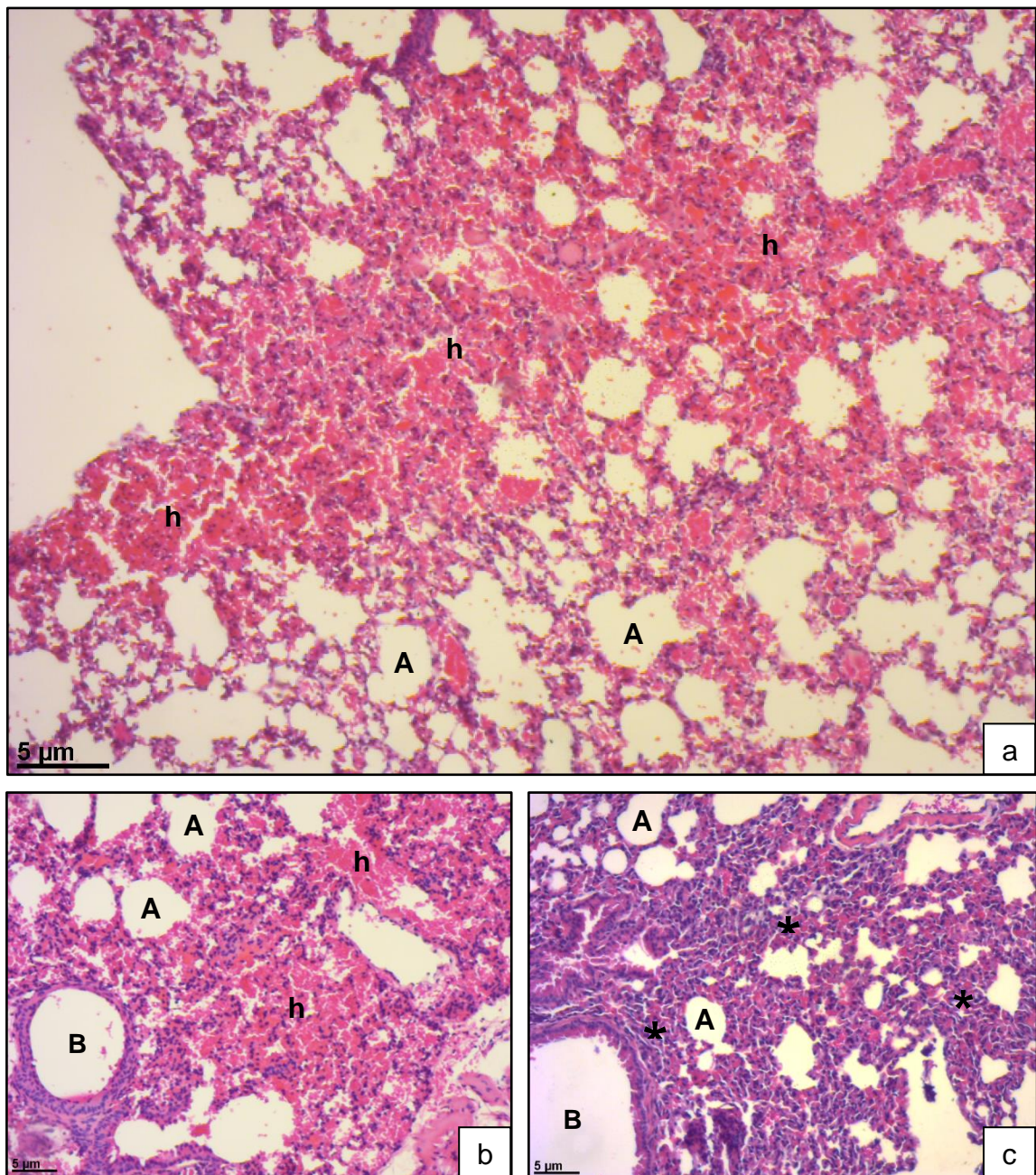


Figura 15: Áreas de hemorragia e espessamento de septo alveolar. Corte histológico de tecido pulmonar de camundongo BALB/c infectado com DENV-4 corado com hematoxilina e eosina. **(a, b)** Presença de áreas de hemorragia (h); bronquíolo (B); alveolo (A). **(c)** áreas apresentando espessamento do septo alveolar (*); bronquíolo (B); alveolo (A).

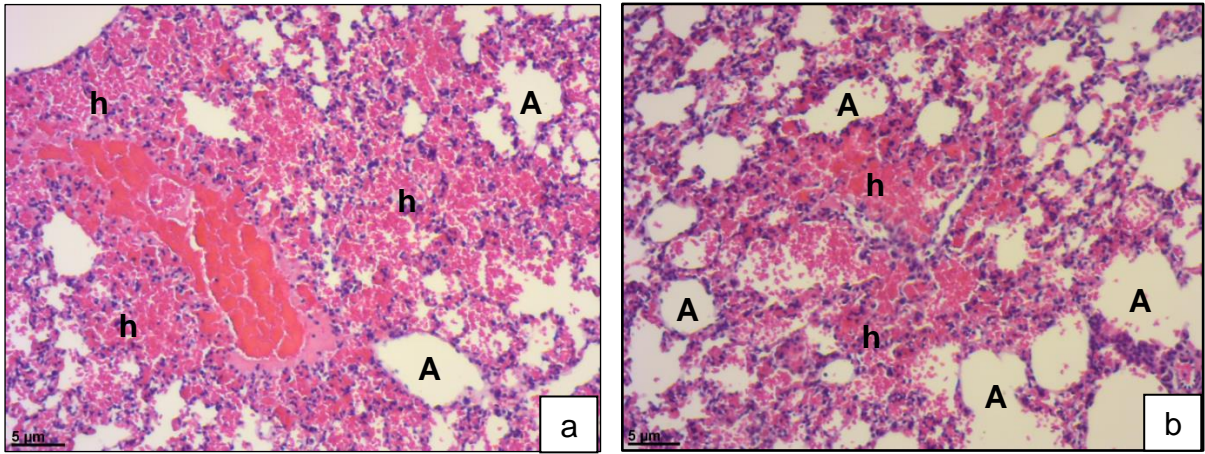


Figura 16: Presença de áreas de hemorragia. Corte histológico de tecido pulmonar de camundongo BALB/c infectado com DENV-4 corado com hematoxilina e eosina. **(a, b)** Hemorragia (h); Alveolo (A).

4.3.3 Análise histopatológica de tecido cardíaco

Em amostras de coração de camundongos BALB/c infectados com DENV-4 foi observada a presença de áreas focais de hemorragia (Figuras 18a, 18b, 18c) e presença de infiltrado inflamatório (Figuras 19a, 19b).

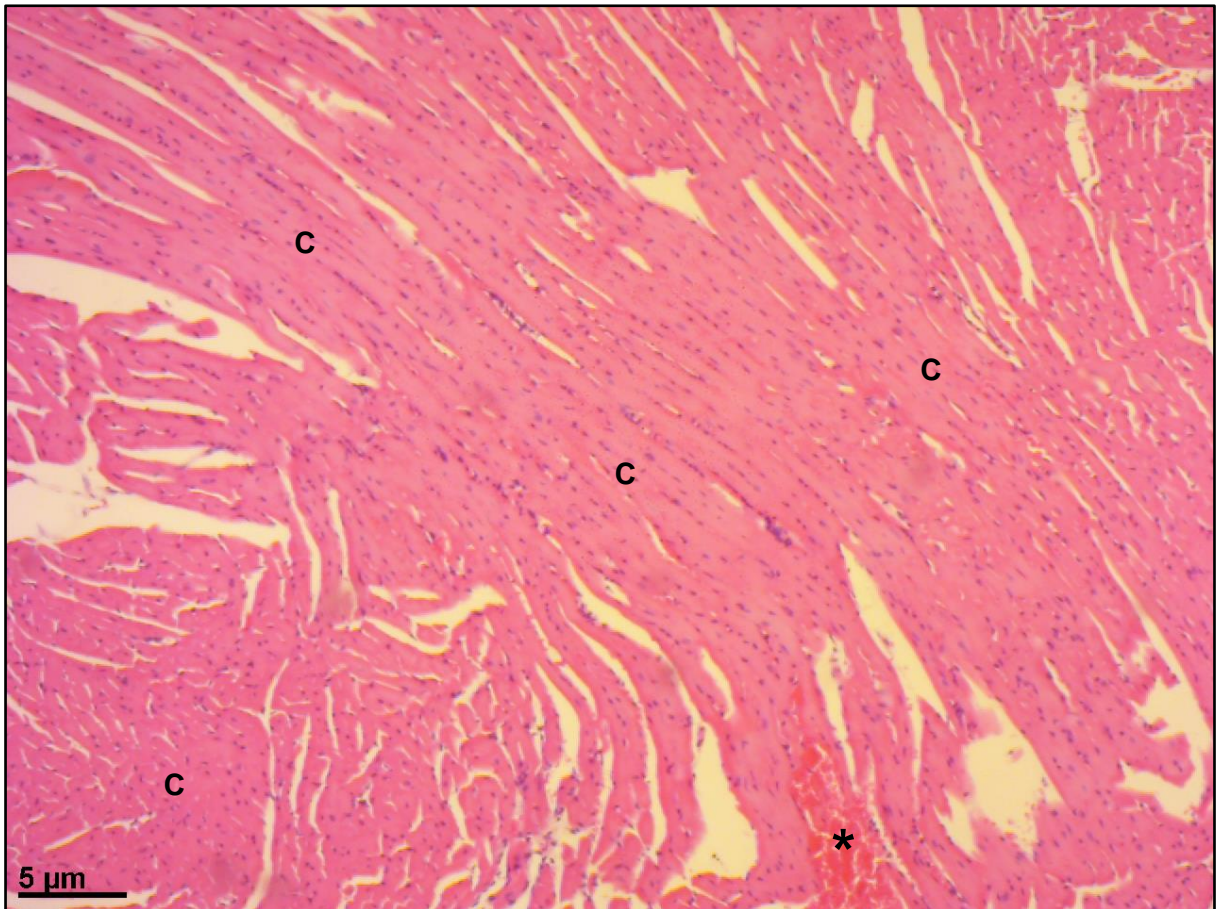


Figura 17: Corte histológico de tecido cardíaco de camundongo BALB/c controle negativo corado com hematoxilina e eosina. Cardiomiócitos (C); capilar (*).

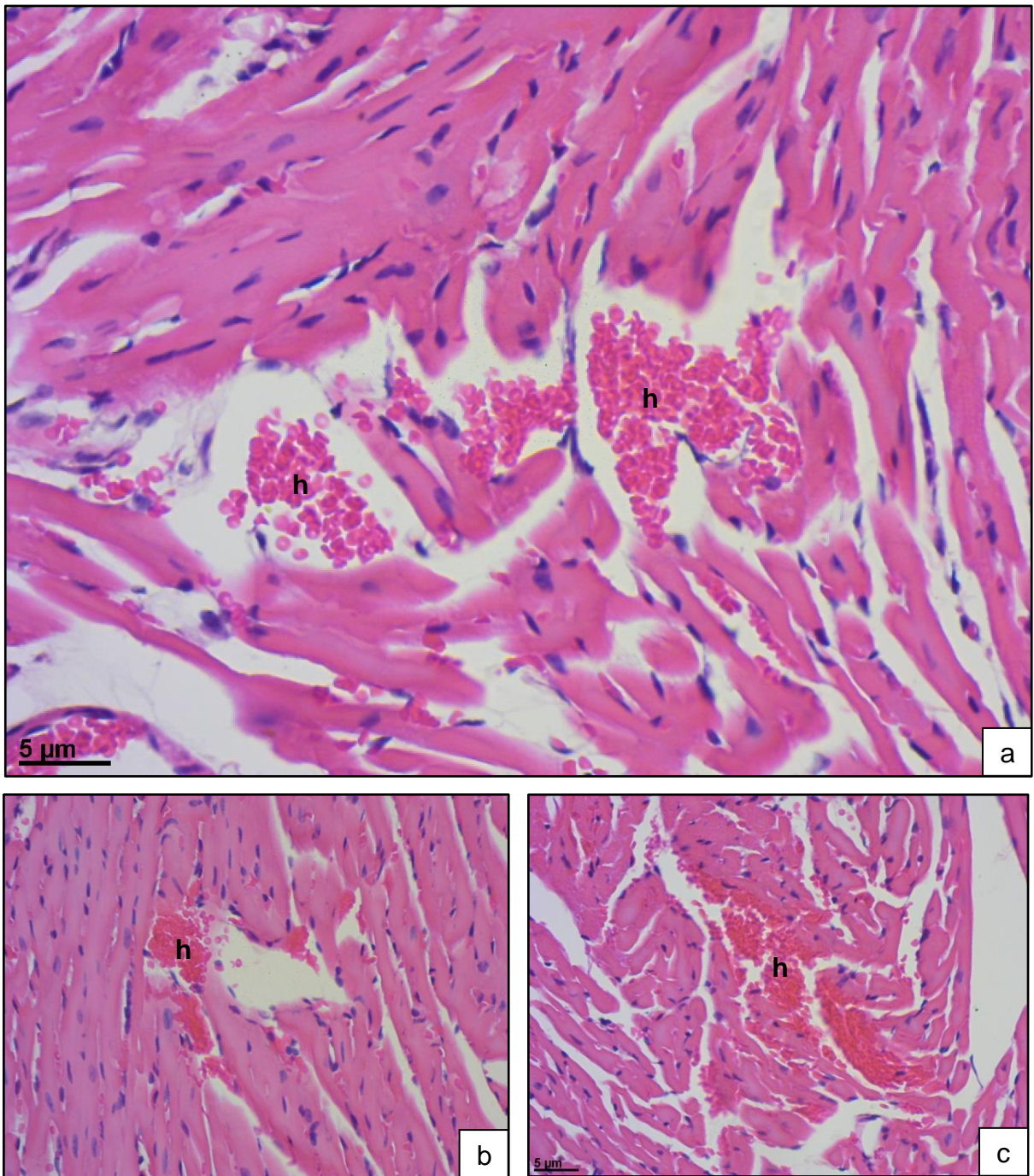


Figura 18: Áreas focais de hemorragia. Corte histológico de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado corado com hematoxilina e eosina. **(a, b, c)** Presença de áreas de hemorragia (h).

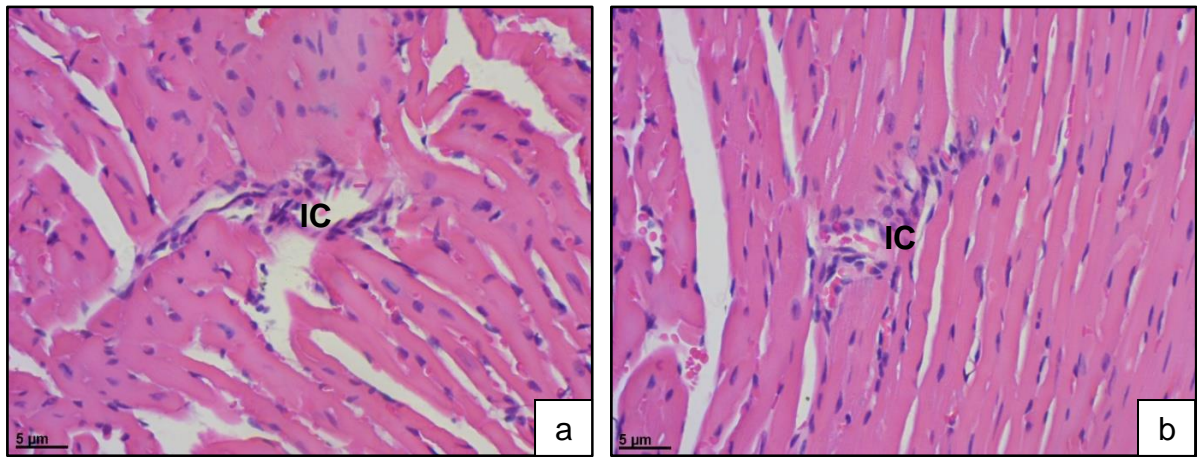


Figura 19: Presença de infiltrado inflamatório. Corte histológico de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado corado com hematoxilina e eosina. **(a, b)** Infiltrado inflamatório (IC).

4.4 Análise ultraestrutural de tecidos de camundongo BALB/c infectado experimentalmente com DENV-4

Não foram observadas alterações ultraestruturais em tecidos de camundongos dos grupos controle negativo e controle L-15 (Figuras 20, 25, 29a, 29b).

4.4.1 Análise ultraestrutural de tecido hepático

Em amostras de fígado de camundongos BALB/c infectados com DENV-4 foi observada perante análise ultraestrutural sob o microscópio eletrônico de transmissão a presença de células inflamatórias mononucleadas (Figuras 21, 22a, 22b, 22c) e polimorfonucleadas (Figuras 23b) nos capilares e no interstício, presença de plaquetas nos capilares (Figuras 22a, 22c, 22d, 23a, 23b), áreas de congestão vascular (Figura 24a) e áreas pontuais de necrose (Figura 24b).

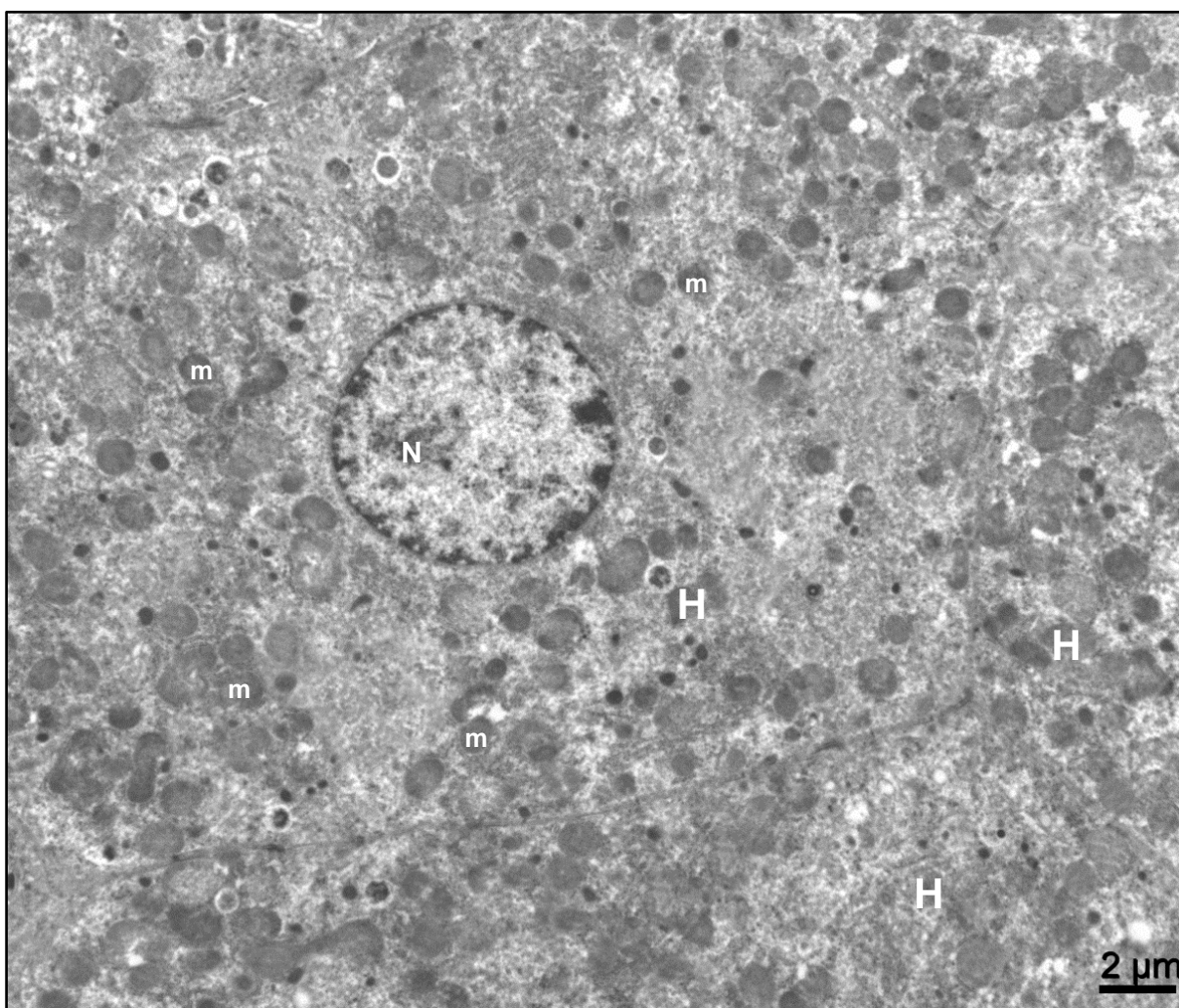


Figura 20: Micrografia eletrônica de tecido hepático de camundongo BALB/c controle negativo Hepatócito (H); núcleo do hepatócito (N); mitocôndrias (m).

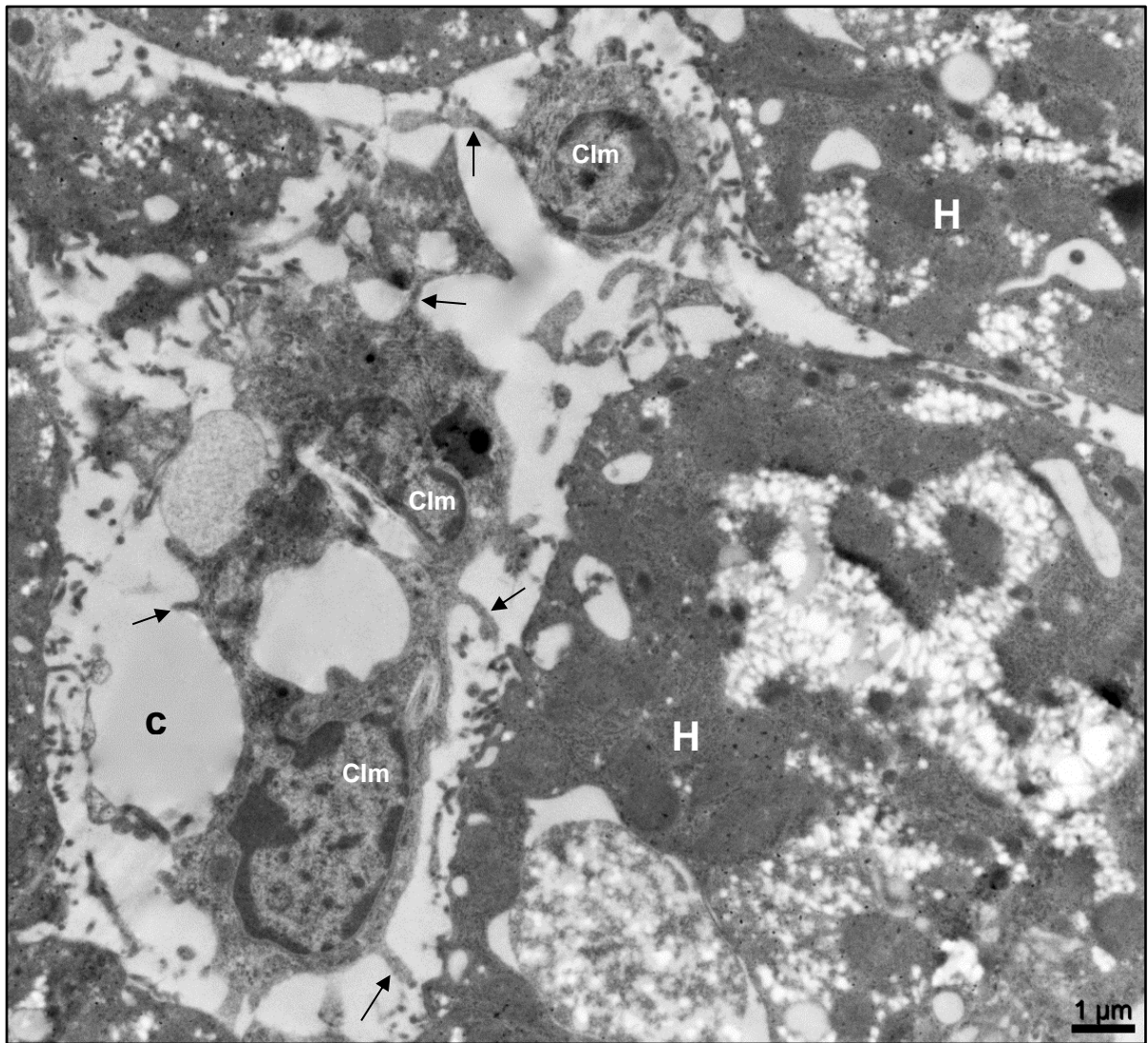


Figura 21: Células inflamatórias mononucleadas ativadas no capilar sinusóide. Micrografia eletrônica de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. Presença de células inflamatórias mononucleadas (CIm) emitindo prolongamentos de membrana (setas). Hepatócito (H); capilar sinusóide (c).

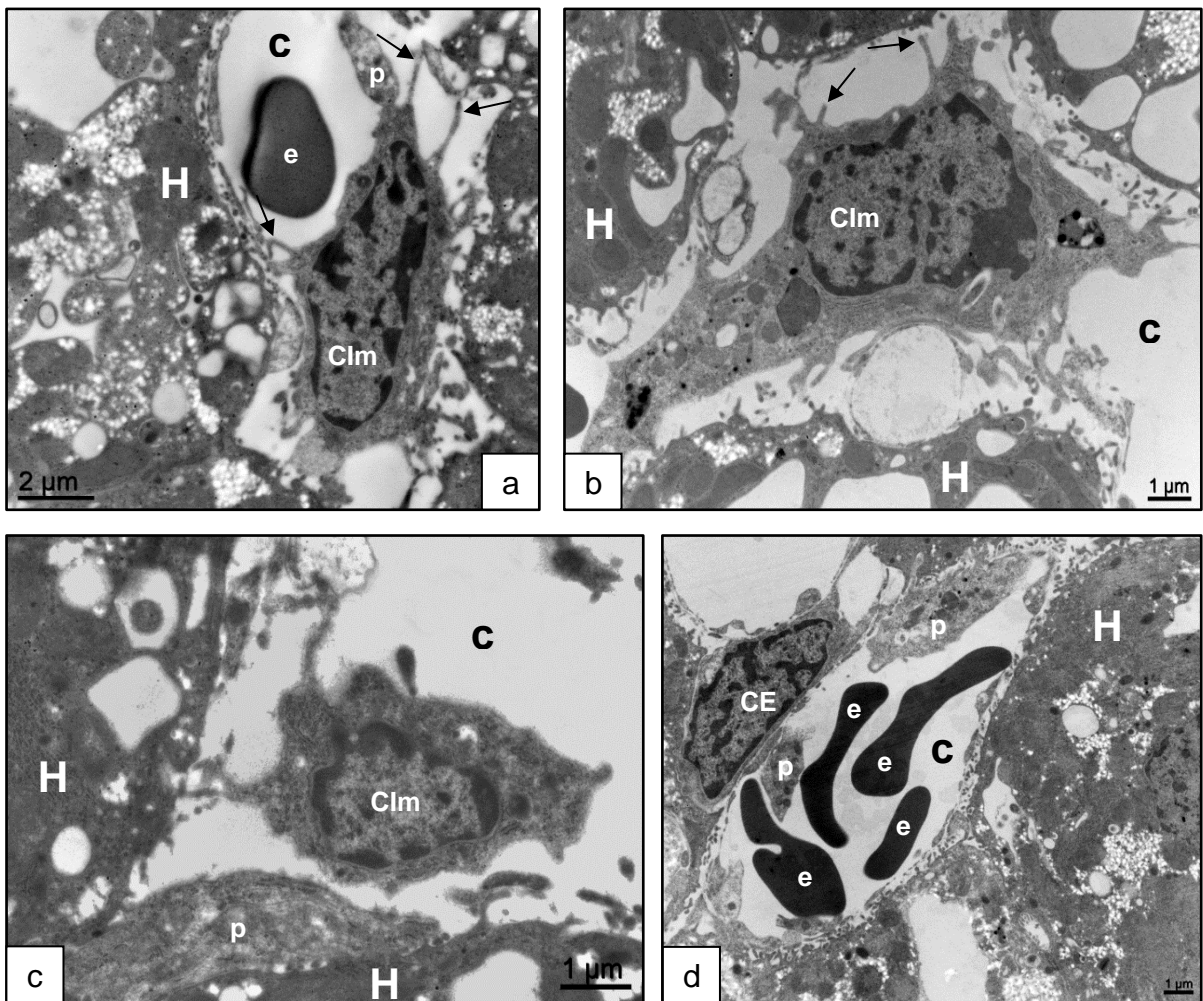


Figura 22: Células inflamatórias ativadas e plaquetas no capilar. Micrografia eletrônica de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a, b, c)** Presença de célula inflamatória mononuclear (CIm) emitindo prolongamentos de membrana (setas). **(c)** Plaqueta (p) aderida à parede do capilar **(a, d)** Presença de plaquetas (p) no capilar; hepatócito (H); capilar (c); célula endotelial (CE); eritrócitos (e).

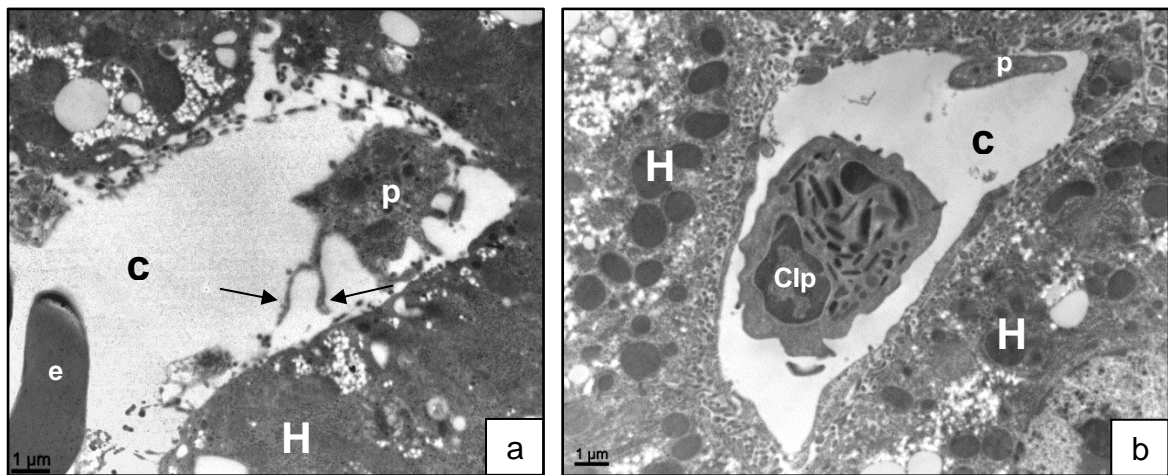


Figura 23: Plaqueta ativada e célula inflamatória polimorfonucleada no capilar.

Micrografia eletrônica de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a)** Presença de plaqueta (p) emitindo prolongamentos de membrana (seta) no capilar (c); eritrócito (e); hepatócito (H). **(b)** Célula inflamatória polimorfonucleada (Clp) do tipo eosinófilo e plaqueta (p) no capilar (c); hepatócito (H).

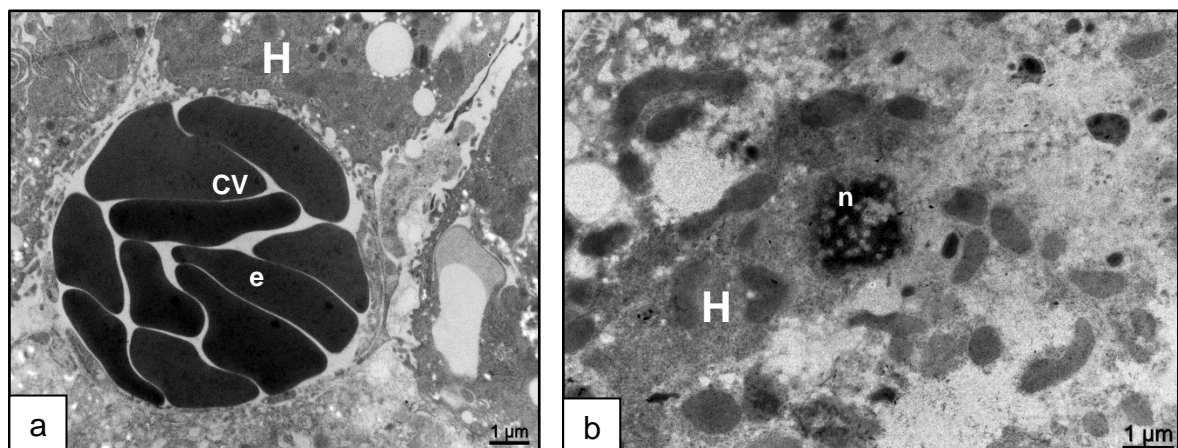


Figura 24: Capilar apresentando congestão e hepatócito apresentando núcleo picnótico.

Micrografia eletrônica de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a)** Capilar sinusóide apresentando congestão vascular (CV); eritrócito (e); hepatócito (H). **(b)** Hepatócito (H) apresentando núcleo picnótico (n).

4.4.2 Análise ultraestrutural de tecido pulmonar

Em amostras de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV-4 foi observada perante análise ultraestrutural sob o microscópio eletrônico de transmissão a presença de células inflamatórias mononucleadas (Figuras 26, 27d, 28a) e polimorfonucleadas (Figuras 26, 27a, 27b, 27c) nos capilares, presença de plaquetas nos capilares e no espaço alveolar (Figuras 26, 27a, 27b, 28a, 28b, 28c, 28d) e presença de eritrócitos no espaço alveolar (Figura 27b).

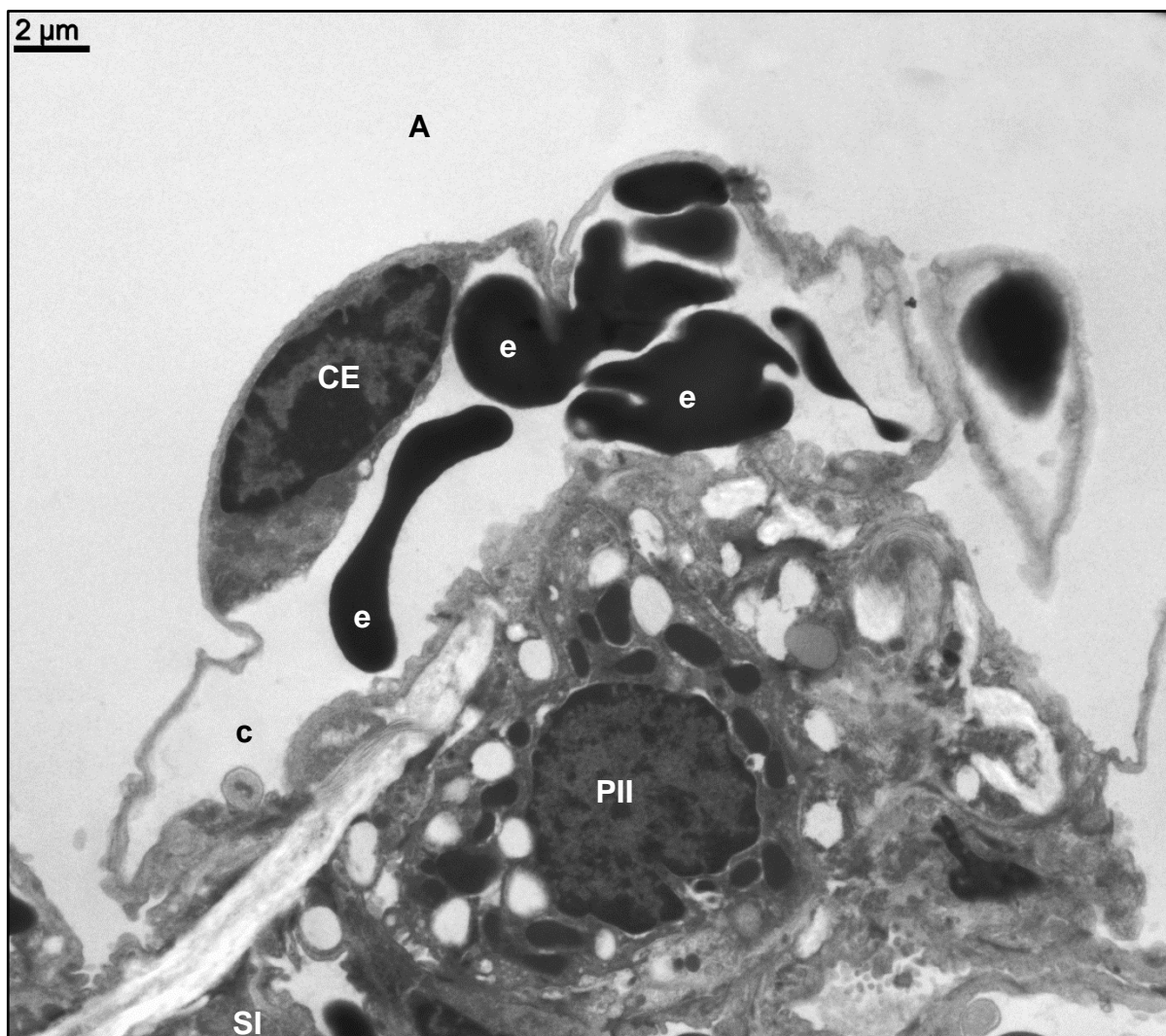


Figura 25: Micrografia eletrônica de tecido pulmonar de camundongo BALB/c controle negativo. Alvéolo (A); célula endotelial (CE); septo interalveolar (SI) pneumócito tipo II (PII); eritrócitos (e) contidos no capilar (c).

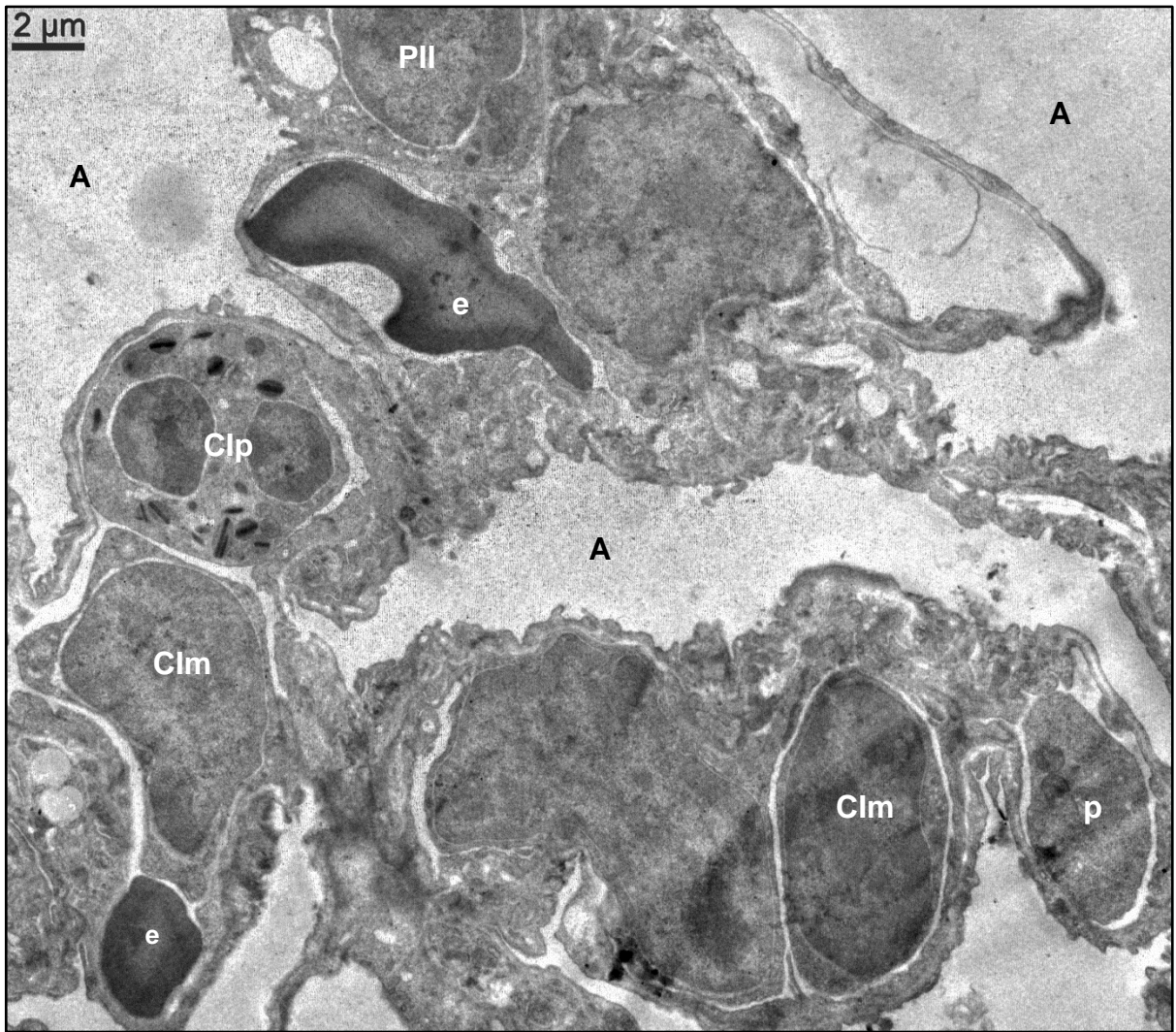


Figura 26: Células inflamatórias mononucleadas, polimorfonucleada e plaqueta no capilar. Micrografia eletrônica de tecido pulmonar de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. Presença de células inflamatórias mononucleadas (CIm), polimorfonucleada (CIp) do tipo eosinófilo e plaqueta no capilar (p); alvéolo (A); eritrócito (e); pneumócito tipo II (PII).

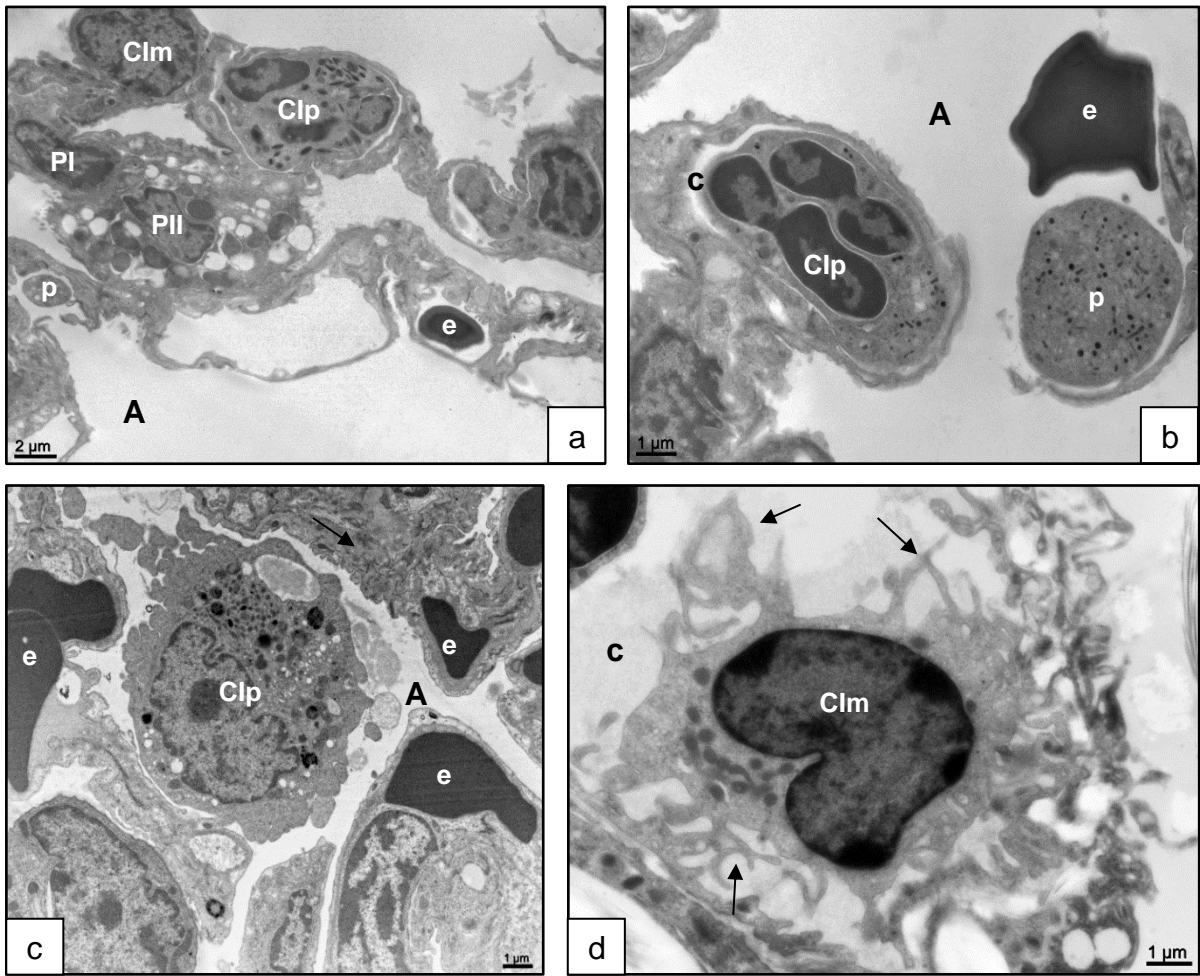


Figura 27: Células inflamatórias polimorfonucleadas no capilar e no alvéolo, células inflamatórias mononucleadas e plaquetas no capilar. Micrografia eletrônica de tecido pulmonar de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a, b, c)** Células inflamatórias polimorfonucleadas (Clp) do tipo eosinófilo (a, c) e neutrófilo (b) no capilar (c); presença de célula inflamatória mononucleada (Clm) no capilar; eritrócitos (e); plaquetas (p) no capilar e nos alvéolos (A); pneumócito tipo I (PI); pneumócito tipo II (PII). **(d)** Presença de célula inflamatória mononucleada (Clm) emitindo prolongamentos (setas) no capilar (c).

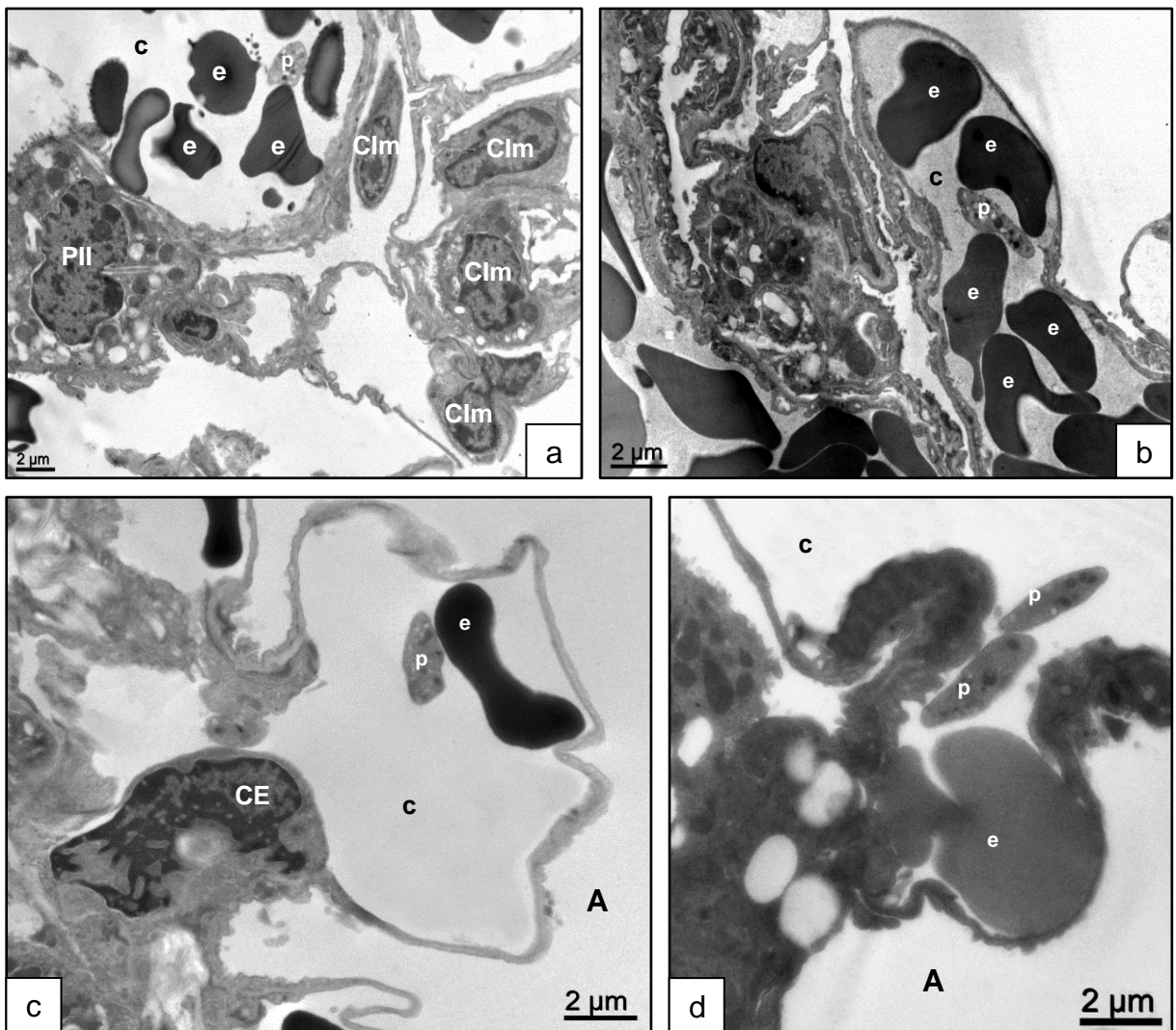


Figura 28: Células inflamatórias mononucleadas e plaquetas no capilar. Micrografia eletrônica de tecido pulmonar de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a, b)** Presença de células inflamatórias mononucleadas (Clm) e plaquetas (p) no capilar (c); pneumócito tipo II (Pll); eritrócito (e). **(c, d)** Presença de plaquetas (p) no capilar (c); eritrócitos (e); célula endotelial (CE); alvéolo (A).

4.4.3 Análise ultraestrutural de tecido cardíaco

Em amostras de coração de camundongos BALB/c infectados com DENV-4 foi observado perante análise ultraestrutural sob o microscópio eletrônico de transmissão a presença de PSD em cardiomiócitos (Figura 30), a presença de células inflamatórias mononucleadas (Figuras 32a e 32b) no interstício, presença de plaquetas (Figuras 31a, 31b, 31c, 31d, 31e, 31f, 32b) nos capilares e no interstício e alterações na estrutura dos discos intercalares (Figuras 33a, 33b, 33c).

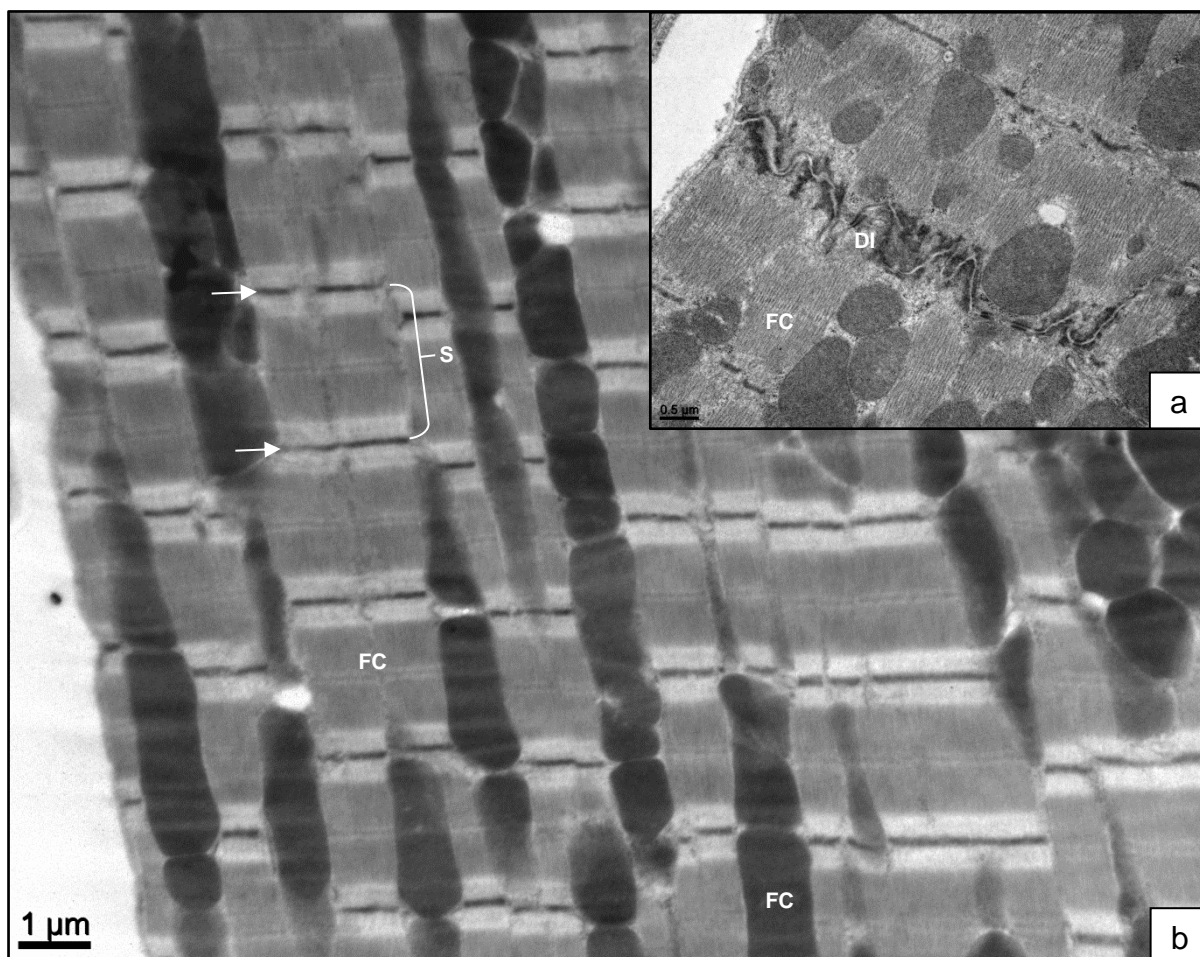


Figura 29: Micrografia eletrônica de tecido cardíaco de camundongo BALB/c não infectado. **(a)** Fibras cardíacas (FC); disco intercalar **(b)** Fibras cardíacas (FC); sarcômero (S); linha Z (setas).

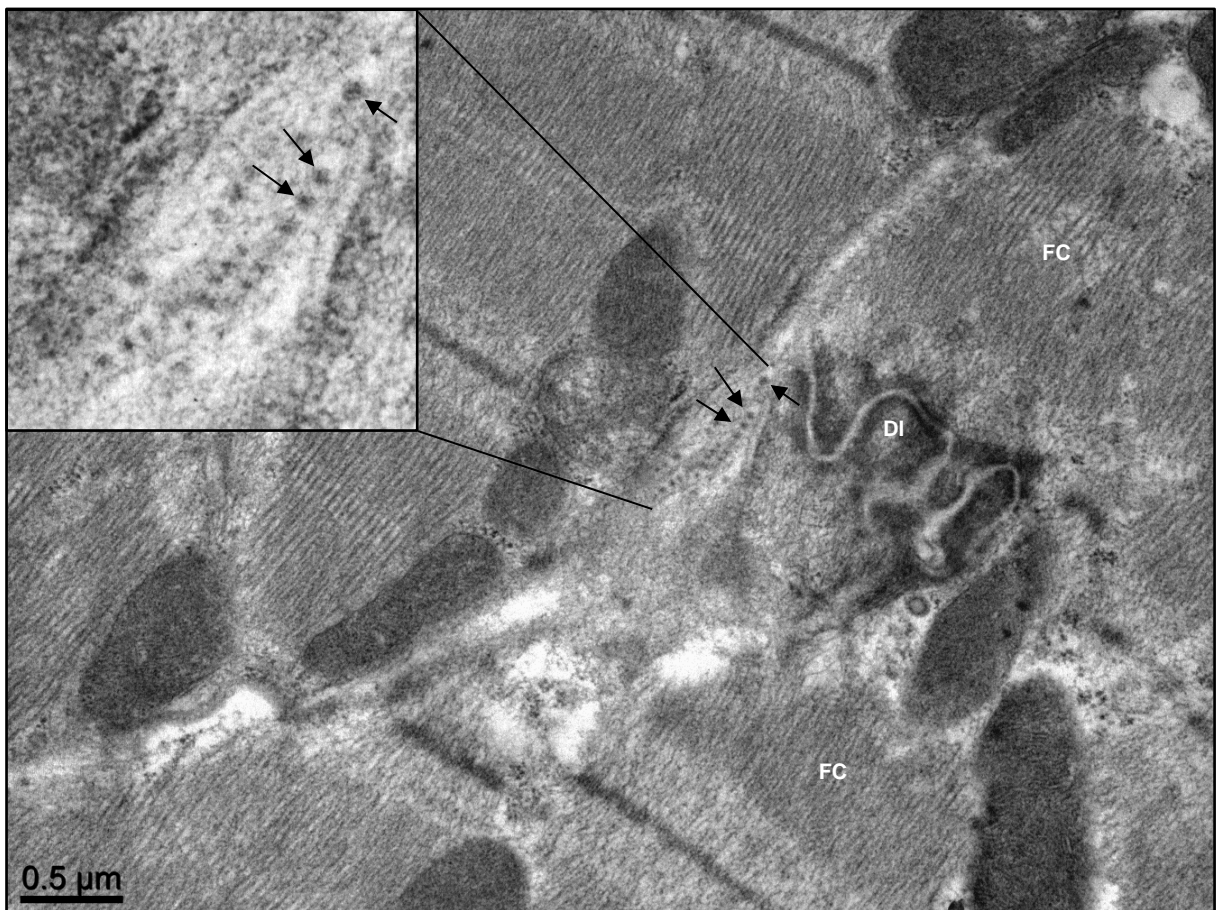


Figura 30: Partículas semelhantes a DENV. Micrografia eletrônica de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. Presença de PSD (setas) em fibras cardíacas (FC); disco intercalares (DI).

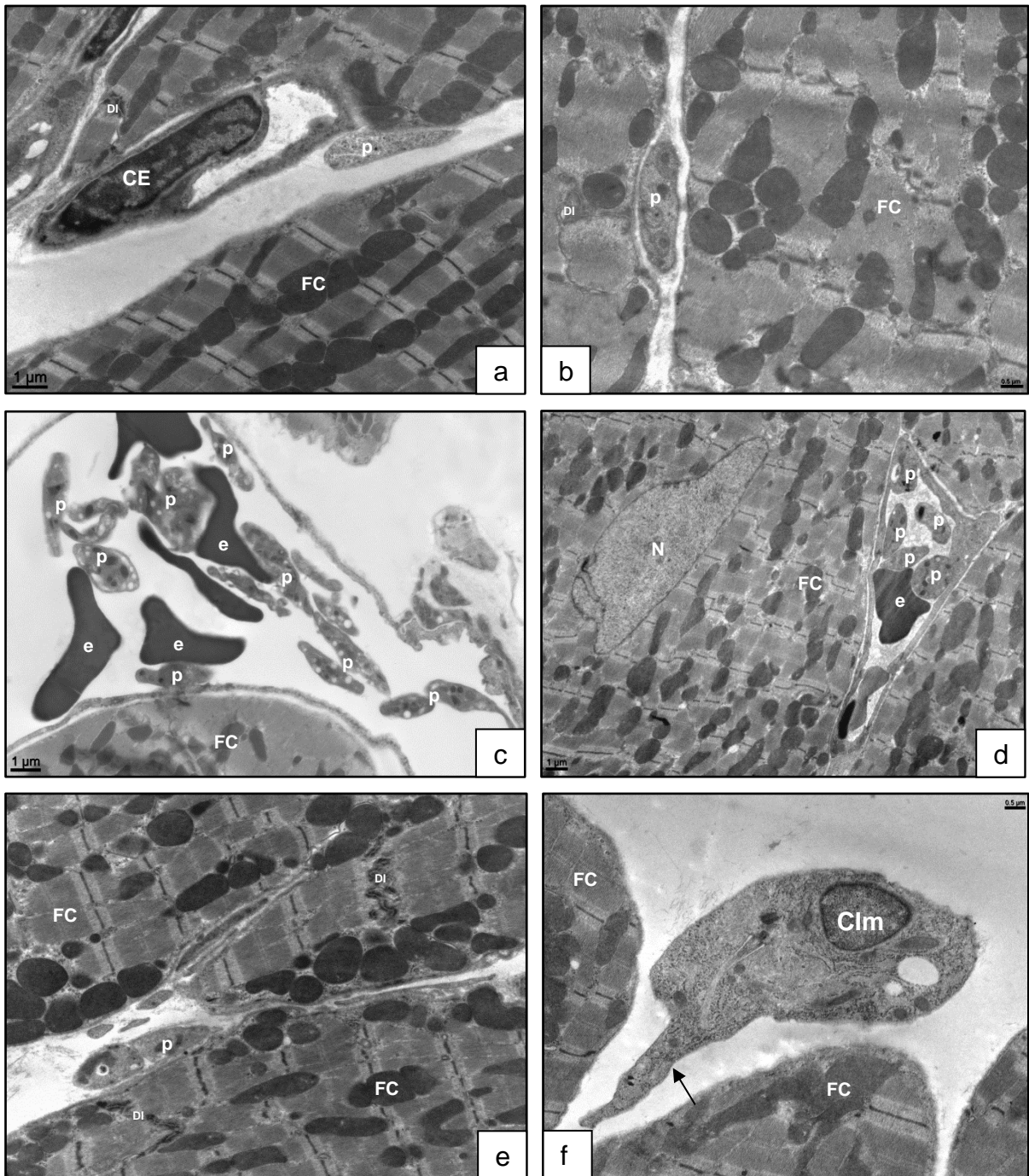


Figura 31: Presença de plaquetas no interstício, no capilar e célula inflamatória ativada. Micrografia eletrônica de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a, b)** Plaqueta (p) no interstício cardíaco; fibras cardíacas (FC); disco intercalar (DI). **(c, d)** Presença de plaquetas (p) no capilar; eritrócitos (e); Núcleo do cardiomiócito (N). **(e)** Plaqueta (p) no interstício cardíaco; fibras cardíacas (FC); disco intercalar (DI). **(f)** Célula inflamatória mononuclear (CIm) emitindo prolongamento (seta); fibras cardíacas (FC).

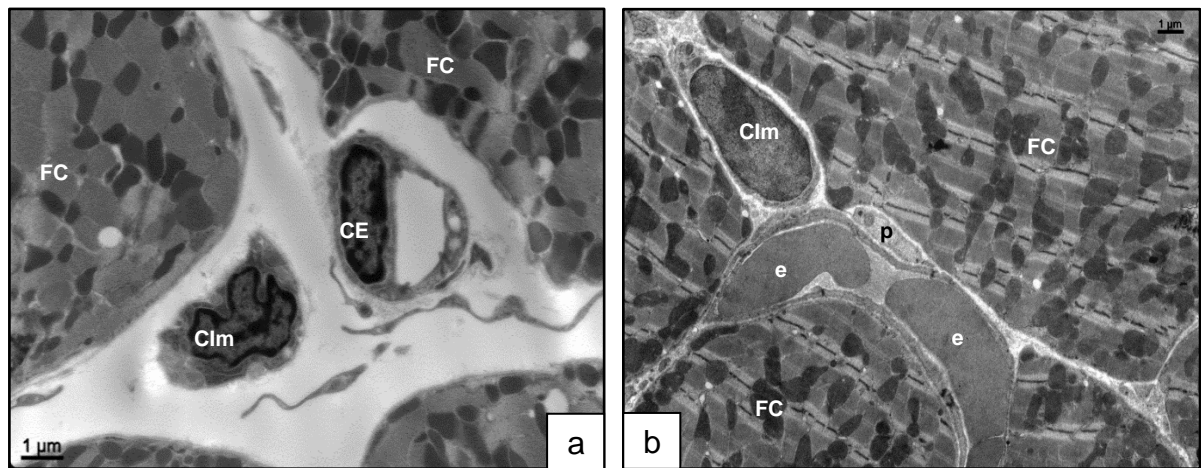


Figura 32: Células inflamatórias mononucleadas e plaquetas no interstício. Micrografia eletrônica de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a, b)** Presença de célula inflamatória mononuclear (CIm) e plaqueta (p) no interstício cardíaco; fibras cardíacas (FC); célula endotelial (CE); eritrócitos (e).

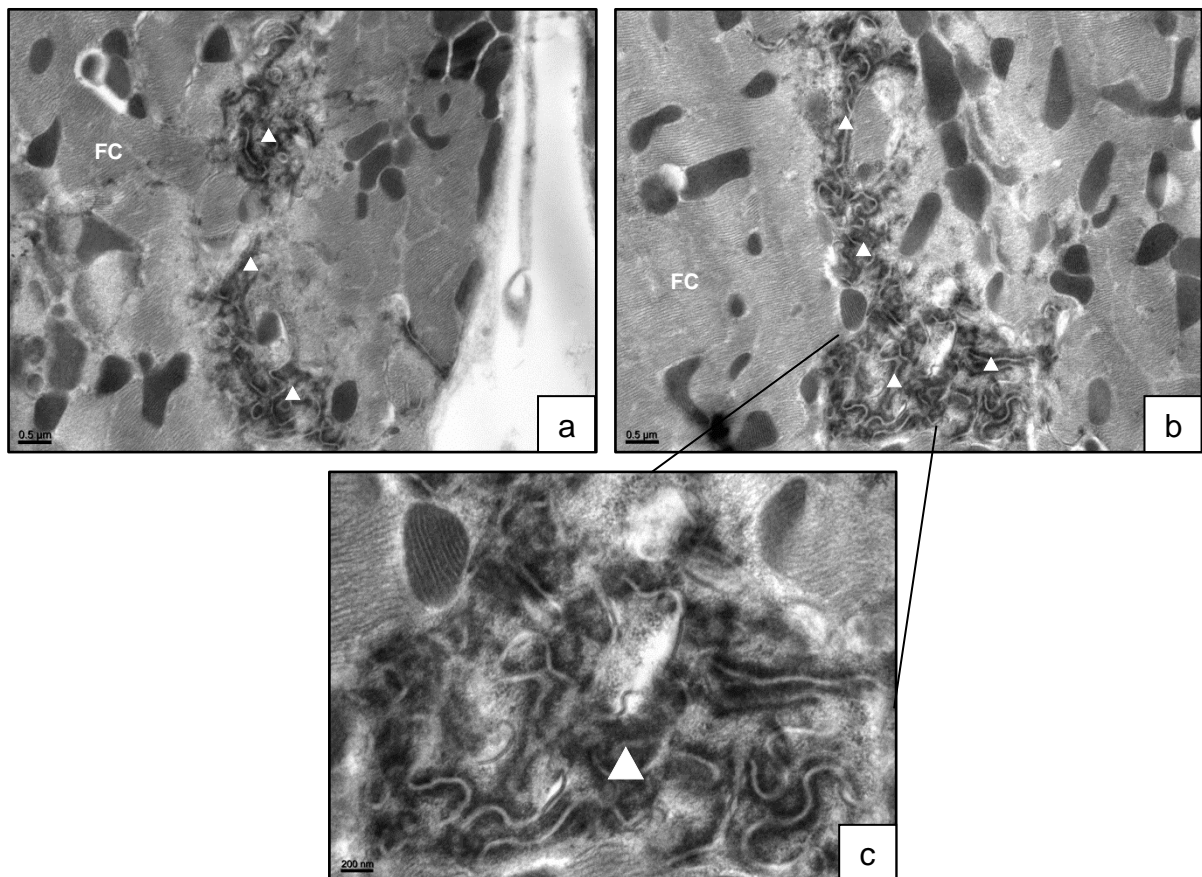


Figura 33: Presença de múltiplas áreas de intensa desorganização dos discos intercalares. Micrografia eletrônica de tecido cardíaco de camundongo BALB/c infectado com DENV-4. **(a, b, c)** Áreas de desorganização dos discos intercalares (▲); fibras cardíacas (FC).

5 Discussão

A reintrodução do DENV-4 no território brasileiro marcou a cocirculação dos 4 sorotipos no país. Enquanto o sorotipo 4 é pouco predominante entre os casos analisados pela SVS/MS, sua presença pôde ser detectada em mais de dois terços dos estados brasileiros, até 2015 (Fares et al., 2015), sendo responsável por um grande número de epidemias desde sua reintrodução, devido principalmente à susceptibilidade da população ao novo sorotipo (Braga et al., 2014; Cavalcanti et al., 2014; Tumiotto et al., 2014; Branco et al., 2015; Bertolacci-Rocha et al., 2016; Vicente et al., 2016). Apesar de casos de DENV-4 normalmente apresentarem sintomatologia mais branda e serem menos associados a hospitalizações, especialmente quando comparados a outros sorotipos (Balmaseda et al., 2006; Thomas et al., 2014; Kosasih et al., 2016), fatores como infecções secundárias por sorotipos heterólogos de DENV (Halstead, 2015) ou a interação entre a DEN e outras comorbidades, resultando muitas vezes em casos fatais (Sam et al., 2013; Amâncio et al., 2014; Kumar et al., 2016;), podem se revelar severos agravantes durante o curso de uma doença que não apresentaria, caso contrário, maiores intercorrências.

Até o momento, fatores determinantes para a ocorrência de casos de dengue grave ainda não são totalmente compreendidos, sendo o estabelecimento de um modelo animal para infecções experimentais por DENV um desenvolvimento essencial para o entendimento dos mecanismos por trás da evolução de casos mais severos de DEN (Zellweger e Shresta, 2014). Grande parte dos modelos sugeridos na literatura fazem uso de animais humanizados ou imunodeficientes (del Angel et al., 2014; Zellweger e Shresta, 2014; Sarathy et al., 2015) e de vias de inoculação invasivas e inóculos virais neuroadaptados (Schlesinger et al., 1987; Atrasheuskaya et al., 2003; França et al., 2010; Costa et al., 2011; Lazo et al., 2014; Oliveira et al., 2016), o que dificulta a compreensão dos mecanismos da patogênese viral, por se distanciarem do modo como ocorrem na infecção natural de casos humanos.

Embora alguns trabalhos ressaltem a baixa competência de modelos imunocompetentes em apresentar viremia quando infectados com inóculos produzidos a partir de isolado clínico de DENV, a exceção de animais neonatos ou quando realizada a inoculação do vírus por via IC (Zompi e Harris, 2012; Runtuwene et al., 2014; Zellweger e Shresta, 2014), estudos prévios realizados no LMMV, IOC, Fiocruz não apenas demonstraram que camundongos BALB/c infectados experimentalmente com inóculo não neuroadaptado de DENV-1, DENV-2 e DENV-3

produzido a partir de isolado clínico pelas via IP e IV apresentaram viremia, como também alterações teciduais características de infecção por DENV, semelhante às observadas em casos humanos (Paes et al., 2005; Barth et al., 2006; Barreto et al., 2002; 2007; Rasinhas, 2013; Barreto-Vieira et al., 2015; Jácome, 2015; Caldas et al., 2016).

A análise da temperatura retal dos camundongos em momentos pré-infecção e 72 h.p.i. revelou um aumento médio de valores que variam entre 1,5°C e 2°C, três dias após a inoculação do vírus. Embora não existam estudos na literatura que estabeleçam valores para uma temperatura febril específica em camundongos BALB/c, dados do Jackson Laboratory sugerem valores padrão da temperatura basal de camundongos de laboratório de 36,9°C (Green, 1968; Mouse Genome Informatics, 2016). De um modo geral, aumentos significativos da temperatura basal caracterizam alterações metabólicas e fisiológicas no organismo do animal, não detectadas em condições de não infecção. A ausência de aumento de temperatura em alguns camundongos infectados por DENV pode estar associada a um quadro de DEN assintomático ou a um período de incubação prolongado.

Os DENV são capazes de infectar um amplo espectro de tipos celulares em diferentes tecidos e órgãos. O vRNA de DENV pode ser detectado através de RT-PCR e qRT-PCR em soro de pacientes humanos infectados (Lardo et al., 2016) assim como em baço, fígado, pulmão, coração, cérebro, rim e linfonodo (Sariol et al., 1999; Rosen et al., 1999; Lima et al., 2011; Bhatnagar et al., 2012, Marques et al., 2013). Também foi detectado vRNA em sangue extraído diretamente de coração de caso de óbito (Rosen et al., 1999). Limonta et al. (2012) descreveu a detecção de DENV em caso de óbito humano por técnica molecular, assim como a observação de PSD perante microscopia eletrônica de transmissão em tecido esplênico, hepático, cardíaco e pulmonar. O antígeno viral do DENV já foi detectado através de imunomarcção em hepatócitos, células de Kupffer, MΦ alveolares, CE, células inflamatórias e fibras musculares cardíacas (Basílio-de-Oliveira et al., 2005; Rivera et al., 2014).

Em camundongos BALB/c, Paes et al. (2005) demonstraram a presença de vRNA de DENV em tecido hepático e soro, através da técnica de RT-PCR, assim como a presença de antígenos virais em hepatócitos, CE hepáticas e soro, através de ensaio imunohistoquímico. A detecção de vRNA de DENV em camundongos BALB/c também foi descrita por Rasinhas et al. (2013) em tecido cardíaco e soro, por Jácome

et al. (2015) em coração, fígado, pulmão, cérebro, baço e soro e por Caldas (2016) em baço, cerebelo, fígado, pulmão e rim.

No presente trabalho, o vRNA foi detectado com sucesso na saliva de 2 animais, de um total de 15 amostras coletadas. Até o presente momento, não existem na literatura relatos da detecção do vRNA de DENV em saliva de camundongos. Existem relatos na literatura da detecção do genoma viral em saliva de pacientes infectados por DENV através de qRT-PCR. Andries et al. (2015) demonstrou que em um grupo de 562 casos confirmados de DEN, apenas 132 apresentaram o genoma viral na saliva. O vRNA também foi detectado com sucesso na saliva de dois pacientes apresentando sinais e sintomas de DEN, infectados com DENV-2 e DENV-3 (Poloni et al., 2010). Além disso, diversos estudos relatam a detecção de anticorpos (IgA, IgG e IgM) específicos para DENV em saliva de pacientes infectados (Cuzzubbo et al., 1998; Balmaseda et al., 2003; Yap et al., 2011; Anders et al., 2012; Andries et al., 2015).

Neste estudo, o vRNA foi detectado em tecido hepático, pulmonar e cardíaco de camundongos BALB/c, inoculados por via IV com inóculo não neuroadaptado de DENV-4. Levando-se em consideração a via de inoculação utilizada, o título do inóculo, e o tecido alvo alcançado pelo vírus, pode-se concluir que houve disseminação sistêmica do vírus pelo sangue (viremia). Ademais, o genoma viral também foi detectado em amostras de saliva de camundongos, embora em menor quantidade de animais, de acordo com o que é observado em casos humanos. Títulos virais bastante elevados, da ordem de 10^9 , foram identificados nos três órgãos estudados, sugerindo a replicação do vírus no tecido.

Alterações em tecido hepático estão entre as mais observadas em infecções por DENV, sendo especialmente associadas a casos de dengue grave (Fernando et al., 2016). Pacientes humanos normalmente apresentam quadros de icterícia, hepatite aguda, hepatomegalia, falência hepática e níveis elevados de albumina sérica. A elevação dos níveis das enzimas AST e ALT pode ser mais comumente observada em casos de infecção secundária (Kularatne et al., 2005; Gulati e Maheshwari, 2007; Sam et al., 2013; Arora et al., 2015; Motimath et al., 2016). Macroscopicamente, diversas áreas de congestão vascular, assim como vários focos hemorrágicos podem ser observados. Perante microscopia fotônica diversas áreas apresentando infiltrado inflamatório podem ser observadas próximo ao espaço porta, além de vacuolização focal do citoplasma de hepatócitos, áreas apresentando congestão hemorrágica,

presença de infiltrado inflamatório em capilares sinusóides, hiperplasia de células de Kupffer e inclusões lipídicas (Basílio-de-Oliveira et al., 2005; Gulati e Maheshwari, 2007; Póvoa et al., 2014). Alterações ultraestruturais observadas incluem micro e macroesteatose, áreas focais de necrose com presença de infiltrado inflamatório mononuclear, ingurgitamento mitocondrial, característico do processo apoptótico, e áreas de hemorragia e edema (Póvoa et al., 2014).

Camundongos BALB/c infectados experimentalmente pelas vias IP e IV com inóculos não neuroadaptados de DENV-2 isolado de caso humano apresentaram, áreas de congestão das veias porta e centrolobular, esteatose difusa em hepatócitos próximos a veia centrolobular, células de Kupffer hiperplásicas, células inflamatórias no interstício e espaço porta, células inflamatórias e plaquetas no interior de capilares sinusóides, CE apresentando inclusões eletrondensas no citoplasma, presença de edema e áreas focais de necrose, presença de Mo e linfócitos em capilares sinusóides e de infiltrado linfocítico próximo ao espaço porta. Hepatócitos apresentaram inclusões nucleares de conteúdo semelhante a lipídios (Paes et al., 2005; Barth et al., 2006; Jácome et al., 2015; Caldas, 2016).

As análises histopatológicas e ultraestruturais de tecido hepático de camundongo BALB/c infectado experimentalmente pela via IV com inóculos não neuroadaptados de DENV-4 realizados neste estudo revelaram a presença de diversos vasos apresentando congestão, áreas apresentando infiltrado inflamatório mononuclear, especialmente na proximidade do espaço porta, e áreas focais de hemorragia. Perante a análise ultraestrutural pôde ser observada ampla presença de células inflamatórias mononucleadas ativadas no capilar e no interstício, presença de plaquetas ativadas no capilar, áreas de congestão vascular e pontos focais de necrose. Tais resultados correspondem a muitas das alterações observadas em camundongos descritas por Paes et al. (2005), Barth et al. (2006), Jácome et al. (2015) e Caldas (2016), à exceção da presença de células de Kupffer hiperplásicas, células com sinal de vacuolização, CE apresentando inclusões eletrondensas e presença de edema. A presença de esteatose não pode ser observada, possivelmente devido ao mal estado de fixação do tecido. Quanto a pacientes humanos, as alterações observadas em fígado convergem às apresentadas pela análise de casos de óbito, apresentando perfis semelhantes de quadros hemorrágicos, de inflamação e de congestão vascular, como anteriormente exposto. Apesar da detecção do vRNA em

figado de camundongos infectados, PSD não foram observadas perante análise ultraestrutural do tecido.

Manifestações pulmonares em casos humanos de infecção por DENV são incomuns, entretanto, alterações como espessamento peribrônquico, congestão pulmonar bilateral, efusões pleurais, hemoptise e pneumonite já foram relatadas (Marchiori et al., 2009; Lee et al., 2010). O raio-X torácico revelou opacidades em ambos os lobos pulmonares, condizente com quadro de hemorragia pulmonar, que embora raro, é bastante severo (Sharma et al., 2007). Manifestações mais incomuns incluem a síndrome do desconforto respiratório agudo e disfunção pulmonar (Gulati e Maheshwari, 2007).

Análises histopatológicas e ultraestruturais de tecido pulmonar de casos fatais de DEN revelaram pneumonia intersticial, espessamento do septo alveolar, infiltrado difuso de células mononucleadas e polimorfonucleadas, áreas de congestão alveolar, surgimento de membrana hialina, hiperplasia de pneumócitos tipo II, recrutamento de plaquetas, áreas de hemorragia e edema, e presença de partículas virais no endotélio (Basílio-de-Oliveira et al., 2005; Marchiori et al., 2009; Póvoa et al., 2014; Rodrigues et al., 2014).

A análise de tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados experimentalmente pelas vias IP e IV com inóculos não neuroadaptados de DENV-2 isolado de caso humano revelou a presença de pneumonia intersticial, espessamento do septo alveolar, congestão vascular, presença de MΦ alveolares e eritrócitos no espaço alveolar, infiltrado peribronquiolar, recrutamento de plaquetas, células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleadas no interior de vasos sanguíneos, emissão de filopódios por CE e áreas focais de hemorragia (Barth et al., 2006; Barreto et al., 2002; 2007; Jácome et al., 2015).

Alterações observadas no presente estudo, que incluem espessamento do septo alveolar, pneumonia intersticial, áreas de hemorragia, presença de infiltrado inflamatório, recrutamento de plaquetas, presença de eritrócitos no espaço alveolar e presença de células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleadas corroboram os achados previamente descritos em camundongos BALB/c por Barreto et al. (2002, 2007), Barth et al. (2006), e Jácome et al. (2015). Os resultados observados neste estudo apresentam características em comum com os achados histopatológicos descritos em casos de óbito humano, entretanto, não foi observada a formação de membrana hialina no tecido pulmonar e presença de edema, assim como hiperplasia

de pneumócitos tipo II, que aparentavam aspecto normal. Também não foi observada a presença de PSD em tecido pulmonar, embora o genoma viral tenha sido detectado por técnica molecular.

Até o momento, a sintomatologia e a histopatologia do coração na infecção por DENV ainda são pouco estudadas (Shivanthan et al., 2015). Aspectos anormais do funcionamento cardíaco observados em infecção por DENV incluem taquicardia sinusual, aumento da pressão jugular, alterações do ritmo cardíaco e edema intersticial (Gupta e Gadpayle, 2010), além de disfunção sistólica ventricular bilateral, esta última observada mais comumente em casos de dengue grave (Yacoub et al., 2012). Casos de miocardite são raros em infecções por DENV e em muitas situações, assintomáticos, embora estejam entre os achados mais comuns observados em tecido cardíaco (Promphan et al., 2004; Weerakoon et al., 2011; Bhasin et al., 2013; Marques et al., 2013; Tahir et al., 2015; Arora e Patil, 2016; Aslam et al., 2016) e podendo apresentar evoluções clínicas severas, como hipotensão, arritmia, desvio da condução átrio ventricular, insuficiência circulatória e choque cardiogênico (Veloso et al., 2003; Kularatne et al., 2005; Salgado et al., 2010; Sam et al., 2013; Navinan et al., 2015; Sheetal e Jacob, 2016).

A radiografia de paciente humano com quadro confirmado de DEN revelou um quadro progressivo de cardiomegalia (Lee et al., 2010; Pereda et al., 2015) e a análise histopatológica e ultraestrutural de tecido cardíaco de casos de óbito por DEN revelou a presença de alterações nucleares e mitocondriais, degeneração de fibras cardíacas, hemorragia, edema intersticial, infiltrado inflamatório difuso e presença de MΦ no miocárdio (Miranda et al., 2013; Póvoa et al., 2014; Shivanthan et al., 2015).

Um estudo realizado por Rasinhas et al. (2013) revelou em tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados pelas vias IP e IV com inóculos de DENV-1 e DENV-2 amplas áreas de infiltrado inflamatório e células cardíacas com rarefação do citoplasma. Em análise ultraestrutural foi observada a presença de células inflamatórias e plaquetas em capilares e desorganização de fibras cardíacas. Além disso, Jácome et al. (2015) demonstrou que camundongos BALB/c infectados com cepas não neuroadaptadas de duas linhagens distintas de DENV-2 pelas vias IP e IV apresentaram células inflamatórias e plaquetas nos capilares, acúmulo de líquido nos capilares, CE emitindo prolongamentos e presença de PSD em CE e cardiomiócito.

Neste estudo foi observada em tecido cardíaco de camundongos BALB/c a presença de intensa atividade plaquetária, assim como diversos pontos focais de

hemorragia. A presença de infiltrado inflamatório no tecido sugere um quadro brando de miocardite, resultado da infecção viral de cardiomiócitos ou da ação de citocinas sobre o próprio tecido cardíaco. Adicionalmente, foi observada a presença de PSD no tecido, em fibras cardíacas próximas a discos intercalares, embora não em CE. Estes resultados corroboram os achados descritos por Rasinhas et al. (2013), Jácome et al. (2015) e Caldas (2015), contudo, alterações como rarefação do citoplasma e desorganização das fibras cardíacas não foram observadas neste estudo. Devido à associação de casos de miocardite a distúrbios da condução átrio ventricular e arritmia, a inflamação do miocárdio pode estar ligada a alterações observadas na morfologia da estrutura cardíaca como um todo, assim como dos discos intercalares, junções de comunicação essenciais na manutenção e no controle da contração cardíaca (Ehler et al., 2016; Tribulova et al., 2015).

No presente estudo, camundongos BALB/c imunocompetentes infectados experimentalmente por via IV com inóculo não neuroadaptado de DENV-4 isolado de caso humano apresentaram alterações histopatológicas e ultraestruturais semelhantes às descritas em caso humano, além da presença de vRNA do DENV em tecido hepático, pulmonar e cardíaco. Tais achados demonstram a susceptibilidade da linhagem ao DENV-4 e corroboram a utilização de camundongos BALB/c como modelo experimental para a infecção por DENV, devido não só a sua capacidade de apresentar alterações teciduais análogas as observadas em casos humanos, como na sua capacidade de produzir viremia. Naturalmente, estudos adicionais englobando outros órgãos notórios por seu envolvimento durante a infecção por DENV serão realizados, visando expandir o conhecimento da patogênese viral e das patologias causadas nestes tecidos pelo vírus, assim como a consolidação da linhagem BALB/c como modelo experimental para infecção experimental por DENV.

6 Conclusões

1. De acordo com as alterações observadas através de microscopia em tecido hepático, pulmonar e cardíaco e da detecção do vírus através de qRT-PCR nos mesmos tecidos e em saliva, pode-se concluir que camundongos BALB/c revelaram-se susceptíveis a infecção experimental por DENV-4.
2. Camundongos BALB/c apresentaram títulos elevados do genoma viral em fígado, pulmão, coração e saliva, sugerindo a replicação viral nestes tecidos.
3. A observação de PSD em coração e a detecção do genoma viral em tecido hepático, pulmonar, cardíaco e em saliva sugere a ocorrência de viremia.
4. Alterações morfológicas observadas em tecido de camundongo BALB/c infectado por DENV-4 mostraram-se semelhantes às descritas em casos humanos e em estudos prévios realizados em modelo murino similar.
5. Alterações morfológicas dos discos intercalares podem estar associadas a casos de arritmia cardíaca e distúrbios da condução átrio-ventricular descritos em casos humanos de DEN.

7 Perspectivas

1. Realizar isolamento viral a partir do sobrenadante de macerados de tecidos de camundongos infectados com DENV-4.
2. Analisar o tropismo viral e a intensidade dos efeitos citopatológicos causados pela infecção experimental de DENV-4 em diferentes órgãos (baço, cérebro, rim) de camundongos BALB/c.
3. Realizar ensaios de imunomarcção, objetivando identificar a presença do antígeno viral em fígado, pulmão e coração de camundongos infectados experimentalmente com vírus dengue-4.

8 Referências Bibliográficas

Alves R, Pereira L, Fabris D, Salvador F, Santos R, Zanotto P et al. Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and potential use as a vaccine antigen. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23(6):460-469.

Amâncio F, Pereira M, Iani F, D'anuniação L, Almeida J, Soares J et al. Fatal outcome of infection by dengue 4 in a patient with thrombocytopenic purpura as a comorbid condition in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56(3):267-270.

Anders KL, Nguyet NM, Quyen NT, Ngoc TV, Tram TV, Gan TT, Tung NT, Dung NT, Chau NV, Wills B, Simmons CP. An evaluation of dried blood spots and oral swabs as alternative specimens for the diagnosis of dengue and screening for past dengue virus exposure. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87(1):165-70.

Andries AC, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P et al. Value of Routine dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(9):e0004100.

Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn R. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2014; 9:134-142.

Arora S, Nathaniel SD, Paul JC, Hansdak SG. Acute liver failure in dengue haemorrhagic fever. *BMJ Case Rep.* 2015; 2015. pii: bcr2015209443.

Arora M, Patil RS. Cardiac manifestation in dengue fever. *J Assoc Physicians India.* 2016; 64(7):40-44.

Aslam M, Aleem NA, Zahid MF, Rahman AJ. Unusual presentation of dengue fever: a child with acute myocarditis. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2016; 16(1):e101-4.

Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking T, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 35(1):33-42.

Azevedo A, Gonçalves A, Archer M, Freire M, Galler R, Alves A. The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS ONE.* 2013; 8(3):e58357.

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

Balmaseda A, Guzmán MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Téllez Y et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10(2):317-22.

Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(3):449-56.

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

Balsitis SJ, Williams K, Lachica R, Flores D, Kyle J, Mehlhop E et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog.* 2010; 6(2):e1000790.

Bancroft WH, Top FH Jr, Eckels KH, Anderson JH Jr, McCown JM, Russell PK. dengue-2 vaccine: virological, immunological, and clinical responses of six Yellow fever-immune recipients. *Infect Immun.* 1981; 31(2):698-703.

Barreto DF, Paes MV, Takiya CM, Pinhão A, Côrtes L, Majerowicz S et al. Mice lung experimentally infected with dengue-2 virus: ultrastructural aspects. *Virus Res.* 2002; 7(2).

Barreto DF, Takiya CM, Schatzmayr HG, Nogueira RM, Farias-Filho J, Barth OM. Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotype 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(2):175-182.

Barreto-Vieira DF, Barth OM. Negative and positive staining in transmission electron microscopy for virus diagnosis. *Microbiology in Agriculture and Human Health*. 2015.

Barreto-Vieira DF, Takiya CM, Jácome FC, Rasinhas AC, Barth OM. Secondary infection with dengue viruses in a murine model: morphological analysis. *Indian J Appl Res*. 2015; 5(6).

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

Barth OM. Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. online ed. Rio de Janeiro, Brazil: Imprinta Express Ltda; 2010.

Basílio-de-Oliveira CA, Aguiar G, Baldanza M, Barth OM, Eyer-Silva W, 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):341-347.

Bente D, Melkus M, Garcia J, Rico-Hesse R. dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol*. 2005;79(21):13797-13799.

Bertolacci-Rocha L, Cunha R, Lichs G, Fabbro M, Motta-Castro A. Introduction of the dengue virus type 4 in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2016; 30(8):1789-92.

Bhasin A, Kumar R, Chandra K, Singal R. Dengue fever with myocarditis. *J Indian Acad Clin Med*. 2013; 14(2):187-9.

Bhatnagar J, Blau DM, Shieh WJ, Paddock CD, Drew C, Liu L et al. Molecular detection and typing of dengue viruses from archived tissues of fatal cases by rt-PCR and

sequencing: diagnostic and epidemiologic implications. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(2):335-40.

Bhamarapravati N, Yoksan S, Chayaniyayothin T, Angsubphakorn S, Bunyaratvej A. Immunization with a live attenuated dengue-2-virus candidate vaccine (16681-PDK 53): clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull World Health Organ.* 1987; 65(2):189-95.

Bhatt S, Gething P, Brady O, Messina J, Farlow A, Moyes C et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013; 496(7446):504-507.

Braga J, Silva L, Tibúrcio J, Silva M, Pereira L, Dutra K et al. Clinical, molecular, and epidemiological analysis of dengue cases during a major outbreak in the midwest region of Minas Gerais, Brazil. *J Trop Med.* 2014; 2014:276912.

Branco M, Sousa D, Sousa D, Monteiro J, Costa D, Almeida Junior R et al. Dengue in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, 2010-2012. *Trop Med Int Health.* 2015; 20(12):1707-1710.

Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 38(1):172-80.

Caldas GC. Estudos morfológicos e moleculares de tecido de modelo murino infectados experimentalmente com vírus dengue sorotipo 3. Rio de Janeiro. Monografia [Graduação em Microbiologia] – Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2016.

Cardosa M. Dengue vaccine design: issues and challenges. *Br Med Bull.* 1998; 54(2):395-405.

Cavalcanti L, Mota L, Lustosa G, Fortes M, Mota D, Lima A et al. Evaluation of the WHO classification of dengue disease severity during an epidemic in 2011 in the state of Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(1):93-98.

Christofferson R, McCracken M, Johnson A, Chisenhall D, Mores C. Development of a transmission model for dengue virus. *Virology*. 2013; 10(1):127.

Clark K, Onlamoon N, Hsiao H, Perng G, Villinger F. Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis?. *Front Microbiol*. 2013; 4.

Costa S, Yorio A, Gonçalves A, Vidale M, Costa E, Mohana-Borges R et al. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS ONE*. 2011; 6(10):e25685.

Costa V, Fagundes C, Valadão D, Cisalpino D, Dias A, Silveira K et al. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(5):e1663.

Coudeville L, Baurin N, Vergu E. Estimation of parameters related to vaccine efficacy and dengue transmission from two large phase III studies. *Vaccine*. 2016; 34(50):6417-6425.

Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. *J Clin Microbiol*. 1998 Dec;36(12):3737-9.

de Alwis R, Williams K, Schmid M, Lai C, Patel B, Smith S et al. Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. *PLoS Pathog*. 2014; 10(10):e1004386.

de Araújo J, Gomes G, da Costa Faria N, de Araújo E, de Filippis A, dos Santos FB et al. Evaluation of a generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses in suspected fatal cases of dengue infection, Rio de Janeiro, Brazil. *J Virol Methods*. 2012; 186(1-2):167-70.

del Angel R, Reyes-del Valle J. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10):e1003551.

Dejnirattisai W, Webb AI, Chan V, Jumnainsong A, Davidson A, Mongkolsapaya J et al. Lectin switching during dengue virus infection. *J Infect Dis.* 2011; 203(12):1775-83.

Dhanoa A, Hassan S, Ngim C, Lau C, Chan T, Adnan N et al. Impact of dengue virus (DENV) co-infection on clinical manifestations, disease severity and laboratory parameters. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1).

dos Santos FB, Nogueira RM, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology.* 2011; 8:387.

Ehler E. Cardiac cytoarchitecture - why the "hardware" is important for heart function! *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1863(7 Pt B):1857-63

Fares R, Souza K, Añez G, Rios M. Epidemiological scenario of dengue in Brazil. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:1-13.

Ferguson N, Rodriguez-Barraquer I, Dorigatti I, Mier-y-Teran-Romero L, Laydon D, Cummings D. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science.* 2016; 353(6303):1033-1036.

Fernando S, Wijewickrama A, Gomes L, Punchihewa C, Madusanka S, Dissanayake H et al. Patterns and causes of liver involvement in acute dengue infection. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1).

França RF, Zucoloto S, da Fonseca BA. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. *Exp Mol Pathol.* 2010; 89(3):321-326.

Frias-Stahelli N, Dorner M, Marukian S, Billerbeck E, Labitt R, Rice C et al. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. *J Virol.* 2014; 88(4):2205-2218.

Gamakaranage C, Rodrigo C, Samarawickrama S, Wijayarathne D, Jayawardane M, Karunanayake P et al. Dengue hemorrhagic fever and severe thrombocytopenia in a

patient on mandatory anticoagulation: balancing two life threatening conditions: a case report. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:272.

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

Gonçalves D, Prado RQ, Xavier EA, de Oliveira NC, Guedes PMM, da Silva JS et al. Immunocompetent mice model for dengue virus infection. *Scientific World J.* 2012;2012:1-12.

Green E. *Biology of the laboratory mouse.* 2^a ed. New York: Blakiston Division, McGraw-Hill; 1968.

Gubler DJ, Clark GG. Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis.* 1995; 1(2):55-57.

Gubler DJ. Dengue/Dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* 2006; 277:3-16; 16-22, 71-3, 251-3.

Gulati S, Maheshwari A. Atypical manifestations of dengue. *Trop Med Int Health.* 2007; 12(9):1087-1095.

Gupta VK, Gadpayle AK. Subclinical cardiac involvement in dengue haemorrhagic fever. *J Indian Acad Clin Med.* 2010; 11(2): 107-11.

Guzman M, Halstead S, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler D et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(12):S7-S16.

Halstead SB, Chow JS, Marchette NJ. Immunological enhancement of dengue virus replication. *Nat New Biol.* 1973 May 2; 243(122):24-6.

Halstead S, O'Rourke E. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977; 146(1):201-217.

Halstead SB. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Stat Q.* 1992; 45(2-3):292-8.

Halstead S. Pathogenesis of Dengue: dawn of a new era. *F1000Res.* 2015; 4. pii: F1000 Faculty Rev-1353.

Halstead SB, Cohen SN. Dengue hemorrhagic fever at 60 Years: early evolution of concepts of causation and treatment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015; 79(3):281-91.

Halstead S. Critique of world health organization recommendation of a dengue vaccine. *J Infect Dis.* 2016; 214(12):1793-1795.

Halstead S. Licensed dengue vaccine: public health conundrum and scientific challenge. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 95(4):741-745.

Hotta H, Murakami I, Miyasaki K, Takeda Y, Shirane H, Hotta S. Localization of dengue virus in nude mice. *Microbiol Immunol.* 1981; 25(1):89-93.

Hotta H, Hotta S. Dengue virus multiplication in cultures of mouse peritoneal macrophages: effects of macrophage activators. *Microbiol Immunol.* 1982; 26(8):665-676.

Huang K, Liu H, Li S, Liu C, Lin Y, Lei H et al. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol.* 2000; 81(9):2177-2182.

Jácome FC, dos Santos FB, Rasinhas AC, da Silva MAN, Nunes PGC, Barth OM et al. Heart compromise and detection of dengue virus-like particles in cardiac tissue of experimentally infected murine model. *Int J Res Stud Biosci.* 2015; 3(6):101-109.

Jain A, Chaturvedi U. Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59(2):119-130.

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

Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol.* 1999; 73(1):783-786.

Kadam DB, Salvi S, Chandanwale A. Expanded dengue. *J Assoc Physicians India.* 2016; 64(7):59-63.

Kirkpatrick B, Durbin A, Pierce K, Carmolli M, Tibery C, Grier P et al. Robust and balanced immune responses to all 4 dengue virus serotypes following administration of a single dose of a live attenuated tetravalent dengue vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *J Infect Dis.* 2015; 212(5):702-710.

Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 40(4):444-51.

Kosasih H, Alisjahbana B, Nurhayati, de Mast Q, Rudiman I, Widjaja S et al. The epidemiology, virology and clinical findings of dengue virus infections in a cohort of Indonesian adults in Western Java. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(2):e0004390.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002; 108(5):717-25.

Kularatne SA, Gawarammana IB, Kumarasiri PR. Epidemiology, clinical features, laboratory investigations and early diagnosis of dengue fever in adults: a descriptive study in Sri Lanka. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36(3):686-92.

Kumar KJ, Chandrashekar A, Basavaraja CK, Kumar HC. Acute pancreatitis complicating dengue hemorrhagic fever. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016; 49(5):656-659.

Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007; 30(5-6):329-340.

Lardo S, Utami Y, Yohan B, Tarigan SM, Santoso WD, Nainggolan L et al. Concurrent infections of dengue viruses serotype 2 and 3 in patient with severe dengue from Jakarta, Indonesia. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Feb;9(2):134-40.

Lazo L, Izquierdo A, Suzarte E, Gil L, Valdés I, Marcos E et al. Evaluation in mice of the immunogenicity and protective efficacy of a tetravalent subunit vaccine candidate against dengue virus. *Microbiol Immunol*. 2014; 58(4):219-226.

Lee IK, Lee WH, Liu JW, Yang KD. Acute myocarditis in dengue hemorrhagic fever: a case report and review of cardiac complications in dengue-affected patients. *Int J Infect Dis*. 2010; 14(10):e919-22.

Lenzi MF, Coura LC. Dengue prevention: focus on information. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(4):343-350.

Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol*. 2001; 75(8):3501-8.

Lim SK, Lee YS, Namkung S, Lim JK, Yoon IK. Prospects for dengue vaccines for travelers. *Clin Exp Vaccine Res*. 2016; 5(2):89-100.

Lima MR, 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; 5(5):e1147.

Limonta D, Falcón V, Torres G, Capó V, Menéndez I, Rosario D et al. Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. *Infection*. 2012; 40(6):689-694.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of Flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003; 59: 23-61.

Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. In: Fields Virology. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

Liu G, Song L, Beasley D, Putnak R, Parent J, Misczak J et al. Immunogenicity and efficacy of flagellin-envelope fusion dengue vaccines in mice and monkeys. Clin Vaccine Immunol. 2015; 22(5):516-525.

Marchiori E, Ferreira JL, Bittencourt CN, de Araújo Neto CA, Zanetti G, Mano CM et al. Pulmonary hemorrhage syndrome associated with dengue fever, high-resolution computed tomography findings: a case report. Orphanet J Rare Dis. 2009; 4:8.

Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu SJ, Putvatana R et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. J Invest Dermatol Symp Proc. 2001; 6(3):219-24.

Marques N, Gan VC, Leo YS. Dengue myocarditis in Singapore: two case reports. Infection. 2013; 41(3):709-14.

Mawson AR. Retinoids, race and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. Med Hypotheses. 2013; 81(6):1069-74.

Mouse Genome Informatics (MGI) - Mouse Facts. Informatics.jax.org. 2016. Disponível em: http://www.informatics.jax.org/mgihome/other/mouse_facts1.shtml#physiology. Acessado em: 28/12/2016.

Miagostovich M, dos Santos FB, Fumian T, Guimarães F, Costa E, Tavares F et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(3):307-313.

Milligan G, Sarathy V, Infante E, Li L, Campbell G, Beatty P et al. A Dengue virus type 4 model of disseminated lethal infection in AG129 mice. PLOS ONE. 2015; 10(5):e0125476.

Miranda CH, Borges MC, Schmidt A, Pazin-Filho A, Rossi MA, Ramos SG, da Fonseca BAL. A case presentation of a fatal dengue myocarditis showing evidence for dengue virus-induced lesion. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2013; 2(2):127-30.

Morrison J, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. Innate immunity evasion by dengue virus. *Viruses*. 2012; 4(12):397-413.

Motimath P, Patil RS, Morkar DN, C PK. Acute fulminant hepatic failure due to primary dengue: A case report. *J Assoc Physicians India*. 2016; 64(1):120-121.

Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. *Clin Epidemiol. Clinical Epidemiology*. 2013; 5:299.

Navinan MR, Yudhishdran J, Herath S, Liyanage I, Kugadas T, Kumara D et al. Complete heart block in dengue complicating management of shock due to both bleeding and leakage: a case report. *BMC Res Notes*. 2015; 8: 68.

Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology*. 2009; 6:211.

Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich M, Farias M, Farias Filho J. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988; 83(2):219-225.

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

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

Nogueira RM, de Araújo J, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007; 22(5):358-363.

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

Oliveira E, Gonçalves A, Costa S, Azevedo A, Mantuano-Barradas M, Nogueira A et al. aspects of T cell-mediated immunity induced in mice by a DNA vaccine based on the dengue-NS1 antigen after challenge by the intracerebral route. *PLOS ONE*. 2016; 11(9):e0163240.

Oliveira R, Silva M, Calzavara-Silva C, Silva A, Cordeiro M, Moura P et al. Primary dengue haemorrhagic fever in patients from northeast of Brazil is associated with high levels of interferon- β ; during acute phase. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(6):378-384.

Osanaí CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima Nota previa. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983; 25(1):53-4.

Paes MV, Pinhão A, Barreto DF, Costa S, Oliveira M, Nogueira A et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*. 2005; 338(2):236-246.

Paes MV, Lenzi H, Nogueira A, Nuovo G, Pinhão A, Mota E et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest*. 2009; 89(10):1140-1151.

PAHO (Pan American Health Organization), 2015. Disponível em: www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=29143&lang=pt. Acessado em: 10/10/2016.

PAHO (Pan American Health Organization), 2016. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=en. Acessado em: 09/10/2016.

Pang T, Devi S, Blanden R, Lam S. T cell-mediated cytotoxicity against dengue-infected target cells. *Microbiol Immunol.* 1988; 32(5):511-518.

Pereda MG, López M, Mariluz M. Myocarditis and complicated dengue: a case report. *Rev Chilena Infectol.* 2015; 32(2):238-9.

Pierson T, Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol.* 2013; 3(1):3-12.

Póvoa T, Alves A, Oliveira C, Nuovo G, Chagas V, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS ONE.* 2014; 9(4):e83386.

Prada-Arismendy J, Rincón V, Castellanos J. Comparative evaluation of permissiveness to dengue virus serotype 2 infection in primary rodent macrophages. *J Trop Med.* 2012; 2012:1-7.

Pérez-Vélez ME, García-Nieves T, Colón-Sánchez C, Martínez I. Induction of Neutralization antibodies in mice by dengue-2. *P R Health Sci J.* 2009; 28(3):239-50.

Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvão LR, Amarilla AA, Poloni DF et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J.* 2010; 7:22.

Promphan W, Sopontammarak S, Pruekprasert P, Kajornwattanakul W, Kongpattanayothin A. dengue myocarditis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004; 35(3):611-3.

Putnak R, Barvir D, Burrous J, Dubois D, D'Andrea V, Hoke C et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in vero cells: immunogenicity and protection in mice and Rhesus monkeys. *J Infect Dis.* 1996; 174(6):1176-1184.

Putri D, Sudiro T, Yunita R, Jaya U, Dewi B, Sjatha F et al. Immunogenicity of a candidate DNA vaccine based on the prM/E genes of a dengue type 2 virus cosmopolitan genotype strain. *Jpn J Infect Dis.* 2015; 68(5):357-363.

Rasinha AC. Análises morfológicas de tecido cardíaco de camundongo BALB/c com quadro de infecção primária e secundária pelos vírus dengue sorotipo 1, 2 e 3. Rio de Janeiro. Monografia [Graduação em Biomedicina] – Universidade Federal Fluminense; 2013.

Raviprakash K, Defang G, Burgess T, Porter K. Advances in dengue vaccine development. *Hum Vaccin*. 2009; 5(8):520-8.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol*. 1938; 27(3): 493-497.

Reiner R, Achee N, Barrera R, Burkot T, Chadee D, Devine G et al. Quantifying the epidemiological impact of vector control on dengue. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(5):e0004588.

Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron. *J Cell Biol*. 1963; 17(1):208-212.

Richard J Kuhn Lab. 2016. Disponível em: <https://www.bio.purdue.edu/lab/kuhn/research.html>. Acessado em: 12/10/2016.

Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479-493.

Rico-Hesse R, Harrison L, Salas R, Tovar D, Nisalak A, Ramos C et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997; 230(2):244-251.

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

Rivera J, Neira M, Parra E, Méndez J, Sarmiento L, Caldas M. Detección de antígenos del virus dengue en tejidos post mortem. *Biomedica*. 2014; 34(4):514-20

Rodenhuis-Zybert I, der Schaar H, da Silva Voorham J, Ende-Metselaar H, Lei H, Wilschut J et al. Immature dengue virus: a veiled pathogen?. *PLoS Pathog.* 2010; 6(1):e1000718.

Rodrigues RS, Brum AL, Paes MV, Póvoa TF, Basilio-de-Oliveira CA, Marchiori E. Lung in dengue: computed tomography findings. *PLoS One.* 2014; 9(5):e96313.

Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(5):720-4.

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

Runtuwene L, Konishi E, Yamanaka A, Makino Y, Suzuki Y, Takasaki T et al. dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse. *Parasit Vectors.* 2014; 7(1):143.

Russell P, Halstead S. Challenges to the design of clinical trials for live-attenuated tetravalent dengue vaccines. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(8):e0004854.

Salazar M, del Angel R, Lanz-Mendoza H, Ludert J, Pando-Robles V. The role of cell proteins in dengue virus infection. *J Proteomics.* 2014; 111:6-15

Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR et al. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29(3):238-42.

Sam SS, Omar SF, Teoh BT, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Review of dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: a retrospective study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(5):e2194.

San Martin J, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano J, Bouckennooghe A, Dayan G et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82(1):128-135.

Sarathy V, White M, Li L, Gorder S, Pyles R, Campbell G et al. A Lethal murine infection model for dengue virus 3 in AG129 mice deficient in type i and ii interferon receptors leads to systemic disease. *J Virol*. 2014; 89(2):1254-1266.

Sarathy V, Barrett A, Milligan G, Robert Beatty P, Bourne N, Harris E et al. Characterization of lethal dengue virus type 4 (DENV-4) TVP-376 infection in mice lacking both IFN- α/β and IFN- γ receptors (AG129) and comparison with the DENV-2 AG129 mouse model. *J Gen Virol*. 2015; 96(10):3035-3048.

Sariol CA, Pelegrino JL, Martinez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61(6):994-1000.

Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81(2):245-246.

Schatzmayr HG, Cabral MC. *A virologia no estado do Rio de Janeiro: uma visão global*. 2a ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2012.

Schlesinger J, Brandriss M, Walsh E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*. 1987; 68(3):853-857.

Schwartz L, Halloran M, Durbin A, Longini I. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine*. 2015; 33(29):3293-8.

Schmid MA, Harris E. Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathog*. 2014; 10(12):e1004541.

Schmid MA, Diamond MS, Harris E. Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity. *Front Immunol*. 2014; 5:647.

Sharma SK, Gupta BS, Devpura G, Agarwal A, Anand S. Pulmonary haemorrhage syndrome associated with dengue haemorrhagic fever. *J Assoc Physicians India*. 2007; 55:729-30.

Sheetal S, Jacob E. A Study on the cardiac manifestations of dengue. *J Assoc Physicians India*. 2016; 64(5):30-34.

Shivanthan M, Navinan M, Constantine G, Rajapakse S. Cardiac involvement in dengue infection. *J Infect Dev Ctries*. 2015; 9(04):338-46.

Shresta S, Kyle J, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*. 2004; 319(2):262-273.

Simmons C, Farrar J, van Vinh Chau N, Wills B. dengue. *N Engl J Med*. 2012; 366(15):1423-1432.

Simmons C, McPherson K, Van Vinh Chau N, Hoai Tam D, Young P, Mackenzie J et al. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. *Vaccine*. 2015; 33(50):7061-8

Simmons M, Murphy GS, Hayes CG. Short report: Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65(2):159-61.

Sreekanth G, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, Panaampon J, Noisakran S, Yenchitsomanus P et al. SB203580 Modulates p38 MAPK signaling and dengue virus-induced liver injury by reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 phosphorylation. *PLOS ONE*. 2016; 11(2):e0149486.

Srikiatkachorn A, Kelley J. Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. *Antiviral Res*. 2014; 109:160-170.

Sun P, Kochel T. The Battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013:843469.

SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde). Relatório de casos de dengue – 2008. 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf. Acessado em: 03/05/2015.

SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde). Boletim Epidemiológico - Volume 43 - nº 1 – 2012. dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012). Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/23/BE-2012-43--1--pag-11-a-15-Dengue.pdf>. Acessado em: 06/07/2016.

SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde). Boletim Epidemiológico - Volume 46 - nº 44 – 2015. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf>. Acessado em: 12/11/2016.

SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde). Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 38 – 2016. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf>. Acessado em: 12/11/2016.

Tahir H, Daruwalla V, Hayat S. Myocarditis leading to severe dilated cardiomyopathy in a patient with dengue Fever. *Case Rep Cardiol*. 2015; 2015:319312.

Tarantino D, Cannalire R, Mastrangelo E, Croci R, Querat G, Barreca M et al. Targeting flavivirus RNA dependent RNA polymerase through a pyridobenzothiazole inhibitor. *Antiviral Res*. 2016;134:226-235.

Temporão J, Penna G, Carmo E, Coelho G, Azevedo R, Nunes M et al. Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(5):938-940.

Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 May;56(5):566-72.

Thomas L, Najjoullah F, Besnier F, Valentino R, Cesaire J, Cabie A. Clinical presentation of dengue by serotype and year of epidemic in Martinique. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 91(1):138-145.

Tribulova N, Egan Benova T, Szeiffova Bacova B, Viczenczova C, Barancik M. New aspects of pathogenesis of atrial fibrillation: remodelling of intercalated discs. *J Physiol Pharmacol*. 2015; 66(5):625-34.

Tumioto G, Gregianini T, Dambros B, Cestari B, Alves Nunes Z, Veiga A. Laboratory surveillance of dengue in Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2013. *PLoS ONE*. 2014; 9(8):e104394.

Valadão AL, Aguiar RS, de Arruda LB. Interplay between inflammation and cellular stress triggered by Flaviviridae viruses. *Front Microbiol*. 2016; 7:1233.

Vannice K, Durbin A, Hombach J. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine*. 2016; 34(26):2934-8.

Velandia-Romero M, Calderón-Peláez M, Castellanos J. In vitro infection with dengue virus induces changes in the structure and function of the mouse brain endothelium. *PLOS ONE*. 2016; 11(6):e0157786.

Veloso HH, Ferreira Júnior JA, Paiva JMB, Honório JF, Bellei NCJ, de Paola AAV. Acute atrial fibrillation during dengue hemorrhagic fever. *Braz J Infect Dis*. 2003; 7(6):418-22.

Vicente CR, Herbinger KH, Fröschl G, Romano CM, Cabidelle ASA, Cerutti Junior C. Serotype influences on dengue severity: a cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitória, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1).

ViralZone – ExPASy.org. 2016. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html. Acessado em: 15/12/2016.

Wan S, Lin C, Wang S, Chen Y, Yeh T, Liu H et al. Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci.* 2013; 20(1):37.

Watanabe S, Chan K, Wang J, Rivino L, Lok S, Vasudevan S. Dengue virus infection with highly neutralizing levels of cross-reactive antibodies causes acute lethal small intestinal pathology without a high level of viremia in mice. *J Virology.* 2015; 89(11):5847-5861.

Weerakoon K, Kularatne S, Edussuriya D, Kodikara S, Gunatilake L, Pinto V et al. Histopathological diagnosis of myocarditis in a dengue outbreak in Sri Lanka, 2009. *BMC Res Notes.* 2011; 4(1):268.

White L, Parsons M, Whitmore A, Williams B, de Silva A, Johnston R. An immunogenic and protective Alphavirus replicon particle-based dengue vaccine overcomes maternal antibody interference in weanling mice. *J Virol.* 2007; 81(19):10329-10339.

Whitehead S, Blaney J, Durbin A, Murphy B. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(7):518-528.

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). Handbook for clinical management of dengue: World Health Organization; 2012.

WHO (World Health Organization - US). Dengue vaccine: WHO position paper – July 2016. 2016, 91: 349-364.

Williams K, Zompi S, Beatty P, Harris E. A Mouse model for studying dengue virus pathogenesis and immune response. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171:E12-E23.

Yacoub S, Griffiths A, Chau TT, Simmons CP, Wills B, Hien TT et al. Cardiac function in Vietnamese patients with different dengue severity grades. *Crit Care Med.* 2012; 40(2): 477–483.

Yacoub S, Mongkolsapaya J, Sreaton G. Recent advances in understanding dengue. *F1000Res.* 2016; 5. pii: F1000 Faculty Rev-78.

Yauch L, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res.* 2008; 80(2):87-93.

Yap G, Sil BK, Ng LC. Use of saliva for early dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(5):e1046.

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.

Zara AL, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE. *Epidemiol Serv Saude. Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2016; 25(2):1-2.

Zellweger R, Shresta S. Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Front Immunol.* 2014; 5:151.

Zhang X, Sun L, Rossmann M. Temperature dependent conformational change of dengue virus. *Curr Opin Virol.* 2015; 12:109-112.

Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses.* 2012; 4(12):62-82.

Zubair M, Ashraf M, Ahsan A, Nazir NU, Hanif H, Khan HA. Dengue viral infections in Pakistan and other Asian countries: a comprehensive review. *J Pak Med Assoc.* 2016 Jul; 66(7):884-8.

Zybert I, Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit J. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol.* 2008; 89(12):3047-3051.