

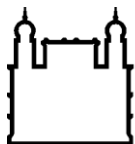
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

**MODELO MURINO IMUNOCOMPETENTE PARA ESTUDO DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE 3: ASPECTOS MORFOLÓGICOS,
VIREMIA E TROPISMO**

GABRIELA CARDOSO CALDAS

Rio de Janeiro
Março de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Gabriela Cardoso Caldas

Modelo murino imunocompetente para estudo da infecção pelo vírus dengue 3:
Aspectos morfológicos, viremia e tropismo

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

Orientador (es): Dr^a. Debora Ferreira Barreto Vieira
Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

RIO DE JANEIRO
Março de 2019

Caldas, Gabriela Cardoso.

Modelo murino imunocompetente para estudo da infecção pelo vírus dengue sorotipo 3: aspectos morfológicos, viremia e tropismo / Gabriela Cardoso Caldas. - Rio de Janeiro, 2019.

xxiii, 162f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

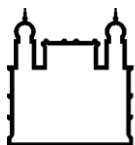
Orientadora: Debora Ferreira Barreto Vieira.

Co-orientadora: Flávia Barreto dos Santos.

Bibliografia: f. 133-160

1. vírus dengue. 2. modelo murino. 3. ultraestrutura. 4. histopatologia. 5. tropismo. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: GABRIELA CARDOSO CALDAS

Modelo murino imunocompetente para estudo da infecção pelo vírus dengue
3: Aspectos morfológicos, viremia e tropismo

ORIENTADOR (AS): Dr^a. Debora Ferreira Barreto Vieira
Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

Aprovada em: 29/03/2019

EXAMINADORES:

Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz)

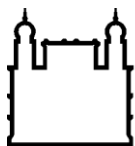
Prof^a. Dr^a. Iranaia Assunção Miranda (Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Dr. Tulio Machado Fumian (Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz)

Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho- Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 29 de março de 2019

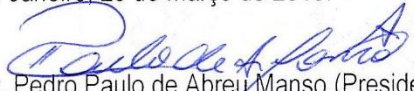


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Gabriela Cardoso Caldas**, sob orientação da Dr^a. Flávia Barreto dos Santos e Dr^a. Débora Ferreira Barreto Vieira. Ao vigésimo nono dia do mês de março de dois mil e dezenove, realizou-se às quatorze horas, na Sala 14B do Pavilhão Hélio & Peggy Pereira, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **“Modelo murino imunocompetente para estudo da infecção pelo vírus dengue 3: Aspectos morfológicos, viremia e tropismo”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia Celular e Ultra-Estrutura de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Iranaia Assunção Miranda - UFRJ/RJ, Dr. Tulio Machado Fumian - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto – IOC/FIOCRUZ e Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges – UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovada da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 29 de março de 2019.


Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso (Presidente da Banca):


Dr^a. Iranaia Assunção Miranda (Membro da Banca):


Dr. Tulio Machado Fumian (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico esta dissertação aos camundongos utilizados neste estudo; à minha amada mãe e irmã, Rosana e Rafaela; ao meu pacotinho, Juanito e ao meu parceiro de vida, Helver.

AGRADECIMENTOS

Representando um marco na minha história e carreira acadêmica, esta dissertação só foi realizada com o apoio de múltiplas mãos e múltiplos corações. Ao fim de dois anos intensos de trabalho, é com muito orgulho e carinho que agradeço a todos e a cada um deles.

A Deus, pela dádiva da vida e pela resiliência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida durante o desenvolvimento deste trabalho. Ao curso de pós graduação em Biologia Parasitária, pelo apoio financeiro em participação de congressos. À coordenação, pela atenção e recepção. Um agradecimento carinhoso à secretaria, representada pela Rita, pelo carinho e por sempre estar disposta a solucionar os problemas dos alunos.

Às minhas amigas de turma, em especial Ivana D'Almeida e Carina Cantelli, por compartilharem tantos momentos felizes e por estarem sempre ao meu lado, dispostas a me fazer rir.

À equipe da plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth, em especial Roger, Rômulo e Genésio, que vibraram comigo a cada resultado novo e nunca mediram esforços para me ajudar. À equipe do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, representada pelo Dr. Cleber Hoper, que sempre respondeu com agilidade a tudo que eu solicitei. À equipe do Biotério do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, representada pelo Dr. Luiz César, por toda a ajuda, pelo acolhimento e pelas conversas.

Aos camundongos utilizados neste estudo, pela crucial contribuição à ciência.

À equipe do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, por todos esses anos de parceria. Obrigada à Ana Luisa, Fernanda, Arthur, Derick, Daniel, Raphael e Marcos, por todas as conversas, todo o suporte, todo o carinho nos momentos em que eu mais precisei. Obrigada à minha querida aluna PROVOC, Hannah, que me acolheu como coorientadora e acabou, sem perceber, ensinando tanta coisa.

À minha querida orientadora Débora Ferreira Barreto Vieira, pelas conversas, pelo apoio, pelo suporte. Obrigada por não desistir e acreditar em mim mesmo nos momentos mais difíceis. À Dra Ortrud Monika Barth, por ser um exemplo de grande cientista apesar de toda adversidade do mundo institucional, por me incentivar e encorajar.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Viral, por me acolher com tanto carinho, mostrando-se disposta a ajudar em qualquer que fosse a situação. Um agradecimento especial e cheio de carinho à Dra Priscila Conrado Guerra Nunes, pela parceria e apoio contínuo.

À minha querida orientadora, Dra Flávia Barreto dos Santos, que aceitou orientar este trabalho e tanto me aconselhou em todos os momentos.

À toda equipe do Laboratório de Patologia, em especial à Yuli Maia e João Paulo, pela amizade, pelas conversas, e por nunca medirem esforços para fazer com que eu não desistisse. Ao Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso, por toda a ajuda e paciência. Obrigada por revisar tão criteriosamente esta dissertação e por ter aceitado presidir minha banca de avaliação.

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado, pelo exemplo ímpar de pesquisador que é para mim. Obrigada pelas conversas, pelo apoio, pela ajuda técnica e por me acolher como aluna.

À minha mãe, Rosana, por ser a pessoa mais importante da minha vida, por me amar, apoiar incondicionalmente e ser o meu exemplo de ser humano íntegro. Ao meu quase pai, Juanito, por ter aparecido em minha vida e me dado tanto apoio e carinho durante minha jornada. À minha irmã, Rafaela, pelo amor e apoio em tudo o que eu preciso.

A João Vitor e Lucas Cavalcanti, por todas as conversas e conselhos durante toda a realização deste trabalho.

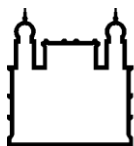
A Helver Gonçalves Dias, meu parceiro de vida e profissional, melhor amigo e namorado, por dividir comigo seus anseios, projetos e inspirações. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e por constantemente me ensinar que juntos, somos mais fortes.

Ao Dr. Filipe Aníbal de Carvalho, pela ajuda nas análises estatísticas. Ao Dr. Tulio Machado Fumian, Dra. Irania Assunção Miranda, Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges e Dra. Luzia Maria Pinto, por aceitarem avaliar este trabalho e por todas as sugestões, críticas e comentários, que certamente servirão para dar maior alinhamento a este estudo.

*“Alentemos ardente a esperança
De buscar, de alcançar, de manter
No Brasil a maior confiança
Que só pode a ciência trazer.*

*Vivemos para o estudo
Soldados da ciência
O livro é nosso escudo
E arma a inteligência. ”*

Hino do Colégio Pedro II



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

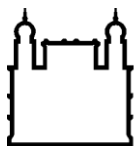
MODELO MURINO IMUNOCOMPETENTE PARA ESTUDO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE 3: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, VIREMIA E TROPISMO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Gabriela Cardoso Caldas

Diversos estudos epidemiológicos já correlacionaram a infecção pelo DENV-3 a quadros graves, tanto em infecções primárias quanto secundárias e, no Brasil, este sorotipo apresenta maior associação a sinais e sintomas mais graves, incluindo choque, dor abdominal e exantema, em comparação aos demais sorotipos. O estabelecimento de modelos animais para estudos das infecções pelos DENV é de grande relevância para a pesquisa sobre patogênese, imunidade, desenvolvimento e teste de fármacos e candidatas a vacinas. Porém, para tal, são inúmeros os desafios, uma vez que os vírus epidêmicos circulantes não infectam naturalmente espécies não-humanas. Diante deste cenário, este estudo teve como objetivo principal verificar através de análises de hemograma, bioquímicas, morfológicas e moleculares possíveis alterações histopatológicas e fisiopatológicas, assim como a presença do genoma do DENV em diferentes órgãos, soro, saliva e urina de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com o DENV-3 epidêmico e não neuroadaptado. Camundongos BALB/c machos, de 2 meses de idade foram infectados com DENV-3 pela via intravenosa e eutanasiados em 72 h.p.i, 7 e 14 d.p.i, de acordo com as análises a serem realizadas. Análises histopatológicas, ultraestruturais e histomorfométricas a partir de amostras de todos os órgãos estudados revelaram alterações semelhantes às observadas em casos humanos de DEN. Partículas semelhantes aos DENV foram detectadas em célula intersticial renal. Discretas alterações bioquímicas, como a elevação do nível de creatinina e ureia e diminuição do nível de colesterol total foram observadas nos camundongos infectados, ao longo da cinética experimental. Em relação às alterações no hemograma, foi observado aumento do hematócrito e diminuição da contagem de plaquetas nos camundongos infectados. Apesar de ter sido observada baixa viremia em camundongos 72 h.p.i, o genoma viral foi detectado em todos os órgãos testados, além da saliva. Estes resultados demonstram a suscetibilidade do camundongo BALB/c à infecção pelo DENV-3.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMMUNOCOMPETENT MURINE MODEL FOR DENV-3 INFECTION STUDY: MORPHOLOGICAL ASPECTS, VIREMIA AND TROPISM

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Gabriela Cardoso Caldas

Several epidemiological studies have correlated DENV-3 infection with severe conditions in both primary and secondary infections, and, in Brazil, this serotype shows a greater association with severer signs and symptoms, such as shock, abdominal pain and exanthema, compared to other serotypes. The establishment of animal models for studies of DENV infections is of great relevance for research on pathogenesis, immunity, development and testing of drugs and vaccines. However, said studies have met numerous challenges, since circulating epidemic viruses do not naturally infect nonhuman species. In this scenario, the main objective of this study was to verify possible histopathological and pathophysiological changes, as well as the presence of the DENV genome in different organs, serum, saliva and urine of BALB / c mice infected with the epidemic and non-neuroadapted DENV-3. Male BALB / c mice, 2 months old, were intravenously infected with DENV-3 and euthanized in 72 h.p.i, 7 and 14 d.p., according to the analyzes to be performed. Histopathological, ultrastructural and histomorphometric analyzes from samples of all organs studied revealed similar alterations to those observed in human cases of DEN. DENV-like particles were detected in renal interstitial cells. Discrete biochemical alterations, such as elevation of creatinine and urea level and decrease in total cholesterol levels were observed in the infected mice, along experimental kinetics. In relation to changes in the hemogram, an increase in hematocrit and a decrease in platelet counts were observed in infected mice. Although low viremia was observed in 72 h.p.i mice, the viral genome was detected in all organs tested, in addition to saliva. These results demonstrate the susceptibility of BALB / c mice to DENV-3 infection.

ÍNDICE

Agradecimentos	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Índice de Figuras.....	xvi
Lista de Tabelas e Quadros.....	xviii
Lista de Gráficos.....	xix
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Vírus Dengue	2
1.1.1. Classificação, Morfologia e Estrutura do Genoma	2
1.1.2. Células alvo na Infecção por DENV	6
1.1.3. Ciclo replicativo dos DENV	7
1.2. Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue	10
1.2.1. Infecções secundárias e efeitos na progressão da doença.....	11
1.2.2. Revisão da classificação dos casos clínicos.....	12
1.3. Patogenia e histopatologia das infecções por dengue	14
1.3.1. Fígado	14
1.3.2. Pulmão	15
1.3.3. Coração.....	16
1.3.4. Rim.....	12
1.4. Epidemiologia.....	18
1.4.1. Dengue no mundo	18
1.4.2. Dengue no Brasil.....	23
1.5. Modelos experimentais para o estudo de infecções pelos DENV	26
1.5.1. Primatas não humanos (PNH)	27
1.5.2. Modelos Murinos.....	27
1.5.2.1. Camundongos humanizados.....	28
1.5.2.2. Camundongos imunodeficientes: interferon- deficientes.....	29
1.5.2.3. Camundongos imunocompetentes.....	29
1.5.2.3.1 Camundongos BALB/c.....	30

1.6. Vacinas.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.1. Objetivos Específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Considerações Éticas.....	37
4.2. Vírus dengue sorotipo 3	37
4.3. Camundongos BALB/c	37
4.4. Experimentação Animal.....	38
4.4.1. Aferição de peso, temperatura retal e sinais clínicos associados à infecção	38
4.4.2. Coleta de saliva	38
4.4.3. Infecção	39
4.4.4. Eutanásia	39
4.5. Processamento de amostras para análises em microscopia de campo claro ...	41
4.6. Processamento de amostras para análises em microscopia eletrônica de transmissão.	42
4.7. Extração de Ácidos Nucleicos.....	43
4.8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	43
4.9. Análises estatísticas	44
4.9. Análises histomorfométricas.....	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Análises estatísticas.....	46
5.2. Clínica.....	46
5.3. Macroscopia.....	48
5.4. Peso dos órgãos.....	48
5.5. Análises bioquímicas.....	55

5.6. Análises de hemograma.....	63
5.7. Análises morfológicas – histopatologia, ultraestrutura e histomorfometria.....	71
5.7.1. Análises histopatológicas, ultraestruturais e histomorfométricas de pulmões de camundongos BALB/c.....	71
5.7.1.1. Análises histopatológicas.....	71
5.7.1.2. Análises ultraestruturais	75
5.7.1.3. Análises histomorfométricas	79
5.7.2. Análises histopatológicas, ultraestruturais e histomorfométricas de fígado de camundongos BALB/c.....	80
5.7.2.1. Análises histopatológicas.....	80
5.7.2.2. Análises ultraestruturais	85
5.7.2.3. Análises histomorfométricas	86
5.7.3. Análises histopatológicas e ultraestruturais de coração de camundongos BALB/c.....	88
5.7.3.1. Análises histopatológicas.....	88
5.7.3.2. Análises ultraestruturais	90
5.7.4. Análises histopatológicas, ultraestruturais e histomorfométricas de rins de camundongos BALB/c.....	93
5.7.4.1. Análises histopatológicas.....	93
5.7.4.2. Análises ultraestruturais	100
5.7.4.3. Análises histomorfométricas	103
5.8. Detecção do genoma viral.....	104
6. DISCUSSÃO.....	108
7. CONCLUSÕES.....	127
8. PERSPECTIVAS	128
9. REFERÊNCIAS	129
10. ANEXOS.....	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do vírion e esquema da estrutura da partícula do DENV.....	3
Figura 2. Diagrama esquemático do genoma dos DENV e diagrama esquemático da poliproteína dos DENV.....	4
Figura 3. Esquema de replicação dos DENV.....	9
Figura 4. Nova classificação dos casos de DEN de acordo com a OMS.....	13
Figura 5. Distribuição global da DEN.....	23
Figura 6. Número de casos de DEN no Brasil, 1986 – 2018.....	26
Figura 7. Secção histológica de pulmão de camundongo BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina.....	71
Figuras 8a-8e. Secções histológicas de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i por DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina.....	71
Figura 9: Secção histológica de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i por DENV-3 corada com resorcina – fucsina de Weigert.....	74
Figura 10: Secção ultrafina de pulmão de camundongo BALB/c não infectado contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo.....	75
Figuras 11a – 11i. Secções ultrafinas de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i por DENV-3 contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.....	76
Figuras 12a – 12b. Secções histológicas de fígado de camundongo BALB/c não infectado coradas com hematoxilina e eosina.....	80
Figura 13. Secção histológica de fígado de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina: Dilatação de capilares sinusóides.....	80
Figuras 14a – 14b. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina: Sinais de congestão de capilares sinusóides.....	81
Figuras 15a – 15c. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina: Discretos infiltrados celulares no interstício.....	81
Figuras 16a – 16f. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina: Presença de inclusões semelhantes a lipídeos.....	82
Figuras 17a – 17c. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina: Presença de inclusões no citoplasma de hepatócitos.....	83

Figura 18. Secção histológica de fígado de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina: Presença de múltiplas inclusões semelhantes a lipídeos no citoplasma de hepatócitos.....	83
Figuras 19a – 19d. Secções histológicas de fígados de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Degeneração de hepatócitos.....	84
Figura 20. Secção histológica de coração de camundongo BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina.....	87
Figura 21. Secção histológica de coração de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 corada com hematoxilina e eosina: aumento da celularidade do pericárdio.....	88
Figura 22. Secção histológica de coração de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 corada com hematoxilina e eosina: Discretos infiltrados celulares no pericárdio.....	88
Figuras 23a – 23h. Secções ultrafinas de coração de camundongo BALB/c contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.....	90
Figura 24. Secção histológica de rim de camundongos BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina.....	92
Figura 25. Secção histológica de rim de camundongos BALB/c não infectado corada com ácido periódico de Schiff.....	93
Figuras 26a – 26c. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina: Presença de inclusões citoplasmáticas no citoplasma das células epiteliais tubulares.....	94
Figuras 27a – 27b. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com ácido periódico de Schiff: Glomérulos atroficos.....	95
Figura 28. Secção histológica de rim de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 corada com ácido periódico de Schiff: Extensa área do parênquima renal apresentando ausência de glomérulos.....	96
Figuras 29a – 29c. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com ácido periódico de Schiff: Sinais de lesão tubular primária.....	97
Figuras 30a – 30b. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com ácido periódico de Schiff: Sinais de congestão.....	98
Figura 31. Secção histológica de rim de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 corada com ácido periódico de Schiff: Presença de infiltrado celular no interstício.....	98
Figuras 32a – 32g. Secções ultrafinas de rins de camundongos BALB/c contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.....	100

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Panorama geral do desenvolvimento clínico dos principais candidatos vacinais tetravalentes contra a DEN	33
Tabela 2. Parâmetros da qRT-PCR, de acordo com o protocolo modificado de Johnson, 2005.....	44
Tabela 3. Órgãos e os respectivos parâmetros avaliados nos estudos histomorfométricos.....	45
Quadro 1. Caixa craniana representativa de camundongo BALB/c pertencente ao grupo controle e caixas cranianas dos animais 72 h p.i pertencentes ao grupo das análises por microscopia de campo claro.....	48
Tabela 4. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo controle (não infectados).....	49
Tabela 5. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo 72 h.p.i.....	50
Tabela 6. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo 7 d.p.i.....	51
Tabela 7. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo 14d.p.i.....	52
Tabela 8. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos).....	56
Tabela 9. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 72 h.p.i.....	57
Tabela 10. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 7 d.p.i.....	58
Tabela 11. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 14 d.p.i.....	59
Tabela 12. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos).....	64
Tabela 13. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c 72h.p.i.....	65
Tabela 14. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c 7 d.p.i.....	66
Tabela 15. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c 14 d.p.i.....	67
Tabela 16. Detecção do genoma viral de DENV-3 por RT-PCR em tempo real em macerado de órgãos de camundongos BALB/c.....	103
Tabela 17. Detecção do genoma viral de DENV-3 por RT-PCR em tempo real em amostras de soro, saliva e urina de camundongos BALB/c.....	103
Tabela 18. Quantificação da carga viral do DENV-3 por RT-PCR em tempo real, a partir de macerado de órgãos, saliva e soro de camundongos BALB/c.....	105
Tabela 19. Média da quantificação dos títulos de RNA viral recuperados por camundongo BALB/c.....	106

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Temperaturas retais iniciais (T1) e finais (T2) dos animais pertencentes ao grupo controle (CN) e 72 h.p.i.....	47
Gráfico 2. Pesos iniciais (P1) e finais (P2) dos animais pertencentes ao grupo controle (CN) e 72 h.p.i.....	47
Gráfico 3. Pesos dos pulmões dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	52
Gráfico 4. Pesos do fígado dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	53
Gráfico 5. Pesos do coração dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	53
Gráfico 6. Pesos do baço dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	54
Gráfico 7. Pesos dos rins dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	54
Gráfico 8. Pesos do cérebro dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	55
Gráfico 9. Valores da enzima AST dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	60
Gráfico 10. Valores da enzima ALT dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	61
Gráfico 11. Valores da enzima fosfatase alcalina dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	61
Gráfico 12. Valores de uréia BUM dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	62
Gráfico 13. Valores de colesterol dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	62
Gráfico 14. Valores de creatinina dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	63
Gráfico 15. Valores de hematócrito dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	68
Gráfico 16. Valores de contagem de hemácias dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	69
Gráfico 17. Valores de contagem de leucócitos dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	69
Gráfico 18. Valores de contagem de plaquetas dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i.....	70
Gráfico 19. Média da espessura do septo interalveolar por grupo experimental analisado.	78
Gráfico 20. Relação entre hepatócitos mononucleados, binucleados e a contagem total de hepatócitos por grupo experimental.....	86
Gráfico 21. Média de células sinusoidais contabilizadas por lâmina analisada.....	86
Gráfico 22. Média de células sinusoidais contabilizadas por campo analisado.....	86
Gráfico 23. Média da área glomerular por grupo experimental analisado.....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C - Antes de Cristo

ADE - Resposta imune dependente de anticorpos

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

AN - Anticorpos neutralizantes

BLT - Do inglês “bone marrow, liver, thymus”

C - Proteína estrutural do capsídeo ou core viral

CEUA - Comitê de Ética para a Utilização de Animais de Laboratório

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório

CE - Célula endotelial

cm - Centímetros

CN- Controle negativo

DC - Dengue clássica

DEN - Dengue

DENCO - Do inglês “Dengue Control”

DENV - Vírus dengue

DENV-1 - Vírus dengue sorotipo 1

DENV-2 - Vírus dengue sorotipo 2

DENV-3 - Vírus dengue sorotipo 3

DENV-4 - Vírus dengue sorotipo 4

DG - Dengue grave

E - Proteína estrutural do envelope

ECP - Efeito citopático

FD - Febre do dengue

FHD - Febre hemorrágica do Dengue

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

g- Gramas

h.p.i - Horas pós infecção

Hsp - do inglês “heat shock protein”

IFN - Interferon

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

ICAM-3 - Do inglês “Intercellular adhesion molecule 3”

IL - Interleucina

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

IP - Intraperitoneal

IV - Intravenosa

KDa - KiloDaltons

MET - Microscópio eletrônico de transmissão

mm - Milímetro

mRNA - RNA mensageiro

NS - Não estrutural

NOD - Diabéticos não obesos

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

ORF - Do inglês “Open Reading Frame” – Fase de leitura aberta

pH - Potencial hidrogeniônico

p.i. - Pós-infecção

PNH - Primatas não humanos

PrM/M - Proteína pré membrana/ Membrana

PSD - Partícula semelhantes aos vírus dengue

RE - Retículo endoplasmático

RJ - Rio de Janeiro

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

RT-PCR - Reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase

SCD - Síndrome do Choque por Dengue

SCID - Imunodeficiência combinada grave

ssRNA - Do inglês “single-stranded RNA” – RNA fita simples

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TGO - Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP - Transaminase Glutâmico Pirúvica

TNF- Fator de necrose tumoral

vRNA - RNA viral

3' NC - Região 3' não codificante

5'NC - Região 5' não codificante

°C - Graus Celsius

μL - Microlitro

1. Introdução

A dengue (DEN) é considerada a arbovirose de maior importância no mundo e é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a doença viral transmitida por vetores com a propagação mais rápida, possuindo enorme potencial para causar grandes epidemias por todo o globo (WHO, 2013; Guzman & Harris, 2015). O número real de casos de DEN é subnotificado e muitos desses são classificados de maneira equivocada. Estimativas realizadas em 2013 sugerem que cerca de 390 milhões de pessoas são infectadas por ano (Bhatt *et al.*, 2013), das quais 96 milhões apresentam manifestações clínicas, com 500 mil episódios de dengue grave (DG) e mais de 20 mil mortes relacionadas à doença (Murray, Quam & Wilder-Smith, 2013).

Questões relacionadas à patogênese e ao desenvolvimento de fármacos e vacinas são centrais no contexto da DEN. Apesar dos avanços, a falta de um modelo animal experimental adequado, capaz de desenvolver a doença com aspectos semelhantes aos observados em casos humanos quando inoculados com amostras isoladas a partir de pacientes com DEN ainda representa um dos principais entraves para o preenchimento das lacunas existentes (Zompi & Harris, 2012; Na *et al.*, 2017).

Estudos utilizando modelos murinos apresentam resultados promissores, porém a maioria dos modelos propostos utilizam camundongos humanizados ou imunodeficientes, vias altamente invasivas de inoculação (Faugout *et al.*, 1990; Raut *et al.*, 1996; Amaral *et al.*, 2011) ou amostras de vírus adaptados (Johnson *et al.*, 1999; Shresta *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2012), resultando em doença neurológica e paralisia (Costa *et al.*, 2006; Sarathy *et al.*, 2015). Nesse contexto, a utilização de camundongos BALB/c, apresenta grande valor para estudos de patogênese e imunogenicidade de vacinas, uma vez que estes animais apresentam respostas imunológicas eficientes, são menos custosos e mais acessíveis (Balsitis *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foram realizadas infecções experimentais de camundongos BALB/c com uma cepa de DENV-3 não neuroadaptada isolada de caso humano durante a epidemia de 2008, no Estado do Rio de Janeiro e avaliadas as alterações morfológicas em diferentes órgãos e a viremia nesses camundongos, bem como a caracterização deste modelo experimental para estudos de DEN, a partir da avaliação clínica, bioquímica e hematológica frente à infecção por este vírus. Com este estudo, espera-se colaborar com informações no sentido de preencher lacunas sobre a infecção pelos DENV, assim como propor um modelo para estudos da fisiopatologia da DEN.

1.1. Vírus Dengue

1.1.1. Classificação, Morfologia e Estrutura do Genoma

Os vírus dengue (DENVs) são arbovírus pertencentes à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Apresentam quatro sorotipos geneticamente e antígenicamente distintos: DENV-1, DENV- 2, DENV-3 e DENV-4 (Sabin, 1952; Hammon *et al.*, 1960; Westaway *et al.*, 1985). A infecção por um sorotipo induz a produção de anticorpos específicos e imunidade duradoura contra o mesmo. Porém, a imunidade contra os outros três sorotipos é transiente, podendo um indivíduo ser infectado pelos quatro sorotipos ao longo da vida (Sabin, 1952). Em 2013, um quinto sorotipo (DENV-5) foi sugerido durante a investigação de um caso ocorrido em 2007 em Sarawak na Malásia, onde foram realizadas análises a partir de uma amostra de soro de um fazendeiro de 37 anos (Normile, 2013; Vasilakis, 2013). Embora novas descobertas sobre o fato não tenham sido publicadas, o assunto foi alvo de discussão como um novo dilema no controle da doença e no desenvolvimento de vacinas (Mustafa *et al.*, 2015).

Os DENV são mantidos na natureza por um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, tendo como o principal vetor o mosquito da espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762 apud (Knight & Stone, 1977), mais prevalente em áreas tropicais e subtropicais do mundo (Vasilakis & Weaver, 2017).

Com relação à morfologia, os DENV são envelopados, esféricos, possuem nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e medem cerca de 50 nanômetros de diâmetro (Figura 1). Seu genoma consiste em uma fita simples de RNA de polaridade positiva (RNAfs+) com aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Wengler & Gross, 1978) que codificam uma poliproteína precursora contendo três proteínas estruturais [E (envelope), prM (precursora da membrana) processada em M e C (capsídeo)], constituintes da partícula viral madura e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que são expressas nas células infectadas (Rice *et al.*, 1985; Lindenbach & Rice, 2001).

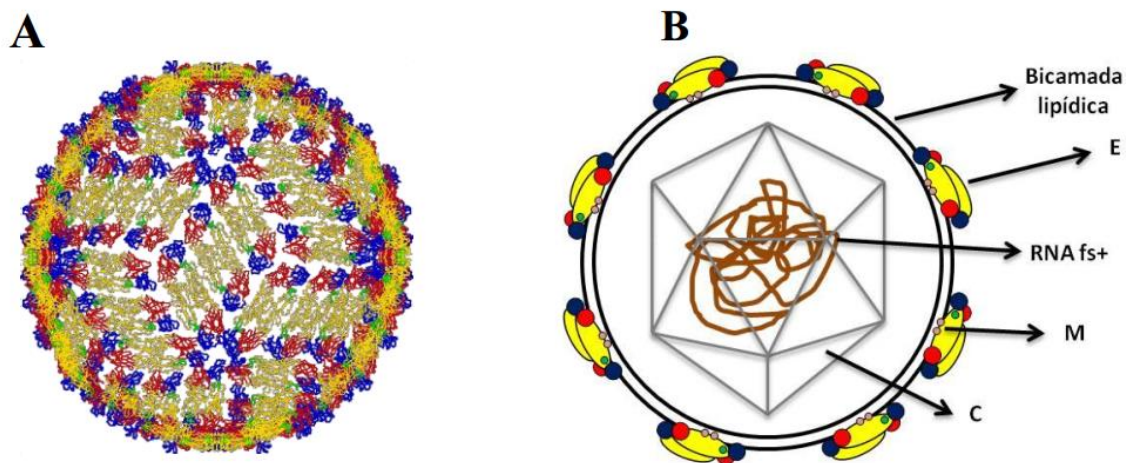


Figura 1. (A) Estrutura do vírion. (B) Esquema da estrutura da partícula do DENV, que é formado pelas proteínas C (capsídeo), M (membrana), envelope (E), RNA de fita simples polaridade positiva “RNAs+” e bicamada lipídica. (Kuhn *et al.*, 2002).

O genoma dos DENVs compreende duas regiões não codificantes de 100 e 400 nucleotídeos nas extremidades 5' e 3' (5'UTR e 3'UTR) e uma única região aberta de leitura (ORF) de RNA. As regiões não codificantes possuem sequências conservadas e estruturas secundárias e terciárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento (Mandl *et al.*, 1998; Shurtleff *et al.*, 2001; Mutebi *et al.*, 2004). A tradução da ORF produz uma poliproteína que durante e após a tradução, é clivada por peptidases celulares, furinas, proteases virais e serina, produzindo 10 proteínas virais (Figura 2).

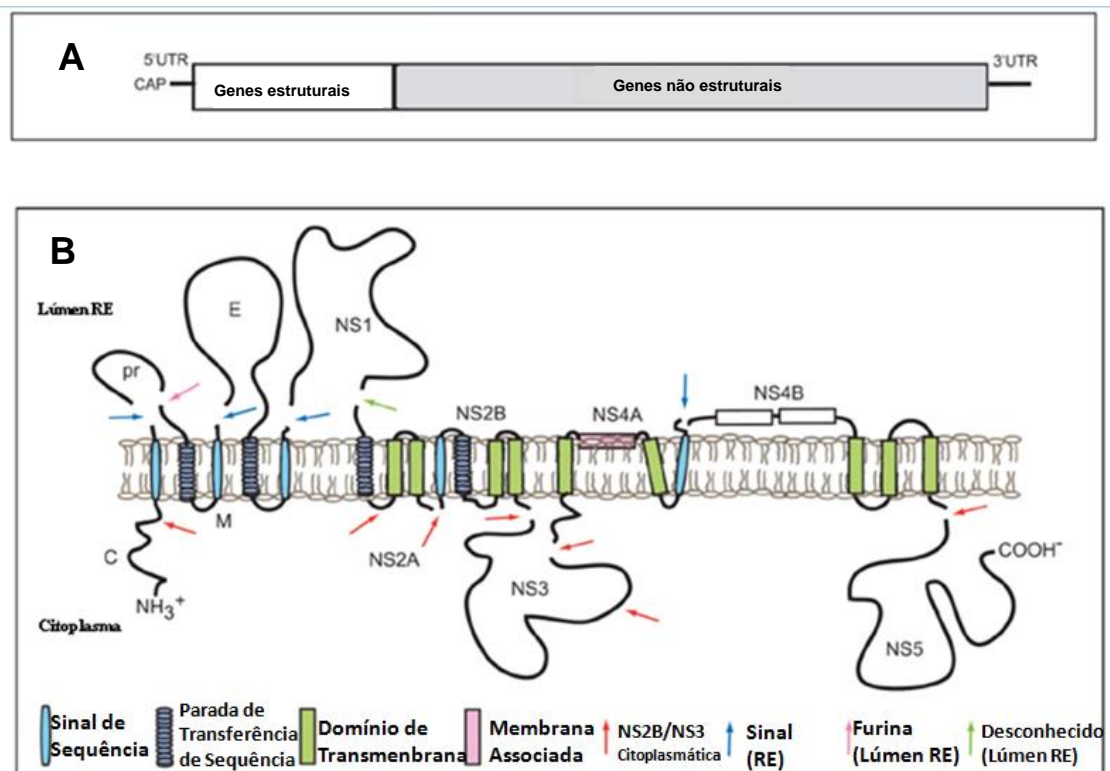


Figura 2. (A) Diagrama esquemático do genoma dos DENV. (B) Diagrama esquemático da poliproteína dos DENV. Retículo endoplasmático (RE). Capsídeo (C), Envelope (E), Não Estrutural (NS), Membrana (M), pr (pré membrana) (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

Dentre as proteínas estruturais, a proteína C (proteína do capsídeo) é a primeira a ser sintetizada, possuindo ~12 quilodalton (kDa) e 100 aminoácidos. Esta proteína possui carga positiva e encapsula o RNA genômico, formando o nucleocapsídeo que, por sua vez, é envolto por lipídeos derivados da célula hospedeira, ao qual estão ancoradas as proteínas de membrana (M) e de envelope (E). Em condições de alta salinidade, o nucleocapsídeo torna-se instável e resulta na dimerização da proteína C (Lindenbach *et al.*, 2007; Byk & Gamarnik, 2016). A proteína M, envolvida no aumento da infectividade e na organização da estrutura da partícula viral, possui aproximadamente 8kDa e 75 aminoácidos, sendo obtida a partir da proteólise da proteína pré membrana (prM) durante a maturação viral (Randolph *et al.*, 1990).

A proteína E é o maior constituinte da superfície dos DENV, com 53 kDa e 495 aminoácidos distribuídos em três domínios (I, II e III). É formada por proteínas pertencentes à classe II N-glicosilada das proteínas diméricas de fusão, que medeiam a fusão e interação da partícula viral com a membrana celular (Ligon, 2005; Rodenhuis-Zybert, Wilschut & Smith, 2010). Além de desempenhar papel importante na virulência, a proteína E é o alvo dominante das respostas humorais contra os DENV e apresentam

atividade hemaglutinante (Wengler, Nowak & Wann, 1987; Heinz & Allison, 2001; Clyde, Kyle & Harris, 2006; Weaver & Vasilakis, 2009). O domínio I, região central da molécula, é responsável pela organização estrutural da partícula viral. O segundo domínio, que representa a maior parte dos contatos do dímero, está relacionado com a fusão da partícula viral com a membrana celular. Já o domínio III tem relação com a virulência de determinadas cepas virais, sendo um componente altamente imunogênico. Acredita-se que o mesmo interaja com os receptores celulares, mediando a entrada do vírus na célula (Nayak et al., 2009; Weaver & Vasilakis, 2009).

Dentre as proteínas não estruturais, proteína não estrutural (NS) 1 é altamente conservada e apresenta peso molecular entre 46-55 kDa, dependendo do grau de glicosilação (Rastogi, Sharma & Singh, 2016). O processo de glicosilação é importante no que diz respeito à virulência e replicação viral. A NS1 existe em várias formas oligoméricas e encontra-se em diferentes localizações celulares: a forma monomérica - intracelular - encontra-se associada a compartimentos vesiculares e intracelulares induzidos pelo vírus; como dímero - associada à membrana - e como hexâmero, forma solúvel que é secretada (Rastogi, Sharma & Singh, 2016). A forma intracelular desempenha um papel crucial na replicação viral, atuando como um cofator do processo e ancorando o complexo de replicação viral (Muller & Young, 2013). As formas dimérica e hexamérica têm sido relatadas na evasão imune e patogênese, através da ativação da cascata do sistema complemento (Muller & Young, 2013; Amorim *et al.*, 2014). Além disso, a detecção de anticorpos anti-NS1 é muito utilizada como ferramenta para o diagnóstico precoce da doença (Weaver & Vasilakis, 2009; Lima *et al.*, 2010).

A NS2A é uma proteína hidrofóbica, de 22 kDa, envolvida no processo de montagem da partícula viral e no complexo de replicação do RNA, interagindo com as proteínas NS3 e NS5 (Khromykh et al., 2001). Além disso, acredita-se que seja também antagonista de interferon (Jones, Patkar & Kuhn, 2005). A NS2B (14 kDa), proteína associada à membrana, forma um complexo estável com a NS3, atuando como cofator para a serina protease NS2B-NS3 (Leung *et al.*, 2001; Erbel *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2013).

A proteína NS3 (serina protease específica) é uma proteína não-estrutural hidrofílica, de aproximadamente 70kDa. É uma proteína multifuncional, atuando como protease, helicase e enzima RNA trifosfatase, além de estar envolvida no processamento da poliproteína e na replicação do RNA viral (Gorbalenya *et al.*, 1989, Li *et al.*, 1999).

A região genômica de NS4 codifica duas proteínas hidrofóbicas: NS4A (16kDa) e NS4B (27kDa). A NS4A apresenta interação com a NS1, envolvida na replicação do RNA como um dos componentes do complexo replicativo. A NS4B atua como um inibidor de sinalização de interferon (Munoz-Jordan *et al.*, 2003; Jones, Patkar e Kuhn., 2005) e colocaliza-se com a NS3 nas estruturas membranosas derivadas do retículo endoplasmático (RE), possivelmente o sítio de replicação do RNA (Lindenbach e Rice, 1999; Lindenbach *et al.*, 2013). Estudos já demonstraram a associação da NS4B com DENV silvestres, sugerindo um possível papel desta proteína na distinção dos genótipos endêmicos de DENV silvestre (Vasilakis *et al.*, 2008).

A NS5, altamente conservada entre os Flavivirus, possui ~103 kDa e é multifuncional, com atividades de metiltransferase e RNA polimerase RNA dependente (Lindenbach e Rice, 2001). Juntamente com a NS3, participa do processo de replicação viral, é um dos componentes do complexo replicativo e pode estimular tanto atividade NTPase e RTPase (complexo NS3-NS5) (Lindenbach *et al.*, 2013). Além do papel na replicação do genoma viral, a NS5 atua na regulação da resposta imune de interferon do hospedeiro, por meio de sua interação com o transdutor de sinal e ativador de transcrição 2 (STAT2) ou, como proposto recentemente, pela modulação do “*splicing*” de RNA no interior da célula hospedeira (Ashour *et al.*, 2009; De Maio *et al.*, 2016; Sahili & Lescar, 2017).

1.1.2. Células alvo na infecção por DENV

O DENV é inoculado na derme e na epiderme do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do mosquito vetor infectado, sendo algumas partículas também injetadas diretamente na corrente sanguínea do hospedeiro (Guzman *et al.*, 2016). Estudos em pele humana mostraram que as primeiras células a serem infectadas pelos DENV são as células de Langerhans e células dendríticas (Wu *et al.*, 2000). A replicação dos DENV ocorre provavelmente primeiramente nas células retículo-endoteliais, células de Langerhans ou nos fibroblastos que se encarregam de levar o vírus até os linfonodos regionais, favorecendo sua disseminação no sangue (Rothman e Ennis, 1999). Como resultado da viremia primária, várias células mononucleares, incluindo monócitos derivados do sangue, células dendríticas e macrófagos esplênicos e hepáticos podem ser infectados (Martina *et al.*, 2009). As células estromais da medula óssea também

mostraram-se suscetíveis à infecção por DENV (Rothwell *et al.*, 1996; Kyle, Beatly & Harris *et al.*, 2007; Martina *et al.*, 2009; Noisakran *et al.*, 2011).

Além dos tipos celulares descritos acima, a presença do RNA e antígeno viral já foi detectada no fígado, pulmão, timo, baço, cérebro, rim, medula óssea e coração (Killen & O'Sullivan, 1993; Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Póvoa *et al.*, 2014; 2016). Ensaios de imunomarcção e hibridização *in situ* identificaram o antígeno viral ou a fita positiva do RNA em células endoteliais (CE) no fígado, pulmão e baço (Jessie *et al.*, 2004; Balsitis *et al.*, 2009; Póvoa *et al.*, 2014). Apesar do tropismo do DENV pela CE *in vivo* ainda permanecer em debate, estudos *in vitro* mostraram que todos os quatro sorotipos podem replicar em CE, onde a infecção resulta em danos funcionais e não morfológicos (Avirutnan *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000; Dalrymple & Mackow, 2012). Ainda não está claro se as CE de diferentes sistemas e órgãos possuem diferentes suscetibilidades à infecção por DENV.

Em amostras de sangue periférico de pacientes na fase aguda da infecção, o vírus não só pode ser recuperado a partir de linfócitos B, mas também em monócitos, células “*natural killer*” e linfócitos T (King *et al.*, 1999). O genoma viral já foi detectado em plaquetas isoladas de pacientes durante a fase aguda da infecção e partículas semelhantes aos DENV foram identificadas em plaquetas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Noisakran *et al.*, 2009; Da Costa Barros *et al.*, 2018).

1.1.3. Ciclo replicativo dos DENV

A infecção pelo DENV no hospedeiro vertebrado tem início com a inoculação do vírus nesse, durante o repasto sanguíneo do mosquito vetor. A partícula viral infecta uma célula permissiva, através da ligação da proteína E a receptores celulares. Ao longo dos anos, vários receptores envolvidos na adsorção do DENV já foram identificados, dentre eles o heparan sulfato (Chen *et al.*, 1997), “*heat shock protein*” (Hsp) 70, Hsp 90 (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005), lectinas (Hoving *et al.*, 2014; Lo *et al.*, 2016) e a molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica (DC-SIGN) (Lozach *et al.*, 2005; Laureti *et al.*, 2018). Após a adsorção, a partícula é endocitada em vesículas recobertas por clatrin e o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma após a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo. Essa fusão é dependente de pH e ocorre após mudança conformacional da proteína E (Clyde, Kyle & Harris, 2006; Perera & Kuhn, 2008; Lindenbach *et al.*, 2013).

A replicação dos DENV ocorre no citoplasma das células infectadas, em arranjos de membranas intracelulares induzidos pela infecção, chamados de complexos replicativos. Esta estrutura abrange proteínas, RNA viral e fatores da célula hospedeira envolvidos na produção do RNA progênico, formando um ambiente permissível a uma síntese eficiente de RNA e morfogênese viral, além de representar uma estratégia para minimizar a detecção do vírus pelo sistema imune do hospedeiro. (Welsch *et al.*, 2009; Alcaraz-Estrada *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Lindenbach *et al.*, 2013).

Inicialmente, o RNA viral (vRNA) atua como RNA mensageiro (mRNA) para a síntese da poliproteína que é direcionada para o RE, onde é clivada pela proteína NS3 juntamente com seu co-fator NS2B. O processamento da poliproteína é fundamental e ocorre antes do prosseguimento da replicação do vRNA (Clyde, Kyle & Harris, 2006; Perera & Kuhn, 2008; Potisophon *et al.*, 2014).

Durante o processo replicativo, o RNA viral (+) serve como molde para a produção da cadeia de RNA(-) que por sua vez é usado para a geração das novas fitas de RNA(+) da progênie. Além do RNA(+), outros dois tipos de RNA são encontrados dentro da célula infectada: o RNA da forma replicativa (FR), que são RNAs dupla fita (RNAdf), RNase-resistentes e os RNAs intermediários replicativos (IR), parcialmente RNase-resistente. Ambas as formas são precursoras do RNA genômico. De acordo com o atual modelo de replicação dos DENV, o novo RNA(-) sintetizado parea-se com o RNA(+) molde, formando a FR. As FR atuam como molde para geração de múltiplas fitas de RNA (+) via IR, que contém tanto regiões de fita dupla quando de fita simples, para a ação da replicase viral. Dessa forma, o RNA viral é sintetizado de forma semi-conservativa e assimétrica, com as fitas de RNA(+) acumulando-se 10 vezes mais que as fitas negativas. A nova fita de RNA(+) é liberada do IR, seguindo para os ribossomos de forma a iniciar o ciclo de tradução ou é empacotada na partícula recém-gerada (Miller *et al.*, 2010; Lindenbach *et al.*, 2013).

A montagem do CR necessita da proliferação e invaginação das membranas do RE, processos esses provavelmente induzidos pela NS4A e NS3, juntamente com outras proteínas celulares e virais. Acredita-se que oligômeros da proteína NS4A intercalem-se à membrana do RE, formando as invaginações. Tais invaginações dão origem a vesículas membranosas, descritas como o local da replicação viral, uma vez que as proteínas NS e o RNAdf já foram localizados nesta região. A proteína C acumula-se ao redor de gotículas lipídicas derivadas do RE. O RNA recém-sintetizado é empacotado pela proteína C para formar o nucleocapsídeo próximo às membranas do retículo

endoplasmático rugoso (RER). No RE, partículas imaturas de DENV apresentam heterodímeros das proteínas prM e E. Ao migrar pela rede trans-Golgi, a acidificação do pH induz uma modificação conformacional da partícula e uma protease celular cliva a proteína prM para gerar partículas virais maduras onde a proteína E forma homodímeros. Dessa forma, o envelope viral é adquirido por brotamento no lúmen do RE. O produto da clivagem da prM pela furina fica associado aos vírions até que estes sejam liberados para o meio extracelular através do processo de exocitose via complexo de Golgi (Perera e Kuhn, 2008; Yu *et al.*, 2008; Welsch *et al.*, 2009; Alcaraz-Estrada *et al.*, 2010; Lindenbach *et al.*, 2013).

A figura 3 mostra o esquema replicativo dos DENV, destacando os principais eventos intracelulares.

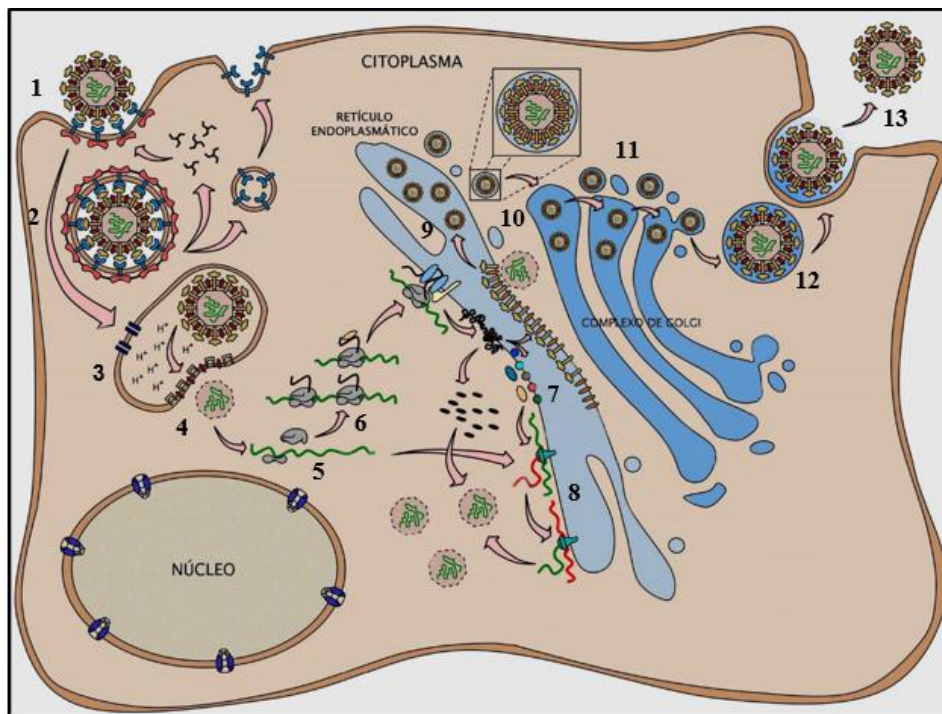


Figura 3. Esquema de replicação dos DENV. 1. Adsorção da partícula viral à membrana celular; 2. Internalização da partícula com formação de vesícula endocítica; 3. Formação e acidificação do endossoma e fusão das membranas vesicular e viral; reciclagem dos receptores celulares; 4. Liberação do nucleocapsídeo no citoplasma; 5. Liberação do RNA viral e às subunidades do ribossomo; 6. Tradução do RNA viral para a formação da poliproteína do DENV; 7. Clivagem da poliproteína do DENV no retículo endoplasmático; 8. Síntese da fita negativa do RNA viral; 9. Formação do envoltório viral junto à membrana do retículo endoplasmático; 10. Migração da partícula viral imatura para o complexo de Golgi; 11. Maturação da partícula viral no complexo de Golgi; 12. Partícula viral madura; 13. Saída do vírion por exocitose via vesículas de Golgi (adaptado de Oliveira, 2004).

1.2. Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue

A DEN é uma doença febril aguda, causada por qualquer um dos quatro sorotipos dos DENV (Edelman & Hombach, 2008). As manifestações clínicas são semelhantes entre os DENV (Rothman & Ennis, 1999), mas podem apresentar intensidades variáveis de acordo com as características do hospedeiro e do vírus. O período de incubação pode variar de três a quinze dias, com média de quatro a sete dias, após o qual a doença apresenta-se sob um espectro clínico que varia desde uma síndrome viral inaparente ou branda à febre da dengue (FD) ou dengue clássica (DC) e doenças hemorrágicas graves (Souza *et al.*, 2008; Romanos *et al.*, 2015).

A maioria dos pacientes é assintomática ou apresenta sinais leves de FD ou DC, que incluem febre de início súbito, com duração média de 2 a 7 dias, cefaléia, dor retro-orbital, congestão conjutival, mialgia, artralgia, prostração, anorexia, sensação de paladar alterado, podendo ocorrer erupção cutânea maculopapular (Souza *et al.*, 2008; Dalrymple & Mackow, 2012). Em crianças, a febre é frequentemente a única manifestação clínica, podendo ou não estar associada a erupções cutâneas e/ou sintomas digestivos inespecíficos. Pode ocorrer vermelhidão na faringe, mas outros sinais respiratórios, tais como tosse e rinite, não são frequentes (Guzman *et al.*, 2016). Durante a fase febril, a leucometria tende a diminuir. Dores abdominais e diarreia podem estar presentes e, em geral, adolescentes e adultos apresentam uma síndrome semelhante à gripe com sintomas digestivos mais proeminentes que os respiratórios, caso ocorram.

As manifestações hemorrágicas, apesar de incomuns na DC, podem ocorrer em alguns indivíduos, sendo mais comuns petéquias, equimoses, epistaxe, hemorragia gengival e metrorragias, acompanhadas ou não de trombocitopenia, surgindo no final do período febril (Cunha & Nogueira, 2005). A forma clássica é autolimitada e geralmente resulta em uma completa recuperação (Nishiura & Halstead, 2007). Alguns pacientes podem evoluir para formas graves da doença, passando a apresentar sinais de alerta, principalmente no período de defervescência.

As manifestações mais graves da DEN, segundo a antiga classificação utilizada pela OMS (1997), eram a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque por Dengue (SCD). No caso da FHD, tendências hemorrágicas, trombocitopenia, extravasamento de plasma, com aumento de hematócrito e diminuição drástica na contagem de plaquetas acompanhavam os sintomas de DC. Sinais de hipotensão,

choque e insuficiência circulatória indicariam a progressão para SCD. Nos casos mais graves, caso um tratamento adequado não seja iniciado rapidamente, o paciente pode evoluir para o óbito em um período de 8 a 24 horas (WHO, 1997; Romanos, 2015; Zompi & Harris, 2012). Outras complicações também podem ocorrer, como encefalopatia, bradicardia e, mais raramente, miocardite e encefalite (Guzman *et al.*, 2016).

1.2.1. Infecção secundária e efeitos na progressão da doença

A recuperação de uma infecção primária por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV é acompanhada pelo desenvolvimento de uma imunidade homotípica duradoura. No entanto, a imunidade heterotípica tem curta duração, de modo que o indivíduo permanece susceptível a uma infecção secundária pelos outros três sorotipos do DENV (Sabin, 1952).

Embora a infecção primária por qualquer um dos quatro sorotipos de DENV seja capaz de causar quadros graves e óbito, evidências epidemiológicas têm mostrado que o aumento do risco para FHD e SCD está associado a uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo (Guzman *et al.*, 2013). Infecções sintomáticas terciárias e quaternárias podem ocorrer, mas raramente apresentam gravidade (Gibbons *et al.*, 2007; Olkowski *et al.*, 2013; Katzelnick *et al.*, 2017).

Diversas teorias são propostas a fim de elucidar os fatores e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da FHD e SCD (Halstead & Cohen, 2015). No entanto, esses não são completamente compreendidos, principalmente devido à ausência de modelos animais adequados, que reproduzam a infecção de maneira similar ao observado em humanos (Thein *et al.*, 1997; Zubair *et al.*, 2016). Duas principais teorias são propostas para explicar o aumento das chances de desenvolvimento de FHD e SCD em infecções secundárias: a facilitação dependente de anticorpos (ADE – *antibody dependent enhancement*) e a teoria do “pecado original” (*T cells antigenic sin*) (Sarathy *et al.*, 2015).

A teoria da ADE considera que anticorpos produzidos em resposta à infecção primária, de reação cruzada e baixa capacidade neutralizante, contribuem para a patogênese da DG ao promover a entrada do vírus através de receptores Fcγ (FcγR) e infecção de células mielóides (Halstead, 1988; Guzman *et al.*, 1990; Halstead, 2003; Mathew & Rothman, 2008), gerando um aumento da infecção dependente de anticorpo (ADE). Acredita-se que o complexo anticorpo-antígeno, ao ser reconhecido e internalizado por macrófagos, aumenta potencialmente o risco de desenvolvimento das

formas mais graves da DEN, em virtude do aumento das células infectadas e, conseqüentemente, da carga viral. Além disso, a infecção acarreta a liberação de mediadores vasoativos na corrente sanguínea, causando o aumento da permeabilidade vascular, ativação do sistema complemento e da tromboplastina tissular (Halstead, 2003; Schmid, Diamond, Harris, 2014; Yacoub, Mongkolsapaya, Sreaton, 2016).

A teoria do “Pecado Antigênico Original” propõe que células B e T de memória, induzidas por exposição prévia a um sorotipo do DENV, geralmente são capazes de se ativar e se multiplicar mais rapidamente que as células “naive” durante uma infecção secundária. Entretanto, essas células de memória reativadas durante a infecção secundária têm baixa afinidade pelos epítomos do sorotipo infectante e por isso são menos eficientes em responder ao segundo desafio (Alexander-Miller, Leggatt & Berzofsky, 1996; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Acredita-se, portanto, que pacientes com DG teriam células T com um potencial citotóxico limitado, não permitindo o controle eficiente da infecção, mas sim a estimulação de células T produtoras de citocinas inflamatórias, induzindo maior dano tecidual e extravasamento plasmático (Duangchinda *et al.*, 2010). A ativação massiva de grande quantidade dessas células de memória, assim como monócitos, macrófagos e células endoteliais pode resultar na liberação e indução de citocinas e mediadores inflamatórios que contribuirão para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático (Pang, Cardoso & Guzman, 2007).

Apesar de diversas teorias serem propostas, postula-se que a ocorrência de casos graves seja multifatorial e inclua fatores nutricionais e genéticos do hospedeiro, idade, sexo, estado imunológico, sorotipo e genótipo viral infectantes (Guzmán & Kourí, 2002; Malavige *et al.*, 2004).

1.2.2. Revisão da classificação dos casos clínicos

Em 2009, a OMS propôs uma revisão da classificação dos casos de DEN vigente desde 1997, a partir da iniciativa intitulada Dengue Control (DENCO) desenvolvida a partir de um estudo prospectivo multicêntrico em várias regiões endêmicas da doença, utilizando critérios de gravidade (WHO, 2009; SVS/MS, 2010). Atualmente, a classificação consiste em DEN sem sinais de alerta, DEN com sinais de alerta e DEN grave (DG) (WHO, 2009) (Figura 4).



Figura 4. Nova classificação dos casos de DEN de acordo com a OMS. Fonte: WHO, 2009.

A revisão das diretrizes buscou auxiliar no reconhecimento precoce dos sinais de alerta, informando aos clínicos quanto ao prognóstico do paciente, permitindo a triagem correta dos casos, na tomada de decisões rápidas, no gerenciamento e nos planos de contingência (Horstick *et al.*, 2014). De fato, estudos clínicos prospectivos desenvolvidos em países asiáticos e latino-americanos concluíram que o sistema de classificação de 2009 apresentou maior sensibilidade na identificação dos casos graves de DEN, em comparação com o sistema anterior (Basuki *et al.*, 2010; Narvaez *et al.*, 2011; Zakaria *et al.*, 2014).

Contudo, embora a classificação de 2009 seja mais aplicável a propósitos clínicos e epidemiológicos do que a de 1997, continua o debate sobre sua utilidade nas pesquisas em patogênese (Guzman *et al.*, 2016). Alguns autores argumentam que as antigas classificações de FHD e SCD eram mais capazes de identificar corretamente os casos de extravasamento de plasma (um dos principais aspectos da patogênese da DEN) que o sistema de 2009 (Simmons *et al.*, 2015; Guzman *et al.*, 2016).

1.3. Patogenia e histopatologia das infecções por dengue

Alterações histopatológicas decorrentes da infecção por DEN, bem como o tropismo do DENV são descritos em diversos órgãos e tipos celulares. Até o momento, a presença viral e achados histopatológicos já foram relatados na pele, fígado, baço, linfonodo, rins, medula óssea, pulmão, timo e cérebro (Martina, Koraka & Osterhaus, 2009).

1.3.1. Fígado

O envolvimento hepático é comumente observado na DEN, corroborando a hipótese que este órgão seja um dos principais alvos na infecção pelo DENV (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Trung *et al.*, 2010). O espectro varia desde uma elevação assintomática das transaminases a falência hepática aguda (Samanta & Sharma, 2015). A elevação dos níveis das transaminases - glutâmico pirúvica (TGP ou ALT) e glutâmico oxalacética (TGO ou AST)- é a alteração mais frequentemente reportada, ocorrendo já no início da fase febril e atingindo o pico no período de convalescência (Kuo *et al.*, 1992; Nguyen, Nguyen e Tieu, 1997; Larreal *et al.*, 2005; Trung *et al.*, 2010). Anormalidades nos níveis de bilirrubina, fosfatase alcalina e gama glutamil transpeptidase também foram observadas (Kuo *et al.*, 1992).

A insuficiência hepática associada ao DENV apresenta alta mortalidade e ocorre tanto associada ao choque quanto na ausência desse (Trung, 2010). Durante o curso da infecção, graus variados de acometimento hepático são observados e acredita-se que resultem da apoptose de hepatócitos causada diretamente pelo vírus, hipóxia devido à perfusão hepática comprometida, estresse oxidativo ou lesão mediada pelo sistema imune do hospedeiro (Diamond *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2004).

As alterações teciduais durante a infecção pelos DENV são comumente verificadas no fígado, corroborando a hipótese de que este órgão seja um dos principais alvos na infecção por esses vírus. Análises histopatológicas de fígado de pacientes revelaram necrose hepatocitária, hiperplasia de células de Kupffer, macroesteatose, focos de hemorragia e edema, infiltrado mononuclear e corpúsculo de Councilman no espaço periportal e tumefação seguida de degeneração vacuolar baloniforme (Burke, 1968; Bhamarapravati, 1989; Basílio De-Oliveira *et al.*, 2005; Seneviratne, Malavige, De Silva, 2006; Leong *et al.*, 2007; Limonta *et al.*, 2012; Kularatne *et al.*, 2014; Póvoa *et al.*, 2014). Análises ultraestruturais revelaram espessamento de hepatócitos e de mitocôndrias, indicando processo apoptótico, acúmulo de lipídios próximo ao núcleo

(microesteatose) e macroesteatose na periferia das células (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Kularatne *et al.*, 2014; Póvoa *et al.*, 2014).

O genoma e antígenos virais já foram detectados em amostras de fígado provenientes de casos fatais em hepatócitos mediozonais ao redor dos focos necróticos (Burke, 1968; Rosen *et al.*, 1989; Sumarmo *et al.*, 1983; Jessie *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2014). Partículas semelhantes aos DENV (PSD) foram observadas no citoplasma de hepatócitos (Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014).

1.3.2. Pulmão

Complicações pulmonares decorrentes da infecção por DENV geralmente incluem edema pulmonar não cardiogênico, hemorragia acompanhada ou não de hemoptise, pneumonite e insuficiência respiratória aguda grave. As complicações geralmente coincidem com o extravasamento plasmático, trombocitopenia e aumento das transaminases. Normalmente, há alterações progressivas na radiografia de tórax na primeira semana, com normalização no 14º dia. Os derrames pleurais são causados principalmente pelo desequilíbrio das pressões hidrostática e oncótica. O edema pulmonar não cardiogênico é uma complicação comum da reposição de líquidos nos pacientes acometidos. A hemorragia tem caráter multifatorial, devido à vasculopatia, disfunção plaquetária ou problemas na coagulação sanguínea (Kumar *et al.*, 2013; Yuvarajan *et al.*, 2015; de Almeida *et al.*, 2017). O envolvimento pulmonar extenso em casos fatais de DEN, especialmente em associação com a hemorragia pulmonar é um evento terminal e está associado provavelmente ao choque (Rodrigues *et al.*, 2014).

Estudos histopatológicos de necropsias de pulmão de pacientes revelaram infiltrado inflamatório mononuclear no interstício (pneumonia intersticial), ruptura focal e espessamento de septo interalveolar, hiperplasia de macrófagos alveolares, formação de membrana hialina com hipertrofia de pneumócitos do tipo II, edema intersticial, focos de hemorragia, microabcessos e congestão alveolar difusa. Megacariócitos e fragmentos celulares semelhantes a plaquetas foram observados no espaço alveolar (Basílio-De-Oliveira *et al.*, 2005; Bhamarapavati, Tuchinda, Boonyapaknavik, 1967; Póvoa *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2007; Ahsan *et al.*, 2018). Dilatação dos espaços linfáticos subpleurais, congestão alveolar, hemorragia septal e alveolar e derrame pleural já foram associados aos quadros mais graves de DEN (Setlik *et al.*, 2004; Marchiori *et al.*, 2009; Weerakoon *et al.*, 2011; Idirisinghe, 2013; von Ranke *et al.*, 2013). Através da técnica de imuno-histoquímica, o antígeno viral pode ser detectado

em macrófagos alveolares, em pneumócitos do tipo II, no endotélio vascular pulmonar e em monócitos circulando nos vasos sanguíneos (Miagostovich *et al.*, 1997; Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009). A observação da presença da fita negativa do RNA viral nestas células indica a replicação viral (Lee *et al.*, 2009; Póvoa *et al.*, 2014). Análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram presença de PSD em células endoteliais e em macrófagos alveolares (Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014).

1.3.3. Coração

Manifestações cardíacas associadas ao DENV não são comumente observadas (Gulati, Mahesh e Wari, 2007), porém dentre os pacientes que apresentam algum comprometimento cardíaco, a miocardite é a condição mais encontrada (Satarasinghe *et al.*, 2007; Lee, Teo & Low., 2009; Salgado *et al.*, 2010; Weerakoon *et al.*, 2011). Quadros de arritmia ventricular e atrial, bradicardia e taquicardia sinusal, hipocinesia, choque cardiogênico, efusão pericárdica, falência cardíaca e até infarto do miocárdio já foram associados a casos graves (Obeyesekere & Hermon, 1973; Lee, Teo & Low, 2009; Salgado *et al.*, 2010).

Análises histopatológicas de amostras de coração provenientes de casos fatais revelaram edema intersticial, hemorragia e miocardite focal e difusa, com infiltrado inflamatório formado principalmente por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos (Torres *et al.*, 2013). Pericardite e processo apoptótico em fibras cardíacas, evidenciado por degradação nuclear e alterações mitocondriais também já foram reportados (Lee, Teo & Low, 2009; Weerakoon *et al.*, 2011; Póvoa *et al.*, 2014). Apesar das diversas alterações histopatológicas, a fisiopatologia do envolvimento cardíaco na DEN ainda é mal compreendida. As lesões podem ser resultado direto da presença do DENV no miocárdio, como também consequência da liberação de citocinas (Hober *et al.*, 1993; 1996; Shivanthan *et al.*, 2014). Além disso, tem sido proposto que alterações no armazenamento de cálcio nas células infectadas podem contribuir diretamente no desenvolvimento da miocardite (Sangle *et al.*, 2010). O genoma e antígenos NS1 e NS3 dos DENV já foram detectados no tecido cardíaco (Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011). Outros fatores, como a presença da fita negativa do RNA viral nas células endoteliais, mioblastos, células intersticiais do miocárdio e macrófagos também indicam a infecção pelos DENV (Salgado *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014).

1.3.4. Rim

Diversas formas de acometimento renal já foram identificadas em pacientes com DEN, incluindo a elevação do nível de creatinina sérica e uréia, necrose tubular aguda, síndrome hemolítico-urêmica, proteinúria, glomerulonefrite, síndrome nefrótica e a lesão renal aguda (Horvath *et al.*, 1999; Lombardi *et al.*, 2008; Oliveira & Burdmann, 2015). Apresentando altas taxas de mortalidade, a lesão renal durante o curso da DG possui mecanismos que incluem a instabilidade hemodinâmica, lesões diretas causadas pelo vírus, lesão glomerular aguda e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Mohsin *et al.*, 2009; Upadhaya *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014; Repizo *et al.*, 2014; Khunchai *et al.*, 2015; Mishra, Singh & Nanda, 2015; Oliveira & Burdmann, 2015; Pagliari *et al.*, 2016). Outras causas relacionadas incluem a hemólise e a rabdomiólise (Lombardi *et al.*, 2008; Oliveira & Burdmann, 2015).

Análises morfológicas de amostras de rim de casos fatais de DEN revelaram distúrbios circulatórios e danos no parênquima, caracterizados por sinais de necrose tubular aguda, congestão medular, microabcessos no córtex renal, focos de hemorragia, edema, trombos nos capilares glomerulares, perda da membrana basal (principalmente em túbulos contorcidos proximais) microangiopatia trombótica e glomerulopatia (Wiersinga *et al.*, 2006; Mohsin *et al.*, 2009; Upadhaya *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014; Repizo *et al.*, 2014; Ahsan *et al.*, 2018). A deposição de complexos imunes é uma característica histológica comumente observada nas biópsias renais (Futrakul *et al.*, 1973; Boonpucknavig *et al.*, 1976; Boonpucknavig & Soontornniyomkij, 2003). Alterações vasculares também são relatadas e parecem estar relacionadas ao desequilíbrio da resposta imune do hospedeiro, como consequência da liberação de citocinas e células presentes nos locais das lesões (Costa *et al.*, 2013).

Hipertrofia e hiperplasia de células mesangiais e endoteliais, células semelhantes a monócitos em capilares glomerulares e espessamento focal da membrana basal glomerular também já foram descritos (Futrakul *et al.*, 1973). Estudos ultraestruturais evidenciaram alterações nucleares e dilatação do RE nas células necróticas (Laoprasopwattana *et al.*, 2010; Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014). Embora sinais de replicação viral (presença da proteína NS3 ou da fita negativa do RNA viral) não tenham sido observados, o antígeno viral já foi detectado por imuno-histoquímica em células inflamatórias, macrófagos, monócitos circulantes e nas células de revestimento dos túbulos (Huerre *et al.*, 2001; Jessie *et al.*, 2004; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2014).

1.4. Epidemiologia

Representando um sério problema de saúde pública, pela crescente incidência global e distribuição geográfica, a DEN está presente em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, com uma intensa transição de ciclo de transmissão epidêmico para endêmico (Guzman *et al.*, 2010).

A introdução do vírus chikungunya (CHIKV) e do vírus Zika (ZIKV) nas Américas, respectivamente nos anos de 2013 e 2015, trouxe novos desafios para a saúde pública. O diagnóstico clínico preciso e o tratamento adequado dos pacientes foram dificultados pela semelhança dos sinais clínicos entre as três arboviroses. A confirmação por diagnóstico sorológico também possui entraves, uma vez que os anticorpos IgM e IgG contra ZIKV e DENV apresentam reação cruzada. Em 2016, mais de 534 mil casos de Zika e 351 mil casos de chikungunya foram relatados. No entanto, apesar da recente introdução dos dois vírus, a DEN continua sendo a doença viral transmitida por mosquitos mais comum nas Américas (Ault *et al.*, 2019).

Parâmetros ambientais, como temperatura e índices pluviométricos, afetam a demografia e o comportamento do vetor, mosquitos do gênero *Aedes*. Além do clima, o aumento desordenado da população global, viagens internacionais, pobreza e a falta de programas sustentáveis, em vários níveis, são fatores considerados de suma importância para entender a grande disseminação da doença em tão pouco tempo. (Guzman *et al.*, 2010).

1.4.1. Dengue no mundo

Os primeiros relatos de uma doença semelhante à DEN foram inicialmente descritos em uma Enciclopédia médica chinesa datada da dinastia Chin (265 a 420 a.C), posteriormente editada nos anos de 610 d.C. (Dinastia Tang) e 992 d.C. (Dinastia Norte Sung). Chamada de 'veneno da água', acreditava-se na época que a doença se correlacionava de algum modo com insetos voadores associados à água (Gubler, 2006).

As primeiras epidemias de DEN ocorreram entre 1779 e 1780 simultaneamente na Ásia, África e América do Norte. Nesta época, a DEN era considerada uma doença benigna e não-fatal contraída por visitantes dos trópicos e os longos intervalos entre grandes epidemias se justificavam pelo fato de que vírus e mosquitos circulavam apenas entre populações através de viagens marítimas (Gubler & Clark, 1995). Surtos de

doenças nas Antilhas Francesas em 1635 e no Panamá em 1699 também poderiam ter sido por DEN (Gubler, 1997; 1998).

Apesar da origem do termo “dengue” ser controversa, sugere-se que esse tenha sido usado pela primeira vez em Cuba. Porém, no ano de 1801, a rainha da Espanha, Maria Luisa, referiu-se a uma doença contraída por ela como dengue. Em cartas ao Palácio Real datadas de 12 de junho de 1801, a mesma diz: “Eu estava doente com uma doença chamada “dengue” e, desde ontem, tinha sangramento” (Soler *et al.*, 1949 apud Gubler, 1997). Entretanto, a origem mais provável da palavra dengue vem do idioma Swahili. Em ambas as epidemias relacionadas com doença semelhante à DEN, em Zanzibar (1823) e na Costa Leste Africana (1870), a enfermidade já era chamada de “*Kadinga pepo*”, expressão swahili que se refere a “uma cãibra repentina, causada por um espírito maligno” (Christie, 1872). Vários outros nomes já lhe foram dados, tais quais “*Knokkelkoorts*” (febre dos ossos) em Jacarta (1779) e “la piadosa” em Cádiz e Sevilha (1784-85). No Brasil, entre 1846-48, a doença era conhecida como “*Polka fever*” (Christie, 1882).

Benjamin Rush, em 1789, relatou o primeiro caso definitivo da doença, denominando-a como “febre quebra-ossos”. Posteriormente foi utilizado o termo “dunga” numa epidemia em Cuba, 1827-28, que logo foi substituído por dengue, pelo qual tem sido conhecida desde então (Halstead, 1992; Gubler, 1997).

Anteriormente ao século XVIII já haviam sido descritas as primeiras pandemias de DEN ou de uma doença muito semelhante (Gubler, 1998). Durante os séculos XVIII e XIX, a febre do dengue dispersou na América do Norte, América do Sul, Caribe, Ásia e Austrália. A propagação pelo continente americano deve-se às repetidas introduções do vetor, introduzidos pelos navios negreiros e comerciais que atravessaram o oceano Atlântico oriundos da África (Rodriguez-Roche e Gould, 2013).

A constatação de que mosquitos eram os artrópodes vetores da DEN ocorreu na década de 1900, a partir de estudos conduzidos por Graham (1903) e Bancroft (1906), sendo o último a descrever o mosquito *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) como transmissor da doença (Bancroft, 1906 apud Cao-Lormeau, 2009). Também no ano de 1906 foi determinada a etiologia viral (Ashburn & Craig, 1906 apud Pontes & Ruffino-Netto, 1994). Em 1926, foi possível estudar a transmissão da doença em voluntários e estabelecer o período de incubação em mosquitos (Simmons *et al.*, 1931 apud Schlesinger, 1977). Estudos realizados em Taiwan, Filipinas e no Pacífico demonstraram que *Ae. albopictus*,

Ae. polynesiensis e *Ae. scutellaris*, poderiam ser eficientes vetores dos DENV (Gubler, 1997).

Entre os anos de 1823 e 1916, houve uma nova série de pandemias, partindo da África para a Índia e da Oceania para as Américas. Os casos foram causados provavelmente pelo mesmo sorotipo, transportado entre as regiões através das atividades comerciais e do tráfico de escravos (Gubler, 1997; Weaver e Vasilakis, 2009). Leichtenstern (1896) foi o primeiro a reconhecer a DEN com uma doença dos portos marítimos das regiões costeiras, com capacidade de dispersão para o interior ao longo dos rios. A invasão dos trópicos pelo *Ae. aegypti* africano deve-se, provavelmente, à circulação de pessoas e ao armazenamento de águas nos veleiros. Esses fatores, combinados, foram responsáveis pela mudança do perfil da doença no Sudeste Asiático, Subcontinente Indiano e Filipinas, resultando no aparecimento de epidemias urbanas (Weaver & Vasilakis, 2009).

Apesar de ter sido descrita no século XVIII, o isolamento do DENV, em camundongos, ocorreu somente em 1943. O experimento resultou no isolamento dos dois primeiros sorotipos do DENV – os sorotipos 1 e 2 (DENV-1 e DENV-2) por pesquisadores japoneses e americanos (Hotta, 1952; Sabin, 1952; Gubler & Clark, 1995). Na década de 1950, os sorotipos 3 e 4 (DENV-3 e DENV-4) foram isolados durante a epidemia de FHD ocorrida nas Filipinas (Gubler, 1997; Guzman *et al.*, 2010).

Após a Segunda Guerra Mundial, uma epidemia global de DEN teve início no sudoeste asiático (Halstead, 1992) e em 1975, casos de FHD tornaram-se a principal causa de hospitalizações e morte entre crianças nesta área (Gubler e Clark, 1995). A DEN foi reintroduzida no Pacífico no início dos anos 1970 e epidemias causadas pelos quatro sorotipos já eram reportadas. Na África, o número de epidemias tem crescido significativamente desde a década de 1980, sendo o leste da África a região onde há maior ocorrência da doença (Gubler & Clark, 1995).

Nas Américas, uma campanha objetivando o controle da febre amarela liderada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) erradicou o mosquito *Ae. aegypti* entre as décadas de 1950 e 1960 (Guzmán & Kouri, 2003). Durante esse período, epidemias de DEN ocorriam esporadicamente em ilhas do Caribe. Com a descontinuação do programa de erradicação do vetor, os DENV voltaram a circular em países do continente americano. Em 1970, o DENV-2 estava presente nas Américas e o DENV-3 apresentava uma distribuição focal na Colômbia e em Porto Rico. O DENV-1 foi introduzido no continente em 1977, causando epidemias na Jamaica, em Cuba, em Porto

Rico e na Venezuela. Mais tarde, atingiu outros países caribenhos além de México, América Central e o norte da América do Sul. Em 1981, além da introdução do DENV-4 no leste das Ilhas do Caribe, um novo genótipo de DENV-2 proveniente do sudoeste asiático causou a primeira grande epidemia de FHD em Cuba. Este genótipo disseminou-se rapidamente e em 1995, 14 países do continente americano já haviam reportado casos confirmados de FHD (Guzmán & Kouri, 2003).

Nas últimas décadas, a incidência de DEN tem crescido dramaticamente no mundo, com mudanças no perfil epidemiológico (Wilson & Chen, 2015). Com mais de um terço da população mundial vivendo em áreas de risco de infecção, o DENV é uma das principais causas de doença e mortes nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (CDC, 2016). Antes da década de 1970, apenas nove países registravam epidemias graves. Entretanto, atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países da África, Américas, Sudoeste Asiático e regiões oeste do Pacífico (WHO, 2014). As áreas mais afetadas são as Américas, o sudoeste asiático e as regiões do Mediterrâneo oriental e oeste do Pacífico, onde em 2010, mais de 2,3 milhões de casos foram notificados.

Em 2013, o número de casos reportados somente na Américas foi de 2,35 milhões. Contudo, com o crescente número de casos, a DEN tem se disseminado por novas áreas e atualmente existe a ameaça de possíveis surtos no continente europeu. Em 2010, foram reportados casos autóctones na França e Croácia. Em 2012, um surto na Ilha da Madeira, em Portugal, resultou em mais de 2000 casos, além de casos importados em outros 10 países europeus. Em 2013 foram notificados casos na Flórida, Estados Unidos e Yunnan, na China. Já em 2014, o número crescente de casos de DENV-3 tem afetado países das Ilhas do Pacífico (WHO, 2014).

No ano de 2015, somente nas Américas foram registrados 2,35 milhões de casos, dos quais 10.200 foram diagnosticados como dengue grave, com 1181 óbitos. No mesmo ano, Delhi, na Índia, registrou seu pior surto desde 2006, com mais de 15.000 casos. O Havaí foi afetado por um surto com 181 casos notificados e os países insulares do Pacífico de Fiji, Tonga e Polinésia Francesa continuaram a registrar casos (WHO, 2018). O ano de 2016 caracterizou-se por grandes surtos de DEN em todo o mundo. O continente americano registrou mais de 2,1 milhões de casos, dos quais 1,5 milhões foram provenientes do Brasil (1032 óbitos). A região do Pacífico Ocidental registrou mais de 375.000 casos suspeitos de DEN e as Ilhas Salomão registraram um surto com mais de 7 mil casos suspeitos (WHO, 2018).

Em 2017, uma significativa redução foi reportada nos casos de DEN nas Américas. Em comparação com os 2.177.118 casos notificados em 2016, o total de casos notificados no continente americano no ano de 2017 foi de 584.263 – uma redução de 73%. O número de casos graves e fatais também apresentou diminuição, sendo o mais baixo desde a implementação da Estratégia de Gestão Integrada da Região para prevenção e controle da dengue nas Américas (IMS-Dengue) em 2003 (WHO, 2018. Ault *et al.*, 2019). Os únicos locais que registraram um aumento no número de casos foram o Peru, Panamá e Aruba.

Estudos epidemiológicos apontam que a diminuição dos casos de DEN nas Américas em 2017 foi evidenciada pelos sistemas de vigilância epidemiológica dos países e teve início após as epidemias de chikungunya (2013) e Zika (2015). Além disso, a imunidade cruzada entre ZIKV e DENV também representa uma forte hipótese para a diminuição dos casos. Outra hipótese relevante que não pode ser descartada é o aumento e fortalecimento dos programas de controle de vetores através da eliminação de criadouros por parte da comunidade (Ault *et al.*, 2019).

No primeiro trimestre de 2018 observou-se uma redução de 27% dos casos em comparação ao mesmo período de 2017. Porém, países como Paraguai e Argentina registraram surtos. Casos de DEN também foram notificados em Bangladesh, Camboja, Índia, Mianmar, Malásia, Paquistão, Filipinas, Tailândia e Iêmen.

A Figura 5 mostra a atual distribuição global da DEN, com a média do número de casos reportados entre os anos de 2010 e 2016. (WHO, 2018).

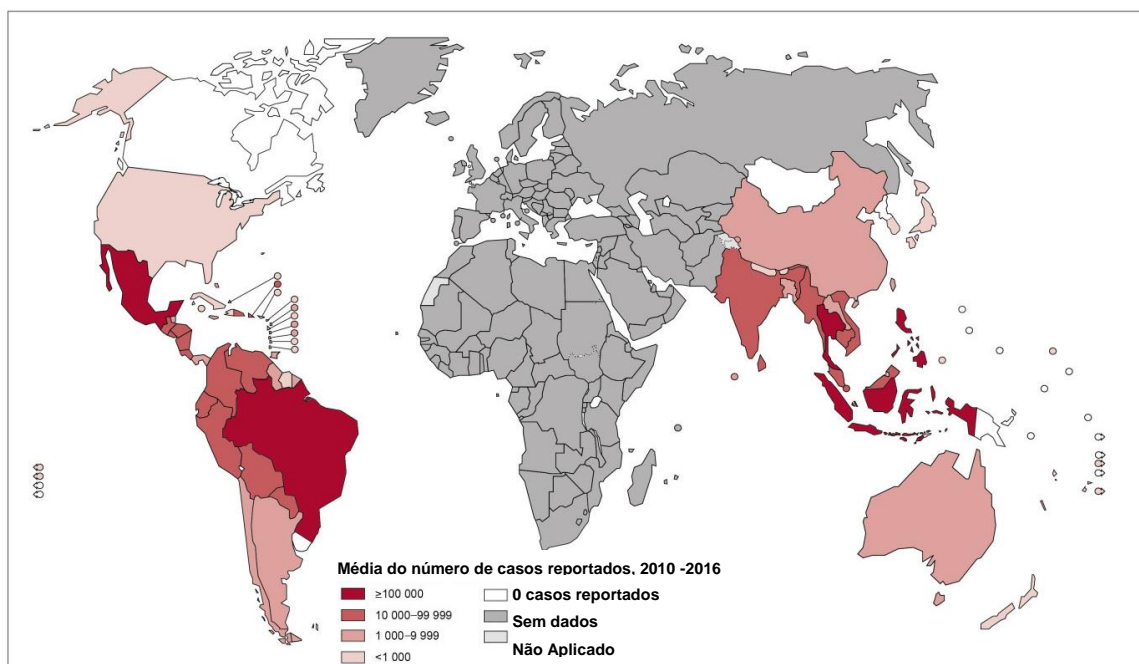


Figura 5. Distribuição global da DEN, com áreas e países apresentando médias do número de casos reportados entre os anos de 2010 e 2016. (Modificado de WHO, 2016).

1.4.2. Dengue no Brasil

O primeiro surto de DEN no Brasil, documentado clínica e laboratorialmente, ocorreu no início da década de 1980 na cidade de Boa Vista, Roraima, no qual foram isoladas as primeiras amostras de DENV-1 e DENV-4. Apesar da transmissão ter permanecido restrita à cidade, um total de sete mil casos foram notificados (Osana *et al.*, 1983).

A DEN se tornou um problema de saúde pública após a introdução e posterior isolamento do DENV-1 no ano de 1986, em Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro, RJ (Schatzmayr *et al.*, 1986). O intenso fluxo de pessoas e a proximidade aos grandes centros urbanos facilitaram a rápida dispersão do vírus, causando uma epidemia explosiva com 92 mil casos reportados (Nogueira *et al.*, 1999). Após sua emergência, o DENV-1 alcançou estados da região nordeste que apresentavam infestação do vetor, como Alagoas, Pernambuco e Ceará (Nogueira *et al.*, 1988; Schatzmayr & Cabral, 2012). Após o isolamento dos primeiros sorotipos, estima-se a ocorrência de mais de dois milhões de casos clínicos ao longo da costa brasileira (Nogueira *et al.*, 1988).

Em 1990, um novo surto ocorreu na Região Metropolitana do RJ, na cidade de Niterói, no qual o DENV-2 foi identificado pela primeira vez no país. Após sua introdução, a situação do Brasil se agravou, sendo notificados os primeiros casos de FHD e SCD

(Nogueira *et al.*, 1990; 1991; 1993). Em 1995-1996, uma nova epidemia foi reconhecida no Rio de Janeiro, causada pelo DENV-1 e DENV-2 (Nogueira *et al.*, 1999).

A circulação do DENV-3 foi identificada em 2000 no município de Nova Iguaçu, RJ, resultando no ano seguinte a cocirculação dos três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) (Nogueira *et al.*, 2002). Em 2002, esse sorotipo foi responsável pela maior e mais grave epidemia ocorrida no país até então, que registrou 771.551 casos (De Simone *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2005) e correspondeu a 80% dos casos ocorridos nas Américas. Desde a última epidemia em 2002, até o ano de 2007 o sorotipo predominante até a semana epidemiológica 48 no estado do Rio de Janeiro era o DENV-3 (SVS/MS, 2008).

Os anos de 2004 e 2005 foram considerados como interepidêmicos (Araújo *et al.*, 2006). A reemergência do DENV-2 em 2007 causou em 2008 uma grave epidemia, com um total de 632.680 casos notificados, 24.571 casos graves e 561 óbitos no Brasil, sendo o estado do Rio de Janeiro o mais afetado com 235.353 casos, 15.730 casos graves e 263 óbitos (Dos Santos, *et al.*, 2013; SVS, 2016). Além disso, a epidemia de 2008 apresentou um novo perfil epidemiológico, com um aumento significativo do número de FHD em menores de 15, representando cerca de 50% dos casos de DEN e 86% dos óbitos em indivíduos ocorrendo nessa faixa etária (Teixeira *et al.*, 2009).

Em 2009, o DENV-1 substituiu o DENV-2 como sorotipo predominante no país, ocasionando uma epidemia com mais de 1 milhão de casos no ano de 2010 - o maior número de casos já registrados no país (SVS, 2010; Dos Santos *et al.*, 2013). A epidemia de 2010 apresentou um padrão espacial distinto das epidemias de 2002 e 2008, na qual observou-se uma grande concentração de municípios com alta taxa de transmissão na região Centro-Oeste e parte da região Sudeste. Os estados de Minas Gerais e São Paulo apresentaram os maiores números de casos registrados no país, 21,1% e 20,3% dos casos, respectivamente. O Rio de Janeiro, epicentro das epidemias anteriores, representou apenas 2,9% dos casos. A ocorrência de óbitos em pacientes que apresentavam comorbidades foi a diferença epidemiológica mais significativa, com incidência de 538,4 casos por 100.000 habitantes. Além disso, destacam-se as taxas de internações em indivíduos com idade superior a 60 anos, diferença para o ano de 2008, no qual as crianças foram as mais afetadas (Siqueira Jr *et al.*, 2011).

Em julho de 2010, o DENV-4 reemergiu no estado de Roraima, cerca de 30 anos após a sua primeira detecção no país (Temporão *et al.*, 2011). Foram confirmados menos de 20 casos de DENV-4 neste Estado ao longo do segundo semestre de 2010, sendo os

primeiros casos decorrentes da dispersão do vírus detectados somente a partir de janeiro do ano seguinte nos estados do Amazonas e Pará. Em março, o DENV-4 foi detectado nos estados do Piauí, Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro (Nogueira & Eppinghaus, 2011).

Em 2011, o número de casos de DEN continuou elevado, embora menor que no ano anterior. No ano de 2012, foram notificados 589.591 casos no país, com 4.425 casos graves e 327 óbitos (SVS, 2016). O aumento do número de notificações retornou ao país no ano de 2013, quando foram registrados 1.476.917 casos de DEN, 6.566 casos graves e 573 óbitos. A região Sudeste foi responsável por aproximadamente 63% dos casos e o DENV-4 foi o sorotipo predominante, correspondendo a 60% dos casos confirmados laboratorialmente no país (SVS, 2016).

Em 2014, o total de casos notificados no país apresentou uma queda, somando 589.107 casos da doença, 673 casos graves e 465 óbitos (SVS, 2013, 2014). No ano de 2015, foram registrados 1.587.080 casos de DEN, com 1.529 casos de DG e 839 óbitos confirmados, o que representa um aumento de 80,4% em comparação com o mesmo período de 2014 (SVS, 2015). Em 2016 foram registrados 1.487.924 casos prováveis de DEN, com 826 casos de DG e 8.116 casos de DEN com sinais de alarme. Em relação aos óbitos, 609 casos foram confirmados, o que representa uma redução no país de 37% em comparação com o mesmo período de 2015, quando foram confirmados 972 óbitos (SVS, 2016b). O DENV-4 e o DENV-1 cocircularam neste período, sendo o DENV-1 mais prevalente e responsável por aproximadamente 90% dos casos confirmados laboratorialmente (SVS, 2015; 2016).

Em 2017, foram registrados 249.056 casos prováveis de DEN no país, onde os casos ocorridos na região Nordeste representaram 34,6% do total. Em relação à DG e DEN com sinais de alarme, foram confirmados 914 e 9.085 casos, respectivamente. Até a Semana Epidemiológica 50 (1/1/2017 a 16/12/2017), 137 óbitos foram confirmados (SVS/MS, 2017). No mesmo ano, foram processadas 1.453 amostras objetivando a identificação do sorotipo, sendo 536 positivas. Dessas, 291 (54,3%) foram positivas para DENV 2, 215 (40,1%) para DENV 1, 23 (4,3%) para DENV 4 e 7 (1,3%) para DENV 3. No ano de 2018, foram confirmados 174.724 casos de DEN no país, com 321 casos de DG e 3.616 casos de DEN com sinais de alarme, dos quais a região Centro-Oeste apresentou os maiores números de casos em relação ao total do país. Até a Semana Epidemiológica 52 (31/12/2017 a 29/12/2018) foram confirmados 155 óbitos (SVS, 2019). Até o momento da escrita deste trabalho, dados a respeito dos sorotipos

circulantes em 2018 e das primeiras Semanas Epidemiológicas de 2019 não haviam sido disponibilizados. Nos últimos 32 anos, grandes epidemias ocorreram no Brasil, com mais de doze milhões de casos notificados (Silva Jr, 2013; SVS, 2016; 2018). A figura 6 apresenta o número de casos de DEN no Brasil, entre os anos de 1986 e 2018.

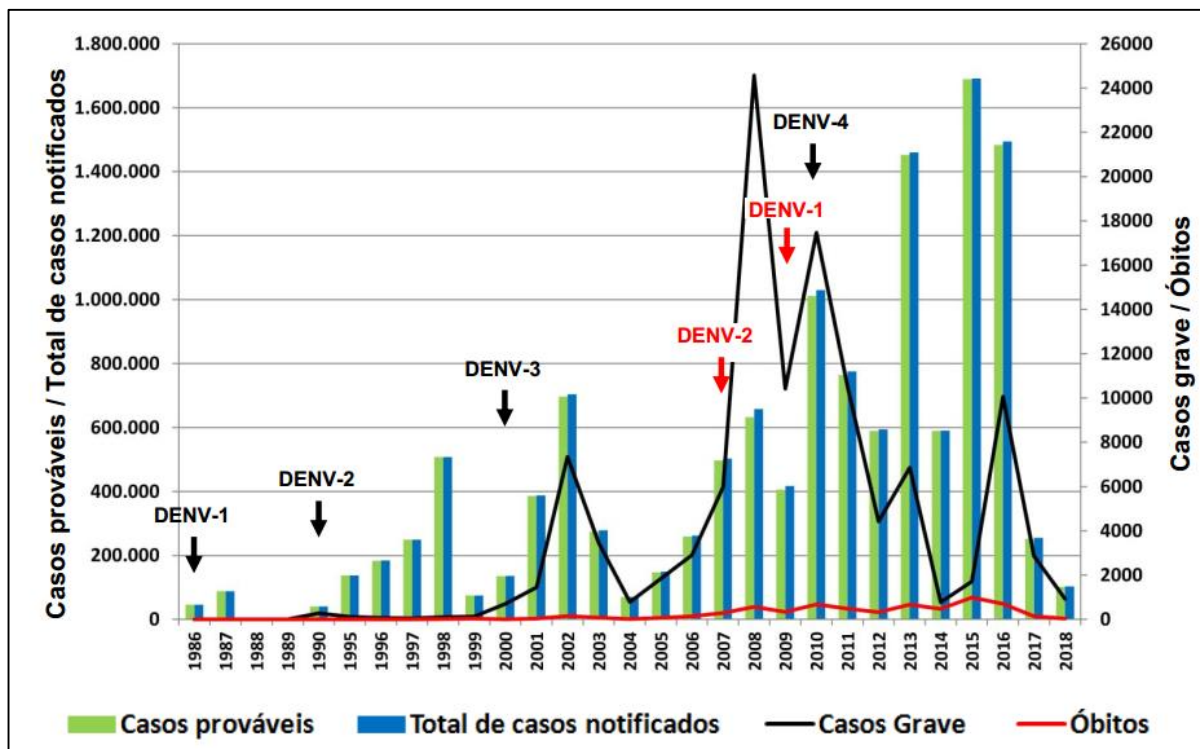


Figura 6. Número de casos de DEN no Brasil, 1986 – 2018. Os sorotipos emergentes estão indicados em preto, enquanto os reemergentes, em vermelho (de Bruycker-Nogueira, 2018).

1.5. Modelos experimentais para o estudo de infecções pelos vírus dengue

Um dos desafios centrais para o entendimento da patogênese dos DENV e no desenvolvimento de uma vacina eficaz e drogas antivirais é a ausência de um modelo animal experimental adequado, que seja capaz de desenvolver a doença com aspectos semelhantes aos observados em casos humanos, quando inoculados com amostras isoladas a partir de pacientes com DEN (Bhamarapavati, 1993; Gubler, 2002; Zompi & Harris, 2012; Na *et al.*, 2017). Apesar dos entraves, vários modelos já foram propostos e têm sido de grande importância para a elucidação de vários aspectos da patogênese dos DENV.

1.5.1. Primatas não humanos (PNH)

Os PNH mantêm o ciclo de transmissão selvagem da DEN, sendo naturalmente infectados pelos quatro sorotipos do DENV (Gubler, 1998). Estudos conduzidos em saguis-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) mostraram que esse modelo apresenta alta viremia e respostas imunes correspondentes às observadas em humanos (Omatsu *et al.*, 2011; 2012). No entanto, esta espécie pertence aos PNH do Novo Mundo, diferindo dos PNH do Velho Mundo no que diz respeito às respostas imunitárias, como os alelos do complexo de histocompatibilidade e reação cruzada de anticorpos. De fato, PNH do Velho Mundo são mais semelhantes aos humanos e tem sido utilizados como modelos de infecção por DENV (Price, Casals & O’Leary, 1974; Koraka *et al.*, 2007; Blaney *et al.*, 2010; Onlamoon *et al.*, 2010). Apesar de tais modelos apresentarem sintomas leves e níveis variáveis de viremia, têm sido utilizados para a investigação da resposta imunológica e para testes de imunogenicidade e eficácia de vacinas candidatas antes da fase de testes clínicos (Zellweger, Prestwood & Shresta, 2010; Zompi & Harris, 2012; Clark *et al.*, 2013; Sariol & White, 2014; Kato *et al.*, 2017).

1.5.2. Modelos murinos

O desenvolvimento de um modelo murino tem sido desafiador, já que isolados clínicos, além de não causarem doença, apresentam baixa ou nenhuma replicação em camundongos imunocompetentes (Zellwegwer, Prestwood & Shresta, 2010; Zompi & Harris, 2012). A maioria dos modelos propostos utilizam camundongos humanizados ou imunodeficientes, vias altamente invasivas de inoculação (Faugout *et al.*, 1990; Raut *et al.*, 1996; Amaral *et al.*, 2011) ou amostras de vírus adaptados (Johnson *et al.*, 1999; Shresta *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2012), resultando em doença neurológica e paralisia (Costa *et al.*, 2006; Sarathy *et al.*, 2015).

1.5.2.1. Camundongos humanizados

Encontra-se na literatura a descrição de diversos modelos humanizados capazes de desenvolver sinais clínicos compatíveis com a DEN, nos quais esses animais, transplantados com tecidos ou que expressam genes humanos, mostram-se ferramentas importantes nos estudos da patogênese da doença (Legrand *et al.*, 2009; Sarathy *et al.*, 2015). Camundongos com imunodeficiência combinada grave (SCID), transplantados com diferentes células de linhagens humanas apresentaram febre, exantema e eritema,

trombocitopenia e até mesmo hemorragia branda no fígado (An *et al.*, 1999; Bente *et al.*, 2005; Kuruvilla *et al.*, 2007; Mota & Rico-Hesse, 2011; Cox *et al.*, 2012) quando infectados pelos DENV por vias diferentes. Viremia também foi observada em muitos destes modelos (Lin *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Kuruvilla *et al.*, 2007; Cox *et al.*, 2012; Frias-Staheli *et al.*, 2014). O aumento dos níveis de citocinas foi verificado em camundongos BLT (do inglês *bone marrow, liver, thymus*) (Frias-Staheli *et al.*, 2014) e em camundongos transplantados com células tronco do sangue de cordão umbilical humano (Mota & Rico-Hesse, 2011). Interferon (IFN) gama, interleucina (IL) 2 e fator de necrose tumoral (TNF) alfa foram produzidas por linfócitos T humanos em camundongos SCID, diabéticos não obesos (NOD) transplantados com células tronco hematopoéticas (Jaiswal *et al.*, 2009). Ao ser infectado pela picada do mosquito, esse modelo foi capaz de produzir TNF- α , IL-4 e IL-10 (Cox *et al.*, 2012). Além disso, os anticorpos detectados no soro destes camundongos humanizados infectados foram capazes de neutralizar o DENV (Kuruvilla *et al.*, 2007; Jaiswal *et al.*, 2009, 2012).

Em diversos estudos de infecção com DENV-2, camundongos humanizados apresentaram sinais clínicos da DEN, viremia, trombocitopenia e produção de citocinas. Porém, os períodos prolongados de viremia observados não são compatíveis com as infecções humanas. Sendo assim, ainda existem várias limitações para a utilização desses modelos em testes pré-clínicos de vacinas, incluindo seu complexo processo de geração (Akkina, 2013; Sarathy *et al.*, 2015).

1.5.2.2. Camundongos imunodeficientes: interferon-deficientes

Estudos utilizando camundongos deficientes em interferon - que não apresentam receptores para IFN α e β e IFN γ (AG129) - demonstraram que há robusta replicação do DENV. Esse modelo, uma vez infectado com vírus neuroadaptados (vírus submetidos a passagens em cérebro de camundongos neonatos), apresenta sinais neurológicos como paralisia, cegueira, permeabilidade vascular aumentada, níveis significantes de TNF α no soro e óbito (Johnson & Roehrig, 1999; Shresta *et al.*, 2006; Prestwood *et al.*, 2008; Milligan *et al.*, 2015; 2017; Sarathy *et al.*, 2015).

Camundongos AG129 apresentaram manifestações graves de DEN quando infectados com altas doses de DENV não adaptado. Neste caso, foi observado extravasamento de plasma levando à hemorragia, comprometimento de órgãos, hipercitocinemia e morte durante o pico da viremia (Tan *et al.*, 2010; Milligan *et al.*, 2015; 2017); quando infectados com doses baixas da mesma cepa, no entanto, mostraram

disseminação do DENV sem qualquer sintoma com replicação do vírus ocorrendo no cérebro, baço e fígado. O aumento da permeabilidade vascular também foi notado, embora não houvesse sinais de hemorragia (Tan *et al.*, 2010). Objetivando estudos de amplificação de resposta tipo ADE, os camundongos AG129 foram inoculados com doses subneutralizantes de anticorpos anti-DENV, antes da infecção pelo vírus. Este modelo apresentou sinais de DG, tais como permeabilidade vascular, elevados níveis de citocinas no soro, trombocitopenia, hematócrito elevado e hemorragia gastrointestinal. O antígeno e genoma viral pode ser detectado em diferentes órgãos, como fígado, intestinos delgado e grosso, estômago, rim e cérebro (Balsitis *et al.*, 2010; Zellweger, Prestwood & Shresta, 2010).

1.5.2.3. Camundongos imunocompetentes

Camundongos imunocompetentes quando infectados com DENV são capazes de produzir viremia (Paes *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006; Yamanaka & Konishi, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012; Jácome, 2015b; Barreto *et al.*, 2015), embora a replicação viral seja menos eficiente em comparação à observada em humanos (Ashour *et al.*, 2010; Morrison & García-Sastre, 2014). Esses animais, quando infectados pela via intracraniana ou inoculados com vírus neuroadaptados ou adaptados em linhagens de células de camundongos, apresentam manifestações neurológicas como encefalite e paralisia, seguida de morte (Falgout *et al.*, 1990; Raut *et al.*, 1996; Atrasheuskaya *et al.*, 2003).

Dentre os sinais clínicos apresentados por modelos imunocompetentes estão: trombocitopenia, hematócrito elevado, extravasamento de plasma, hemorragia e choque (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007). Além disso, já foram relatados aumento dos níveis de diferentes citocinas no soro e produção de AN (anticorpos neutralizantes) (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2012). Camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados pelo DENV apresentam níveis elevados de enzimas hepáticas, indicando que o envolvimento hepático também pode ser observado neste modelo (Chen *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2009).

1.5.2.3.1. Camundongos BALB/c

A utilização de camundongos BALB/c é de grande valor para estudos de imunogenicidade de vacinas, uma vez que estes animais apresentam respostas imunológicas eficientes, são menos custosos e mais acessíveis (Balsitis *et al.*, 2010). Embora acredite-se que estes sejam pouco susceptíveis à infecção pelos DENV (Ashour *et al.*, 2010; Morrison & García-Sastre, 2014), estudos realizados com camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV pela via intravenosa (IV) demonstraram que este modelo é capaz de produzir viremia entre o 2º e o 11º dia pós-infecção (p.i.), atingindo o pico no 7º d.p.i. Contudo, poucos sinais clínicos de DEN podem ser observados, dentre estes trombocitopenia e alteração da função hepática (Paes *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2006).

Estes camundongos são capazes de expressar uma resposta imunológica contra DENV produzindo citocinas e AN (Atrasheuskaya *et al.*, 2003). Análises histopatológicas de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV revelaram espessamento de septo interalveolar, congestão vascular, presença de macrófagos alveolares, células inflamatórias, debris nucleares e eritrócitos no espaço alveolar, plaquetas e células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleadas circulantes em capilares, pequenos focos de hemorragia, edema e hiperplasia do epitélio bronquiolar. Além disso, PSDs foram observadas em macrófagos alveolares (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2006; Barreto *et al.*, 2007; 2009; 2015). Estudos histopatológicos e ultraestruturais de fígado revelam vacuolização do citoplasma, edema intersticial, infiltrado inflamatório mononuclear, capilares sinusóides parcialmente colapsados e vasos sanguíneos dilatados, esteatose, eritrócitos internalizados por hepatócitos, hemorragia e necrose (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2009; Sakinah *et al.*, 2016). Análises morfológicas de tecido nervoso indicaram presença de edema perivascular discreto, em infecção utilizando cepa de DENV neuroadaptado (Atrasheuskaya *et al.*, 2003).

Acerca do tecido cardíaco, estudos morfológicos revelaram presença de infiltrado inflamatório, rarefação citoplasmática de cardiomiócitos, ativação de células endoteliais e plaquetas, caracterizada pela emissão de prolongamentos de membrana citoplasmática, presença dessas no interstício e circulando no capilar, inclusões eletrondensas na região perinuclear de cardiomiócitos e desorganização das fibras cardíacas (Rasinhass, 2013; 2017; Jácome *et al.*, 2015a; b). Além disso, PSDs foram observadas em cardiomiócito e células endoteliais (Jácome *et al.*, 2015a; b)

1.6. Vacinas

Em consequência das dificuldades encontradas na implementação de programas de controle do mosquito vetor da DEN, juntamente com o número crescente de casos de DEN no mundo, o desenvolvimento de uma vacina tetravalente, segura e que garanta uma imunidade protetora de longa duração tornou-se uma das grandes prioridades da OMS.

Um notável progresso tem sido feito no campo do desenvolvimento de vacinas eficazes contra a DEN, no entanto, uma série de importantes desafios permanecem. A epidemiologia dos quatro sorotipos do DENV, as complexas e ainda incompreendidas respostas imunoprotetoras e a ausência de modelo animal adequado que recapitule completamente os eventos da infecção natural, da patogênese e da resposta imune à DEN, continuam sendo os principais entraves para o desenvolvimento de uma vacina contra a DEN (Del Angel & Reyes-del Valle, 2013; McArthur, Sztein & Edelman, 2013; Torresi *et al.*, 2017).

Das vacinas contra a DEN em desenvolvimento, as vacinas atenuadas são as mais avançadas, com três candidatas nas fases 2 ou 3 (NIH TV003/ TV005 e Takeda TDV) e uma na fase 4 (Dengvaxia®). Outras abordagens em testes pré-clínicos e clínicos iniciais incluem vacinas inativadas, recombinantes, de subunidades (domínio III da proteína E ou proteínas NS1) e vacinas de DNA (Schmitz *et al.*, 2011; Kirkpatrick *et al.*, 2015; Osorio *et al.*, 2015; Guy & Jackson, 2016; Katzelnick *et al.*, 2017).

A primeira vacina contra a DEN, Dengvaxia® (tetravalente, atenuada), foi aprovada e licenciada pela OMS para uso em indivíduos entre 9 e 45 anos (Guy *et al.*, 2010), em diversos países onde a doença é endêmica, dentre eles o México, Filipinas, Brasil e El Salvador. Desenvolvida pelo laboratório Sanofi Pasteur (Lyon, França), esta vacina é baseada no vírus atenuado da vacina contra a febre amarela (cepa vacinal 17D – CYD-TDV) (Guirakhoo *et al.*, 2001). Genes M e E dos quatro sorotipos de DENV são substituídos no genoma do vetor atenuado (Vannice, Roehrig & Hombach, 2015; Scott, 2016; Vannice, Durbin & Hombach, 2016).

Resultados das primeiras fases de testes clínicos foram promissores (Sabchareon *et al.*, 2012) e embora tenha reduzido a incidência da doença, a eficácia desta vacina variou conforme idade dos participantes, perfil sorológico, gravidade da doença e sorotipo infectante (maior contra os sorotipos 3 e 4 [71,6% e 76.9%, respectivamente] em comparação aos sorotipos 1 e 2 [54,7% e 43,0%, respectivamente]) (Scott, 2016).

Estudos conduzidos em crianças no Sudeste da Ásia e América Latina demonstraram uma eficácia de 60% contra a doença e percentagens ainda menores foram obtidas quando avaliados os sorotipos 1 e 2 (Dayan *et al.*, 2013; Capeding *et al.*, 2014; Villar *et al.*, 2015; Ferguson *et al.*, 2016; Torresi, Ebert & Pellegrini, 2017). Somados aos dados anteriores, estudos nestas mesmas regiões reportaram um aumento inesperado na incidência de hospitalizações por DG (Hadinegoro *et al.*, 2016; WHO, 2018), indicando que novas avaliações relacionadas à esta vacina são necessárias (Liu, Liu & Cheng, 2016; Torresi, Ebert & Pellegrini, 2017; Halstead, 2018).

Estudos de fase II e III realizados no Brasil demonstraram um aumento de casos de hospitalização por DG em indivíduos previamente expostos ao DENV. Diante dos fatos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) recomendou, em novembro de 2017, que a vacina Dengvaxia® não fosse administrada em indivíduos sem histórico de exposição ao DENV e que novos estudos fossem realizados (ANVISA, 2017). No primeiro semestre de 2018, a OMS recomendou uma triagem sorológica pré-vacinal aos países que estivessem considerando a introdução da vacina, sendo vacinados apenas os indivíduos soropositivos para o DEN (Arien & Wilder-Smith, 2018).

A tabela 1 apresenta uma visão geral do estado atual dos principais candidatos vacinais tetravalentes contra a DEN, com suas respectivas abordagens tecnológicas e estágios de desenvolvimento (Swaminathan & Khanna, 2019).

Tabela 1. Panorama geral do desenvolvimento clínico dos principais candidatos vacinais tetravalentes contra a DEN (Modificada de Swaminathan & Khanna, 2019).

Nome	Antígeno	Desenvolvedor	Fase
CYD-TDV (Tetravalente/ Atenuada/ Recombinante)	Quimera (cepa 17D do vírus da febre amarela (YF) + genes E e M dos DENV)	Sanofi Pasteur	IV
TetraVax-DV (LAV) TV003/TV005 (Tetravalente/ Atenuada/ Recombinante)	Quimera (DENV-1 e DENV-3 não modificados + DENV-2 recombinante + DENV-4)	US National Institutes of Health e Instituto Butantan	III
DENVax (Tetravalente/ Atenuada/ Recombinante)	Quimera (DENV-1/-3/-4 não modificados + DENV-2 recombinante + DENV-2)	Takeda	III
TDENV PIV (Tetravalente/ Inativada)	DENV purificado e inativado	GSK/US WRAIR/Fiocruz	I/II
DEN-80E (Tetravalente/ Subunidade)	Subunidade da proteína E	Merck	I/II
TVDV (Tetravalente/ DNA)	Proteínas prM/E expressas em vetor plasmidial	US NMRC	I
TLAV-TPIV (Tetravalente/ Atenuada+ Inativada/ Recombinante)	Combinação vírus atenuado purificado + vírus inativado purificado	US WRAIR	I

2. Justificativa

A circulação do DENV-3 foi identificada pela primeira vez no Brasil no ano 2000, no Estado do Rio de Janeiro. Dois anos e meio após a sua introdução este sorotipo esteve presente em 22 dos 27 estados brasileiros (Teixeira *et al.*, 2005). Em contraste com as epidemias prévias por outros sorotipos, o DENV-3 disseminou-se rapidamente, afetando inicialmente áreas onde os DENV não haviam circulado. Foram registrados 771.551 casos, correspondendo a 80% dos casos ocorridos nas Américas (Nogueira *et al.*, 2002). O perfil da epidemia de 2002 foi diferente das anteriores no que diz respeito ao aumento significativo na incidência de FHD e pelo fato de que número absoluto de óbitos relacionados à FHD ter superado, pela primeira vez, as mortes causadas pela malária no Brasil (Siqueira Jr *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005). Diversos estudos epidemiológicos correlacionaram a infecção pelo DENV-3 a quadros graves, tanto em infecções primárias quanto secundárias (Eram *et al.*, 1979; Harris *et al.*, 2000; Messer *et al.*, 2002; Guzman *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2011). De fato, no Brasil, este sorotipo apresenta maior associação a sinais e sintomas mais graves, incluindo choque, dor abdominal e exantema, em comparação aos demais sorotipos (Passos *et al.*, 2004).

O estabelecimento de modelos animais para estudos de infecções por DENV tem sido um desafio, uma vez que os vírus epidêmicos circulantes não infectam naturalmente espécies não-humanas (Zompi & Harris, 2012). Neste contexto, tais estudos são de grande relevância para as diversas áreas de pesquisa em DEN, incluindo patogênese, imunidade, desenvolvimento de fármacos, desenho e teste de vacinas.

Estudos prévios realizados pela equipe do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (LMMV), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) demonstram que camundongos BALB/c imunocompetentes, quando infectados experimentalmente com DENV-1 ou DENV-2 não neuroadaptado pelas vias IV ou intraperitoneal (IP), apresentam viremia. Sinais clínicos como tremores, diarreia e aumento da temperatura corporal, bem como alterações teciduais semelhantes aos observados em casos humanos de infecção por DENV foram observados (Barreto *et al.*, 2004; 2007; 2009; 2015; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005; 2009; Rasinhas, 2013; 2017; Jácome, 2015a; 2015b). O antígeno viral foi detectado em amostras de fígado, em células endoteliais e hepatócitos (Barreto *et al.*, 2004; 2007; 2009; 2015; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005; 2009). Ademais, sendo objeto de estudo do LMMV desde 1997, o camundongo BALB/c já foi utilizado como modelo animal experimental para teste de

vacina de DNA com o gene NS1. Os resultados mostraram que esses animais desenvolveram uma resposta imune humoral de longa duração, com produção de altos níveis de anticorpos anti-NS1 e proteção contra um posterior desafio com DENV-2 (Costa *et al.*, 2006). No entanto, os modelos animais nestes e em outros estudos da literatura foram, em sua grande maioria, avaliados frente à infecção pelos DENV-1 e DENV-2.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Analisar as alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e morfológicas em diferentes órgãos (fígado, pulmão, coração e rim) de camundongos BALB/c frente à infecção pela cepa de DENV-3 epidêmica isolada de paciente humano e não neuroadaptada.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar possíveis alterações clínicas e macroscópicas decorrentes da infecção pelo DENV-3 em camundongos BALB/c;
- Analisar possíveis alterações histopatológicas e ultraestruturais em fígado, pulmão, coração e rim de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com o DENV-3 pela via intravenosa, buscando semelhanças com casos humanos de DEN;
- Mensurar as possíveis alterações morfológicas em amostras dos diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV-3;
- Detectar e quantificar o RNA viral a partir de amostras de soro, macerado de diferentes órgãos, urina e saliva de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV-3;
- Avaliar possíveis alterações hematológicas a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c infectados com DENV-3;
- Avaliar possíveis alterações bioquímicas a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c infectados com DENV-3.

4. Metodologia

4.1. Considerações éticas

Todos os procedimentos que foram realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética Para Utilização de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (CEUA-Fiocruz, protocolos P0098-01, LW-50/11 e L-023/2018) (Anexo I).

4.2. Vírus dengue sorotipo 3

A amostra do DENV-3 utilizada (cepa 289/2008-RJ) foi isolada a partir de uma amostra de soro de paciente enviada ao Laboratório Referência em Flavivírus, do IOC, FIOCRUZ. Para a produção do estoque viral, uma alíquota de 100µL foi inoculada em garrafas de 175cm² contendo células de linhagem de mosquito *Aedes albopictus* a uma concentração de 5x10⁵ células/mL. A titulação foi calculada pelo método de Reed & Muench (1938). Ao final de cinco passagens, a cepa representativa apresentou título de 10^{8.23}TCID₅₀/1 mL. Após as passagens, o sorotipo infectante foi confirmado pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpo monoclonal específico para DENV-3 (clone 8A1) (Henchal *et al.*, 1982).

4.3. Camundongos BALB/c

Para as infecções experimentais, foram utilizados 98 camundongos BALB/c machos de 2 meses de idade, pesando entre 20 e 25 gramas e obtidos através do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da FIOCRUZ. Durante os experimentos, os camundongos foram mantidos no Biotério do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira do IOC, Fiocruz, onde temperatura (~20°C), fotoperíodo (12 h/12 h), alimentação e hidratação foram rigorosamente controlados. Ao serem admitidos no biotério, os animais foram identificados através de marcações em alguns pontos do corpo (orelha, pata dianteira, pata traseira, cabeça, dorso e ventre) com ácido pícrico diluído em água e separados em grupos de 5 animais por caixa.

Todas as caixas foram devidamente identificadas com etiquetas contendo informações tais como data de chegada, idade, sexo, número de animais por caixa, data

de inoculação e eutanásia, patógeno contido no inóculo, pesquisador responsável, telefone para contato e número da licença da CEUA.

Os animais utilizados como controles negativos (CN) foram mantidos em caixas separadas dos infectados.

4.4. Experimentação animal

4.4.1. Infecção

Os animais foram contidos com auxílio de um suporte de acrílico e infectados pela via intravenosa. A cauda foi cuidadosamente esticada e 100 µL do inóculo foram injetados vagarosamente na veia caudal. Foram utilizadas seringas de 1 mililitro (mL) e agulhas de 13 x 4,5 mm. Além dos animais infectados com inóculo de DENV-3, uma parcela dos animais utilizados como controle negativo para estudos por microscopia eletrônica de transmissão foi inoculada com 100 µL de meio L-15 pela veia caudal, o mesmo utilizado para a diluição viral. Os animais restantes, utilizados como controle negativo, não sofreram qualquer tipo de intervenção.

4.4.2. Aferição de peso, temperatura retal e sinais clínicos associados à infecção

Os animais infectados tiveram sua temperatura retal e peso corporal aferidos dois dias após a sua admissão no biotério (momentos antes da infecção experimental) e 72 horas pós-infecção (h.p.i.) – momentos antes da eutanásia. Os animais controles (não infectados) tiveram os mesmos parâmetros coletados dois dias após a sua admissão no biotério e 72 horas após a primeira coleta. O grupo dos animais destinados a análises de bioquímica e hemograma tiveram peso e temperatura retal aferidos, além dos tempos citados, em 7 dias pós-infecção (d.p.i) e 14 d.p.i, também em momentos anteriores à eutanásia.

Para a aferição da temperatura retal, os animais foram cuidadosamente contidos e a temperatura foi verificada com auxílio de um termômetro lubrificado com óleo mineral inserido no reto, onde foi mantido até que a coluna de mercúrio se estabilizasse.

Para a aferição do peso corporal, foi utilizada uma balança de alta precisão e uma caixa de plástico colocada sobre a mesma. Após a normalização do indicador da

balança, os animais foram cuidadosamente colocados no interior da caixa, onde foram mantidos até que o visor indicasse a estabilização do valor referente ao peso.

Todos os animais foram observados durante todos os pontos da cinética quanto à presença dos seguintes sinais clínicos: tremores, petéquias, diarreia e óbito. Todos os dados coletados foram registrados em fichas.

4.4.3. Coleta de saliva

Os camundongos destinados a análises moleculares (n=5) foram cuidadosamente contidos e um *swab* embebido em meio de cultura Leibovitz (L-15) foi gentilmente inserido na boca de cada animal. Foram feitos delicados movimentos rotacionais durante um minuto e, após esse período, o swab contendo a amostra de saliva foi acondicionado em um microtubo estéril contendo 0,5 mL de meio L-15 e mantido em freezer -70 °C até o momento das análises. Os animais infectados tiveram suas salivas coletadas dois dias após a sua admissão no biotério (momentos antes da infecção experimental) e 72 h.p.i (momentos antes da eutanásia). Os animais controles (não infectados) tiveram as salivas coletadas nos mesmos dias dos animais infectados.

4.4.4. Eutanásia

Após 72 h.p.i, os animais foram anestesiados com 150 µL de uma solução anestésica composta por cloridrato de xilazina (10 mg/kg) + cloridrato de cetamina (150 mg/kg) + Cloridrato de Tramadol (10 mg/kg) com auxílio de seringas de 1 mL e agulhas de 13 x 4,5 mm. Sob efeito do anestésico, os animais foram afixados pelas patas com agulhas em um suporte de isopor em decúbito dorsal. A dissecação se iniciou com uma pequena incisão na pele para posterior incisão na linha alba para acesso às cavidades torácica e abdominal. Quando observada presença de urina, foi realizada punção na bexiga e coleta do fluido com auxílio de seringas de 1 mL e agulhas de 13 x 4,5 mm. Uma vez expostos, os órgãos foram coletados, pesados e acondicionados de maneiras diferentes, dependendo do objetivo final, conforme descrito a seguir.

Análises por microscopia de campo claro (n=10: 5 animais infectados/ 5 animais não infectados). Durante a eutanásia deste grupo de animais, os órgãos foram analisados e fotografados caso apresentassem algum sinal de alteração macroscópica. Pulmão,

fígado, rim e coração foram coletados e acondicionados em potes de vidro estéreis de 300 mL contendo o fixador Formalina Millionig pH 7,4 por 48 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas em água corrente por 30 minutos, clivadas e acondicionadas em potes de vidro estéreis de 300 mL contendo etanol na concentração de 50% e encaminhadas para o Laboratório de Patologia, IOC, Fiocruz, onde foram estocadas a 25°C até o momento do processamento.

Análises por microscopia eletrônica de transmissão (n=10: 5 animais infectados/3 animais não infectados/ 2 animais controle de meio L-15). Uma vez anestesiados e contidos em suporte de isopor com o abdômen voltado para cima, foi feita uma pequena incisão no peritônio que seguiu até a altura do externo, que foi removido com a finalidade de expôr o coração. Em seguida, uma agulha de 13 x 4,5 mm adaptada a um sistema de canulação foi introduzida no ventrículo esquerdo, o átrio imediatamente seccionado e um fluxo de salina fisiológica (NaCl a 0,9%, pH 7,2) liberado por dois minutos, com o intuito de remover todo o sangue da árvore vascular. Após a interrupção do fluxo de salina fisiológica, teve início o processo de fixação por perfusão, em que o fluxo de paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato de sódio a 0,2M, pH 7,2, foi liberado por trinta minutos. Após o período de fixação por perfusão, os órgãos foram cuidadosamente coletados, acondicionados em tubos estéreis de 50 mL devidamente etiquetados e fixados por imersão em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2. As amostras foram estocadas a 4 °C até o momento do processamento.

Obs: Os órgãos destinados a análises histopatológicas e ultraestruturais foram imediatamente coletados e acondicionados no fixador correspondente, sem passar pelo processo de pesagem.

Hemograma (n=24/ sendo 6 animais por ponto da cinética [CN, 72 h p.i, 7 d p.i e 14 d p.i]). Uma vez anestesiados, os animais destinados a análises hematológicas (hematócrito, contagem de hemácias, contagem de linfócitos e contagem de plaquetas) tiveram 250 µL de sangue total coletados por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa de 1 mL com agulha de 13 x 0,45 mm. O sangue foi acondicionado em microtubos pediátricos contendo EDTA e homogeneizado por 30 segundos. Imediatamente após o procedimento, os tubos contendo as amostras de sangue total destinados às análises hematológicas foram enviados ao ICTB/FIOCRUZ (Plataforma

Fiocruz RPT12C), onde foram analisadas pelo analisador automático hematológico Poch 100- iV DIFF.

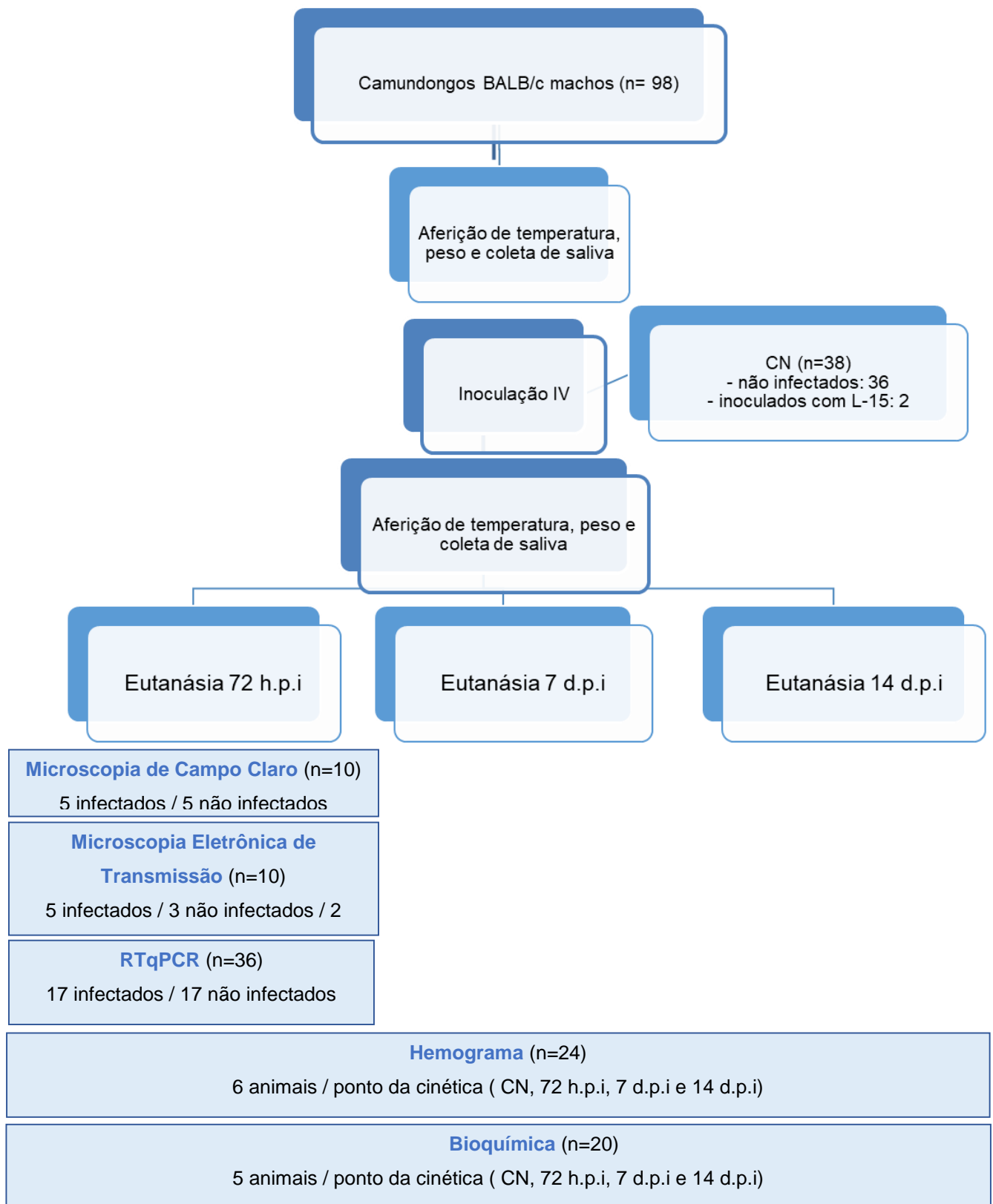
Análises bioquímicas (n=20/ sendo 5 animais para cada ponto da cinética [CN, 72 h p.i, 7 d p.i e 14 d p.i]). Uma vez anestesiados, os animais destinados a análises bioquímicas (AST, ALT, fosfatase alcalina, ureia, colesterol e creatinina) tiveram 250 µL de sangue total coletados por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa de 1mL com agulha de 13 x 0,45 mm. O sangue foi acondicionado em microtubos pediátricos contendo gel separador. Após 30 minutos, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm, a uma temperatura de 4 °C. Imediatamente após o procedimento, os tubos contendo as amostras de soro destinados às análises hematológicas foram enviados ao ICTB/FIOCRUZ (Plataforma Fiocruz RPT12C), onde foram analisadas pelo pelo equipamento Vitros 250.

Análises moleculares por RT-PCR em tempo real (N=34: 17 animais infectados/17 animais não infectados). O soro destinado a análises de viremia foi obtido a partir de punção cardíaca, com auxílio de uma seringa de 1 mL com agulha de 13 x 0,45 mm. A amostra de sangue total foi acondicionada em microtubos de 5 mL estéreis e mantidos inclinados em temperatura ambiente para permitir a coagulação. Após 3 horas, os soros foram transferidos para outros microtubos de 1,5 mL estéreis devidamente identificados. Após a eutanásia, pulmão, fígado, cerebelo, cérebro, rim, baço e coração foram coletados, acondicionados em tubos estéreis de 50 mL devidamente etiquetados. Amostras de saliva e urina foram coletadas de acordo com metodologia já citada. Todas as amostras foram estocadas em freezer -70°C até o momento da extração dos ácidos nucleicos.

Todos os procedimentos foram executados em cabine de segurança de nível de biossegurança 2 (NB-2) e todo o material cirúrgico, assim como qualquer outra ferramenta utilizada na dissecação, foram esterilizados previamente. As carcaças dos animais foram autoclavadas e descartadas.

Segue abaixo o desenho experimental deste estudo.

Fluxograma do desenho experimental para as infecções de camundongos BALB/c machos com o DENV-3. IV: intravenosa, CN: controle negativo, h.p.i: horas após infecção. L-15: meio Leibovitz



4.5. Processamento de amostras para análise em microscopia de campo claro.

Após a coleta e fixação, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Secções de espessura de 5 µm foram obtidas com auxílio de uma navalha de aço revestida com teflon descartável acoplada a um micrótomo (Leica 2025), coradas com hematoxilina e eosina e observadas em microscópio de campo claro AxioHome Carl Zeiss, com câmera HRc5. Duplicatas das secções de pulmão foram coradas com resorcina-fucsina (Weigert, 1898) e duplicatas das secções de rim foram coradas com tricrômico de Masson e pela reação de ácido periódico-Schiff (PAS). Todo o processamento das amostras objetivando análises por microscopia de campo claro foi realizado em colaboração com o Laboratório de Patologia, IOC/Fiocruz.

4.6. Processamento de amostras para análise em microscopia eletrônica de transmissão

Após os procedimentos de fixação por perfusão e pós fixação, os órgãos foram clivados sobre uma placa de Petri com o auxílio de um bisturi de aço inoxidável com a finalidade de obter fragmentos com diâmetro em torno de 1mm³.

Uma vez clivados, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M em sacarose a 7%, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% e novamente lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M em sacarose a 7% em 5 mL de água destilada.

As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (15%, 30%, 50%, 70% em acetato de uranila a 1%, 90% e 100% em sulfato de cobre) e infiltradas em resina epóxi diluída em acetona durante 30 minutos e em resina pura por quatro horas. Realizou-se, então, uma última troca, na qual o material clivado foi depositado em moldes de silicone identificados e mantidos em estufa aquecida a 60°C, por três dias para polimerização. Após o processo de polimerização, os blocos contendo os fragmentos foram retirados das formas de silicone, desbastados com auxílio de uma lixa e uma navalha de aço inoxidável, objetivando o formato de um trapézio ou um quadrado perfeito para que a face do bloco apresentasse uma melhor incidência no ponto de corte da faca de diamante.

Secções ultrafinas (50-70 μm de espessura) foram obtidas com auxílio uma faca de diamante (DiATOME) adaptada ao ultramicrotomo Reichert-Jung E Ultracut e coletadas em grades de cobre de 300 malhas que foram acondicionadas em um suporte próprio, devidamente identificadas para secagem. Uma vez secas, as secções foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (técnica de contrastação positiva) (Reynolds, 1963).

Inicialmente, as alíquotas de acetato de uranila e citrato de chumbo utilizadas, foram centrifugadas por 1 minuto a 3000 rpm. Em seguida, em uma câmara escura, a face da grade contendo o material foi posta em contato com gotas de acetato de uranila por 15 minutos. Após o período de incubação, as grades foram lavadas em três banhos de água destilada e submetidas à incubação por quatro minutos, em citrato de chumbo, em câmara com hidróxido de sódio. Após a segunda incubação, as grades foram novamente lavadas em três banhos de água destilada e acondicionadas em placa de Petri, onde secaram naturalmente e foram mantidas até o momento das análises em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 (Plataforma Fiocruz RPT07G). Todo o procedimento foi executado em capela de exaustão química.

4.7. Extração de Ácidos Nucleicos

Para a extração de ácidos nucleicos, amostras de fígado, coração, baço, pulmão, rim, cérebro e cerebelo foram maceradas em 500 μL de meio de cultura L-15 suplementado com penicilina-streptomicina a 2 % e fungizona a 1 % e centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm, a uma temperatura de 4°C. Amostras de soro, saliva e urina não sofreram qualquer manipulação desde o acondicionamento em *freezer* -70 °C. A extração foi realizada a partir de 140 μL das amostras dos fluidos e do sobrenadante dos órgãos macerados, utilizando-se o conjunto comercial de diagnóstico QIAmp Viral RNA minikit. O método emprega membranas de sílica gel em conjunto com centrifugações das colunas. As amostras foram inicialmente lisadas sob condições altamente desnaturantes, para inativar as RNAses e garantir o isolamento do RNA viral intacto. Foram realizadas lavagens com dois diferentes tampões que garantem a ligação do RNA à membrana e remoção dos contaminantes. Por fim, o RNA foi eluído da membrana utilizando 60 μL de tampão livre de RNAses.

4.8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Para quantificação do genoma viral, a curva padrão foi construída a partir de uma diluição seriada de RNA extraído de uma amostra de DENV-3 (cepa CH53489), de título conhecido ($3,9 \times 10^5$ TCID/0.1 mL), gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunologia Viral (IOC/FIOCRUZ). O protocolo empregado segue o recomendado pelas instruções do kit SuperScriptIII Platinum One-Step Quantitative RT-PCR, utilizando-se os iniciadores DENJ3-R (5'-CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT3') e DENJ3-F (5'-GGACTGGACACACGCACTCA-3'), desenhados a partir de um fragmento da região 3' não codificante, e sonda DENJ3-P (Cy3 5'-ACCTGGATGTCCGGCTGAAGGAGCTTG-3' BHQ-1).

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; 0,5 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 uM. Numa microplaca óptica de 96 micropoços primeiramente foram adicionados 20µL da mistura, contendo os iniciadores, sonda, água e o conjunto comercial de diagnóstico SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR em cada poço. Posteriormente, foram acrescentados 5µL do RNA extraído, totalizando assim um volume final de 25µL/poço.

As amostras e a curva padrão foram aplicadas em duplicatas. As placas foram colocadas na plataforma LineGene 9660 para a reação de qRT –PCR, seguindo os parâmetros de ciclagem disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da qRT-PCR, de acordo com o protocolo modificado de Johnson, 2005.

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

4.9. Análises estatísticas

Todos os dados referentes à aferição da temperatura, peso, hemograma e testes bioquímicos foram incluídos em base de dados do Microsoft Excel (Microsoft Corporation, EUA). Na construção desta, foi determinado que cada parâmetro clínico (temperatura, peso corporal e peso dos órgãos), hematológico (hematócrito, contagem de hemácias, contagem de linfócitos e contagem de plaquetas) e bioquímico (AST, ALT, fosfatase alcalina, ureia, colesterol e creatinina) corresponderia a uma variável quantitativa. Os valores de média, desvio padrão, mediana e amplitude interquartil foram calculados e, em seguida, aplicado o teste de normalidade (*Shapiro Wilk*) para cada variável. Valor de $p < 0.05$ ($\alpha = 5\%$) foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando-se os pacotes estatísticos SPSS Statistics versão 25.0 e GraphPad Prism versão 6.0.

4.10. Análises histomorfométricas

Objetivando quantificar algumas possíveis das alterações induzidas pela infecção experimental pelo DENV-3 em camundongos BALB/c (espessamento de septo interalveolar, aumento de hepatócitos binucleados e células sinusoidais e hipertrofia de glomérulos), foram realizadas análises histomorfométricas do pulmão, fígado e rim (Tabela 3).

Para as análises de pulmão, foram utilizadas dez lâminas (cada uma correspondendo a um animal) contendo seções histológicas coradas com hematoxilina e eosina, sendo cinco desses referentes ao grupo controle e cinco referentes ao grupo 72h.p.i. Este protocolo também foi aplicado para análises em fígado e rim, foram também utilizadas 10 lâminas no mesmo esquema de divisão anterior. De cada lâmina foram captadas 30 imagens de campos diferentes a um aumento de 40X em microscópio de campo claro AxioHome Carl Zeiss, com câmera HRc5. O programa computacional de processamento de imagens de domínio público, Image J, foi utilizado para as análises.

Tabela 3. Órgãos e os respectivos parâmetros avaliados nos estudos histomorfométricos.

Órgão	Parâmetro	Quantidade
Pulmão	Espessura do septo alveolar	20 septos/campo
Rim	Dimensão do glomérulo	Todos/campo
Fígado	Contagem de hepatócitos uninucleados, binucleados e células sinusoidais	Todos/campo

5. Resultados

5.1. Análises estatísticas

Todas as variáveis analisadas apresentaram distribuição não-normal, com valores de mediana utilizados para descrição e comparação dos resultados entre grupos.

5.2. Clínica

Durante a realização da etapa de experimentação animal, nenhum camundongo veio a óbito e todos os animais foram eutanasiados. Os animais destinados às análises por microscopia de campo claro (N=5) apresentaram eriçamento de pêlo em 72 h p.i. Sinais clínicos como paralisia, tremores, diarreia e petéquias não foram observados durante o período entre a infecção e a eutanásia em nenhum dos grupos.

Em relação à temperatura retal, camundongos não infectados apresentaram medianas da temperatura inicial (T1) e final (T2) de 36,5 °C e 36,2 °C, respectivamente. A mediana da variação de temperatura foi de 0 °C. Já em camundongos 72 h p.i. pelo DENV-3, as medianas da temperatura inicial (T1) e final (T2) foram de 36,2 °C e 36,9 °C, com mediana de variação igual a 0,5 °C. Comparando-se as medianas da T1 e T2 do grupo controle, o valor de p encontrado foi de 0,670. Já no grupo 72 h p.i., o valor de p para essa comparação de medianas foi igual a 0,187. Comparando-se as medianas da T1 entre os grupos controle e 72 h p.i., o valor de p encontrado foi de 0,845. Porém, quando comparadas as medianas da T2 entre os grupos controle e 72 h p.i., o valor de p encontrado foi de 0,013 ($\alpha < 0,05$). A comparação das medianas da variação de temperatura entre os grupos controle e 72 h p.i. apresentou valor de p igual a 0,08 (Gráfico 1).

Em relação ao peso corporal, camundongos não infectados apresentaram medianas de peso inicial (P1) e final (P2) igual a 25,8 g e 25,95 g, respectivamente. A mediana da variação de peso foi de 0,45 g. Já em camundongos 72 h p. i. pelo DENV-3, as medianas de P1 e P2 foram de 26,6 g e 25,2 g, respectivamente, com mediana de variação igual a 0,6 g. Comparando-se as medianas de P1 e P2 do grupo controle e grupo 72 h p.i., os valores de p encontrados foram de 0,724 e 1 respectivamente. Comparando-se as medianas de P1 entre os grupos controle e 72h p.i., o valor de p encontrado foi de 0,41. Quando comparadas as medianas de P2 entre os grupos controle e 72 h p.i., o valor de p encontrado foi de 0,148. A comparação das medianas da variação

de peso entre os grupos controle e 72h p.i. apresentou valor de p igual a 0.841 (Gráfico 2)

Gráfico 1: Temperaturas retais iniciais (T1) e finais (T2) dos animais pertencentes ao grupo controle (CN) e 72 h.p.i, apresentando os valores de p para cada comparação entre medianas (md).

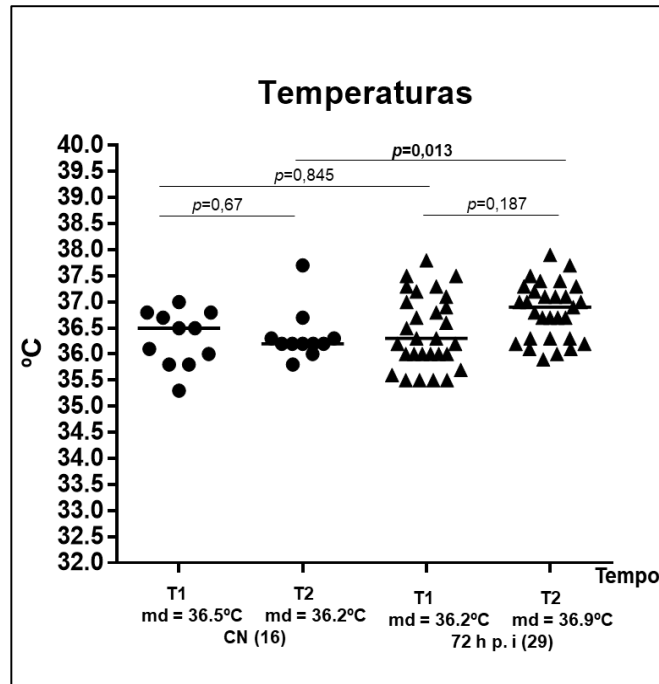
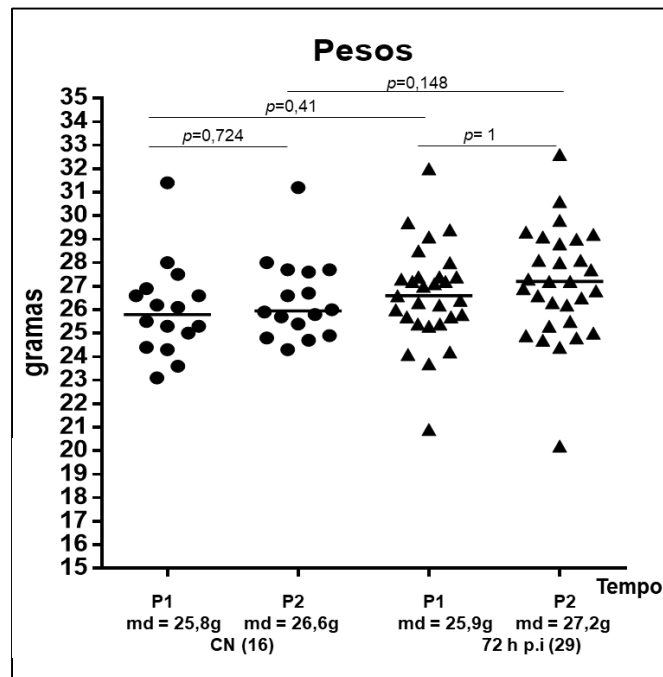
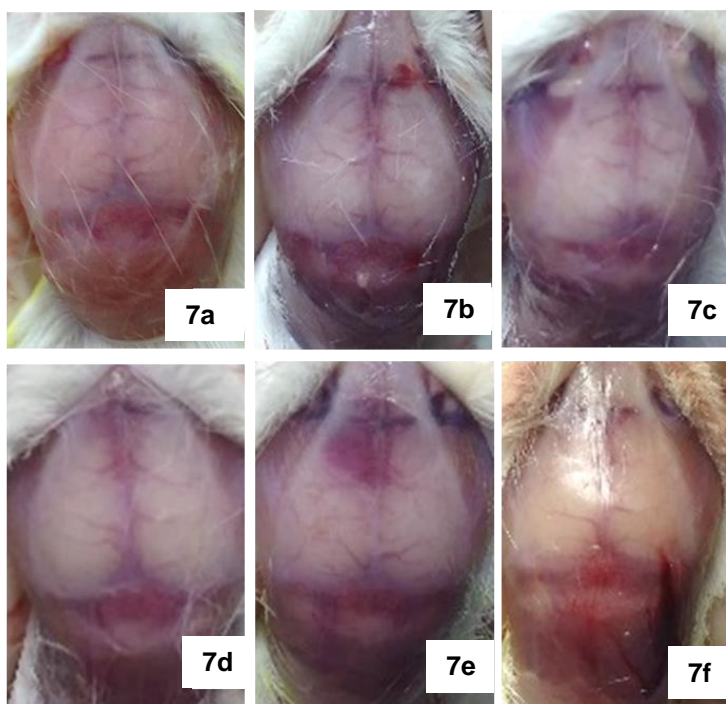


Gráfico 2: Pesos iniciais (P1) e finais (P2) dos animais pertencentes ao grupo controle (CN) e 72 h.p.i, apresentando os valores de p para cada comparação entre medianas (md).



5.3. Macroscopia

Análises macroscópicas das caixas cranianas de camundongos BALB/c pertencentes ao grupo controle negativo revelaram simetria, com membranas meníngeas de aspecto preservado, translúcido e ausência de hematomas e/ou lesões focais (Figura 7a). Já em camundongos 72 h p.i, foi observado acúmulo focal de sangue na região anterior da dura máter (Figura 7b-7f). Nenhuma outra alteração macroscópica foi observada em fígado, pulmão, baço, coração ou rim.



Figuras 7a – 7f. [a] Caixa craniana representativa de camundongo BALB/c pertencente ao grupo controle (não infectado) e **[b-f]** caixas cranianas dos animais 72 h p.i pertencentes ao grupo das análises por microscopia de campo claro.

5.4. Peso dos órgãos

Os resultados referentes à pesagem dos órgãos (pulmão, fígado, coração, baço, rim e cérebro) de camundongos BALB/c não infectados apontaram mediana do peso do pulmão igual a 0,2 g, fígado de 1,5 g, coração e baço medianas iguais a 0,1 g. Já rim e cérebro apresentaram medianas iguais a 0,4 g. Os valores individuais dos pesos dos órgãos dos animais não infectados, bem como suas respectivas medianas, estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo controle (não infectados).

Animal	Peso pulmão (gramas)	Peso fígado (gramas)	Peso coração (gramas)	Peso baço (gramas)	Peso rim (gramas)	Peso cérebro (gramas)
1	0,2	1,6	0,2	0,1	0,2	0,4
2	0,1	1,8	0,2	0,1	0,4	0,5
3	0,1	1,4	0,1	0,1	0,4	0,4
4	0,2	1,7	0,2	0,1	0,4	0,3
5	0,2	1,5	0,1	0,1	0,4	0,5
6	0,3	1,4	0,1	0,2	0,4	0,4
7	0,2	1,7	0,2	0,1	0,5	0,4
8	0,3	1,6	0,1	0,1	0,4	0,4
9	0,2	1,3	0,1	0,1	0,3	0,4
10	0,2	1,4	0,1	0,1	0,3	0,5
11	0,2	1,5	0,1	0,1	0,3	0,5
Mediana	0,2 g	1,5 g	0,1 g	0,1 g	0,4 g	0,4 g

Camundongos 72 h p.i apresentaram mediana do peso do pulmão igual a 0,2 g. Fígado apresentou mediana de 1,4 g. Coração e baço apresentaram medianas iguais a 0,1 g. Rim e cérebro apresentaram medianas de 0,5 e 0,4 g, respectivamente. Os valores individuais de peso dos órgãos de cada camundongo do grupo experimental 72 h.p.i estão plotados na tabela 5.

Tabela 5. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo 72 h.p.i.

Animal	Peso pulmão (gramas)	Peso fígado (gramas)	Peso coração (gramas)	Peso baço (gramas)	Peso rim (gramas)	Peso cérebro (gramas)
1	0,3	1,4	0,4	0,2	0,6	0,5
2	0,2	1,5	0,2	0,1	0,6	0,5
3	0,3	1,8	0,2	0,1	0,5	0,5
4	0,2	1,6	0,2	0,2	0,5	0,4
5	0,2	1,4	0,2	0,1	0,4	0,5
6	0,2	1,6	0,1	0,1	0,5	0,4
7	0,2	1,5	0,1	0,1	0,4	0,4
8	0,2	1,4	0,1	0,1	0,5	0,4
9	0,2	1,3	0,1	0,1	0,4	0,4
10	0,1	1,3	0,1	0,1	0,4	0,3
11	0,2	1,3	0,1	0,1	0,4	0,4
12	0,2	1,4	0,2	0,1	0,3	0,4
13	0,2	1,5	0,1	0,1	0,4	0,4
Mediana	0,2 g	1,4 g	0,1 g	0,1 g	0,5 g	0,4 g

Camundongos pertencentes ao grupo 7 d.p.i apresentaram medianas de peso do pulmão igual a 0,2 g. Fígado, coração e baço apresentaram medianas de 1,5 g, 0,2 g e 0,1 g respectivamente. Rim e cerebelo apresentaram medianas de peso iguais a 0,5 g, respectivamente. A tabela 6 apresenta os pesos individuais dos órgãos para cada animal do grupo 7 d.p.i.

Tabela 6. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo 7 d.p.i.

Animal	Peso pulmão (gramas)	Peso fígado (gramas)	Peso coração (gramas)	Peso baço (gramas)	Peso rim (gramas)	Peso cérebro (gramas)
1	0,3	1,5	0,2	0,1	0,5	0,5
2	0,2	1,5	0,2	0,1	0,5	0,5
3	0,2	1,4	0,1	0,1	0,4	0,5
4	0,3	1,6	0,2	0,1	0,5	0,5
5	0,2	1,5	0,2	0,2	0,5	0,4
6	0,2	1,4	0,2	0,1	0,4	0,4
7	0,2	1,4	0,1	0,1	0,4	0,5
8	0,2	1,5	0,2	0,1	0,4	0,4
9	0,2	1,6	0,2	0,1	0,5	0,5
10	0,2	1,6	0,2	0,1	0,4	0,5
Mediana	0,2 g	1,5 g	0,2 g	0,2 g	0,5 g	0,5 g

Por fim, as análises realizadas nos camundongos pertencentes ao grupo 14 d.p.i mostraram medianas de peso do pulmão igual a 0,2 g. As medianas de fígado, coração e baço apresentaram valores iguais a 1,6 g, 0,1 g e 0,1 g respectivamente. Rim e cérebro apresentaram medianas de peso iguais a 0,5 e 0,4 g, respectivamente. A tabela 7 apresenta os pesos individuais dos órgãos para cada animal do grupo 14 d.p.i

Tabela 7. Pesos dos órgãos dos camundongos BALB/c pertencentes ao grupo 14d.p.i

Animal	Peso pulmão (gramas)	Peso fígado (gramas)	Peso coração (gramas)	Peso baço (gramas)	Peso rim (gramas)	Peso cérebro (gramas)
1	0,2	1,6	0,1	0,1	0,5	0,4
2	0,2	1,6	0,2	0,1	0,5	0,4
3	0,2	1,2	0,1	0,1	0,3	0,4
4	0,2	1,6	0,1	0,1	0,4	0,5
5	0,2	1,6	0,2	0,1	0,5	0,5
6	0,2	1,4	0,1	0,1	0,4	0,4
7	0,2	1,6	0,1	0,1	0,4	0,5
Mediana	0,2 g	1,6 g	0,1 g	0,1 g	0,5 g	0,4 g

Os gráficos resultantes da pesagem de cada órgão, bem como os valores de p resultantes da comparação de medianas entre os grupos experimentais estão dispostos abaixo.

Gráfico 3. Pesos dos pulmões dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

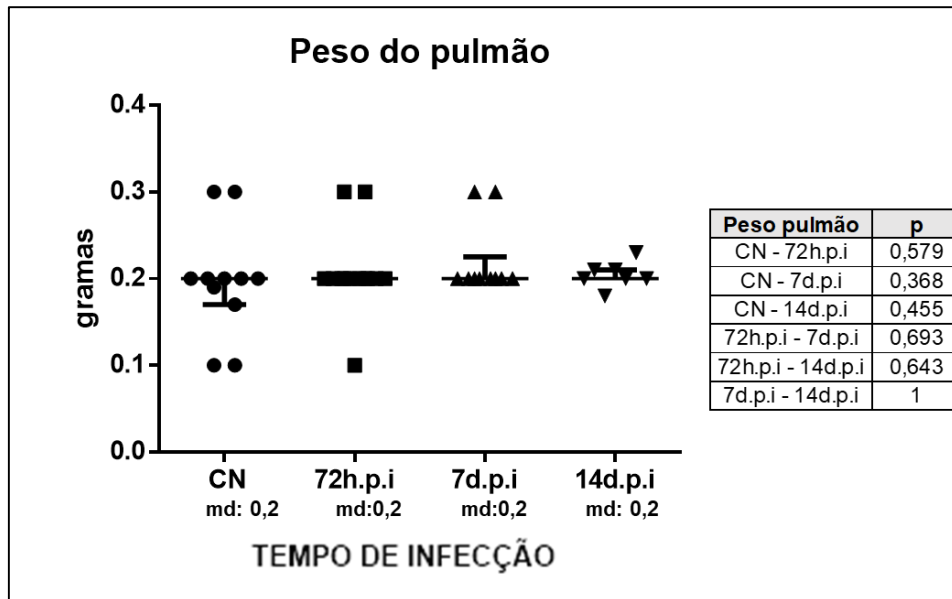


Gráfico 4. Pesos do fígado dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

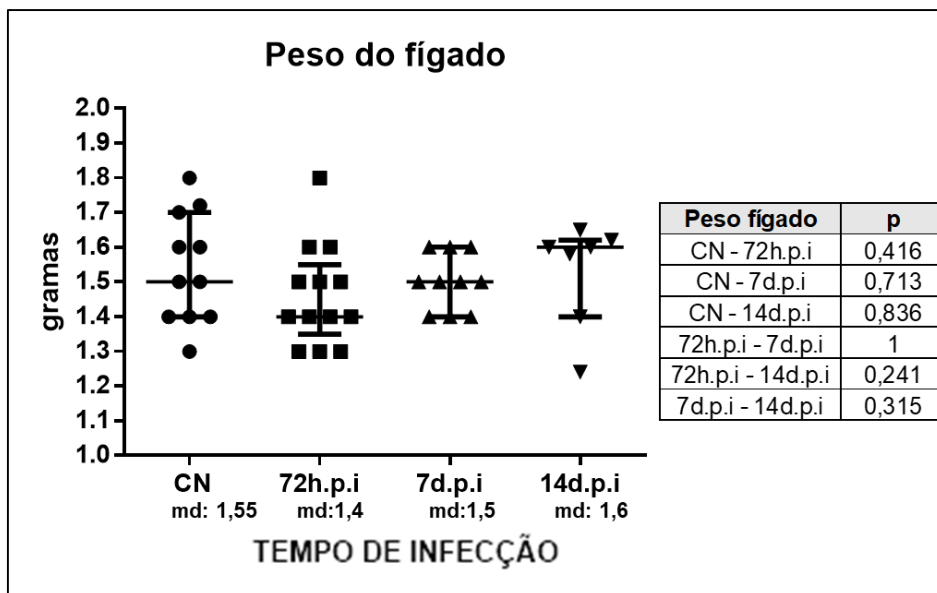


Gráfico 5. Pesos do coração dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

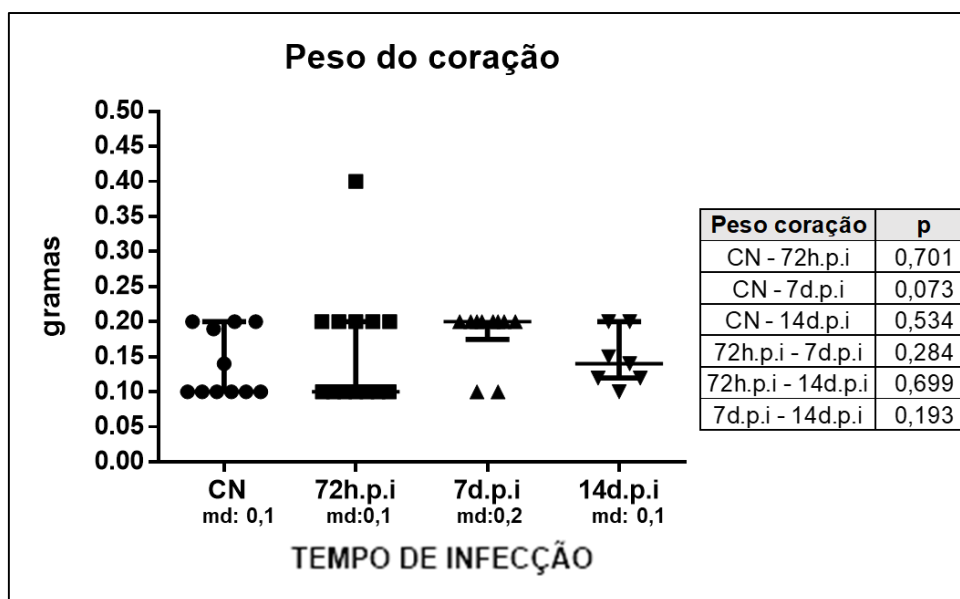


Gráfico 6. Pesos do baço dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

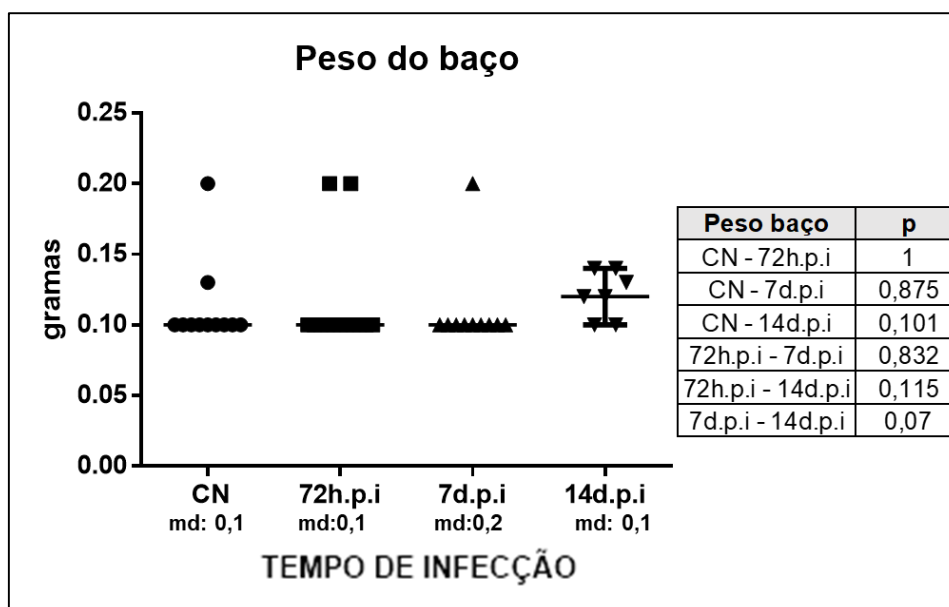
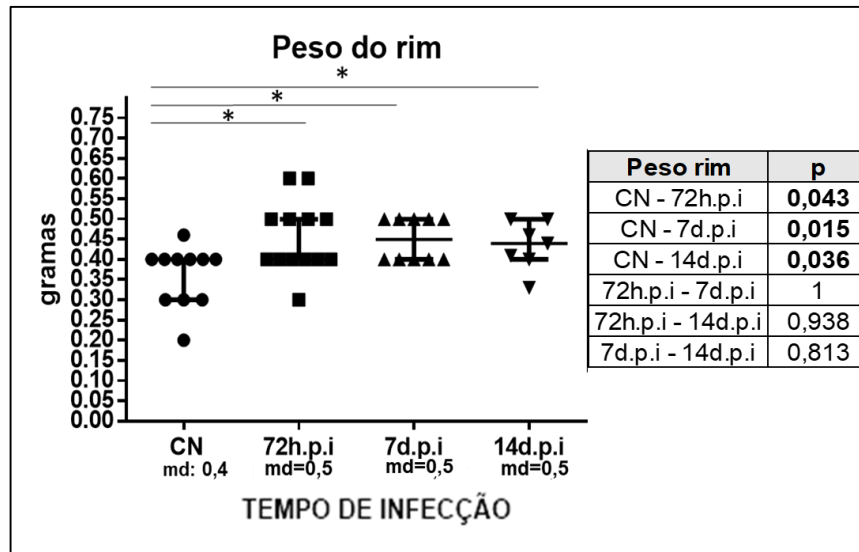
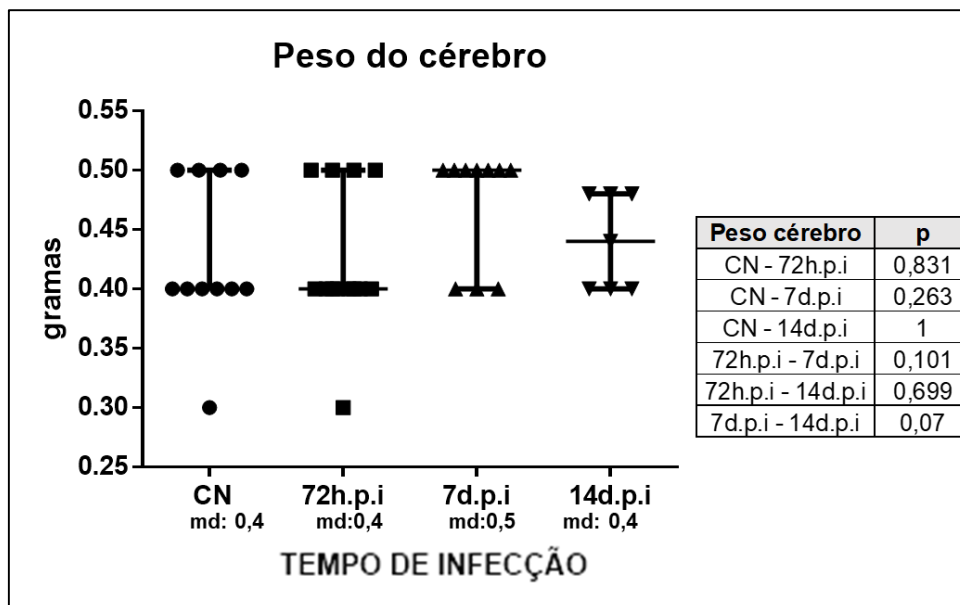


Gráfico 7. Pesos dos rins dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.



* $p < 0,05$

Gráfico 8. Pesos do cérebro dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.



5.5. Análises bioquímicas

Os resultados referentes às análises bioquímicas realizadas a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c não infectados demonstraram mediana de AST e ALT igual a 274 e 138U/L, respectivamente. Para AST, o valor mínimo encontrado foi de 62 U/L e o valor máximo de 850 U/L. ALT apresentou valor mínimo de 41 U/L e máximo de 702 U/L. Fosfatase alcalina apresentou mediana de 101 U/L e valores variando de 83 U/L a 115 U/L. Ureia BUN (*blood urea nitrogen*), colesterol e creatinina apresentaram medianas de 45,8 mg/dL (min: 39 mg/dL- máx: 57,7 mg/dL), 93 mg/dL (min: 77 mg/dL- máx: 105 mg/dL), e 0,10 mg/dL (min: 0,10 mg/dL- máx: 0,20 mg/dL), respectivamente. Os valores individuais dos animais testados, bem como suas respectivas medianas, estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos).

Animal	AST (U/L)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Uréia BUN (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
1	402	138	S.A	S.A	S.A	S.A
2	479	319	S.A	S.A	S.A	S.A
3	274	226	S.A	S.A	S.A	S.A
4	100	86	S.A	S.A	S.A	S.A
5	78	60	S.A	S.A	S.A	S.A
6	96	70	S.A	S.A	S.A	S.A
7	406	179	101	45.8	77	0,2
8	279	218	115	57.7	105	0,1
9	850	702	83	50.1	85	0,1
10	62	45	92	39	93	0,1
11	69	41	110	43.2	103	0,2
12	AH	AH	AH	AH	AH	AH
13	AH	AH	AH	AH	AH	AH
14	AH	AH	AH	AH	AH	AH

15	AH	AH	AH	AH	AH	AH
MEDIANA	274 U/L	138 U/L	101 U/L	45,8 mg/dL	93 mg/dL	0,1 mg/dL

SA: Sem amostra. AH: Amostra hemolisada

Camundongos 72 h p.i apresentaram mediana de AST igual a 132 U/L (min: 84 U/L- máx: 703 U/L), ALT igual a 54 U/L (min: 30 U/L- máx: 201 U/L), e fosfatase alcalina igual a 88 U/L (min: 74 U/L- máx: 107 U/L). A dosagem de ureia BUN, colesterol e creatinina apresentou medianas de 39,55 mg/dL (min: 34,7 mg/dL- máx: 50,2 mg/dL), 95 mg/dL (min: 64 mg/dL- máx: 106 mg/dL) e 0,20 mg/dL (min: 0,2 mg/dL- máx: 0,2 mg/dL), respectivamente.

Dois animais (2/9) apresentaram valores de AST acima da mediana do controle – 703 e 417 U/L – com esse último também apresentando o único valor de ALT acima da mediana do controle (281 U/L). Apenas 1 animal (1/4) apresentou valor de fosfatase alcalina acima da mediana do controle (107 U/L). Um animal (1/4) apresentou dosagem de ureia BUN acima do valor da mediana do controle (50,2 mg/dL). Dois animais (2/4) apresentaram valores de colesterol abaixo da mediana do controle (91 e 64 mg/dL). Em relação à creatinina, todos os animais apresentaram valores iguais a 0,2 mg/dL, acima da mediana do controle. A tabela 9 apresenta os valores individuais dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 72 h.p.i.

Tabela 9. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 72 h.p.i.

Animal	AST (U/L)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Uréia BUN (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
1	132	30	AS	SA	SA	SA
2	84	51	AS	SA	SA	SA
3	93	50	AS	SA	SA	SA
4	131	54	AS	SA	SA	SA
5	703	128	AS	SA	SA	SA
6	143	86	74	35.1	106	0.2
7	195	77	91	44	99	0.2
8	100	50	107	34.7	91	0.2
9	417	281	85	50.2	64	0.2
10	AH	AH	AH	AH	AH	AH
11	AH	AH	AH	AH	AH	AH
12	AH	AH	AH	AH	AH	AH
13	AH	AH	AH	AH	AH	AH
14	AH	AH	AH	AH	AH	AH
15	AH	AH	AH	AH	AH	AH
Mediana	132 U/L	54 U/L	88 U/L	39,55 mg/dL	95 mg/dL	0,2 mg/dL

SA: Sem amostra. AH: Amostra hemolisada

Camundongos 7 d.p.i apresentaram mediana de AST igual a 145 U/L (min: 77 U/L- máx: 535 U/L), ALT igual a 64 U/L (min: 26 U/L- máx: 166 U/L), e fosfatase alcalina igual a 115 U/L (min: 87 U/L- máx: 155 U/L). A dosagem de ureia BUN, colesterol e creatinina apresentou medianas iguais a 39,20 mg/dL (min: 32,9 mg/dL- máx: 49,2 mg/dL), 90 mg/dL (min: 45 mg/dL- máx: 95 mg/dL) e 0,20 mg/dL (min: 0,2 mg/dL- máx: 0,3 mg/dL), respectivamente.

Um animal apresentou valor de AST acima da mediana do controle (535 U/L) e um animal, valor de ALT acima da mediana do controle (166 U/L). Quatro animais (4/5)

apresentaram valores de fosfatase alcalina acima da mediana do controle – 115 U/L, 155 U/L, 120 U/L e 105 U/L. Apenas um animal (animal 10) apresentou dosagem de ureia BUN acima do valor da mediana do controle (49,2 mg/dL). Quatro animais apresentaram dosagem de colesterol acima do valor da mediana do controle (90, 90, 45 e 89mg/dL). Em relação à creatinina, todos os animais apresentaram valores acima da mediana do controle. A tabela 10 apresenta os valores individuais dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 7 d.p.i.

Tabela 10. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 7 d.p.i.

Animal	AST (U/L)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Uréia BUN (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
1	270	166	SA	SA	AS	SA
2	101	64	SA	SA	AS	SA
3	179	61	SA	SA	AS	SA
4	96	93	SA	SA	AS	SA
5	535	125	SA	SA	SA	SA
6	148	68	SA	SA	SA	SA
7	83	33	115	32.9	90	0.2
8	145	42	87	37.6	90	0.2
9	77	26	155	39.2	95	0.3
10	192	66	120	49.2	45	0.2
11	93	32	105	40	89	0.2
12	AH	AH	AH	AH	AH	AH
13	AH	AH	AH	AH	AH	AH
14	AH	AH	AH	AH	AH	AH
15	AH	AH	AH	AH	AH	AH
Mediana	145 U/L	64 U/L	115 U/L	39,2 mg/dL	90 mg/dL	0,2 mg/dL

SA: Sem amostra. AH: Amostra hemolisada

Por fim, camundongos pertencentes ao grupo 14 d.p.i apresentaram mediana de AST igual a 167 U/L (min: 59 U/L- máx: 388 U/L), ALT igual a 50,5 U/L (min: 30 U/L- máx: 268 U/L). As dosagens de fosfatase alcalina, ureia BUN, colesterol e creatinina só puderam ser realizadas a partir de duas amostras de soro, por conta da hemólise do material enviado para análise.

Dois animais (3 e 4) apresentaram tanto valores de AST quanto de ALT acima da mediana do controle. Dois animais (10 e 11) apresentaram valores de fosfatase alcalina acima da mediana do controle (112 U/L e 106 U/L). Apenas um animal apresentou dosagem de ureia BUN acima e de colesterol abaixo do valor da mediana do controle. Em relação à creatinina, somente um animal (11) apresentou valor acima da mediana do controle. A tabela 11 apresenta os valores individuais dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 14 d.p.i.

Tabela 11. Valores individuais dos parâmetros bioquímicos avaliados, obtidos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c 14 d.p.i.

Animal	AST (U/L)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Uréia BUM (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
1	109	54	SA	SA	SA	SA
2	203	39	SA	SA	SA	SA
3	388	268	SA	SA	SA	SA
4	331	168	SA	SA	SA	SA
5	208	51	SA	SA	SA	SA
6	131	30	SA	SA	SA	SA
7	AH	AH	AH	AH	AH	AH
8	AH	AH	AH	AH	AH	AH
9	AH	AH	AH	AH	AH	AH
10	59	50	112	51.7	96	0.1
11	66	47	106	43.1	80	0.2
12	AH	AH	AH	AH	AH	AH
13	AH	AH	AH	AH	AH	AH

14	AH	AH	AH	AH	AH	AH
15	AH	AH	AH	AH	AH	AH
Mediana	167 U/L	50,5 U/L	109 U/L	47,4 mg/dL	88 mg/dL	0,15 mg/dL

SA: Sem amostra / AH: Amostra hemolisada

Os gráficos resultantes das análises bioquímicas para cada parâmetro avaliado, bem como os valores de p resultantes da comparação de medianas entre os grupos experimentais estão dispostos abaixo.

Gráfico 9. Valores da enzima AST dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

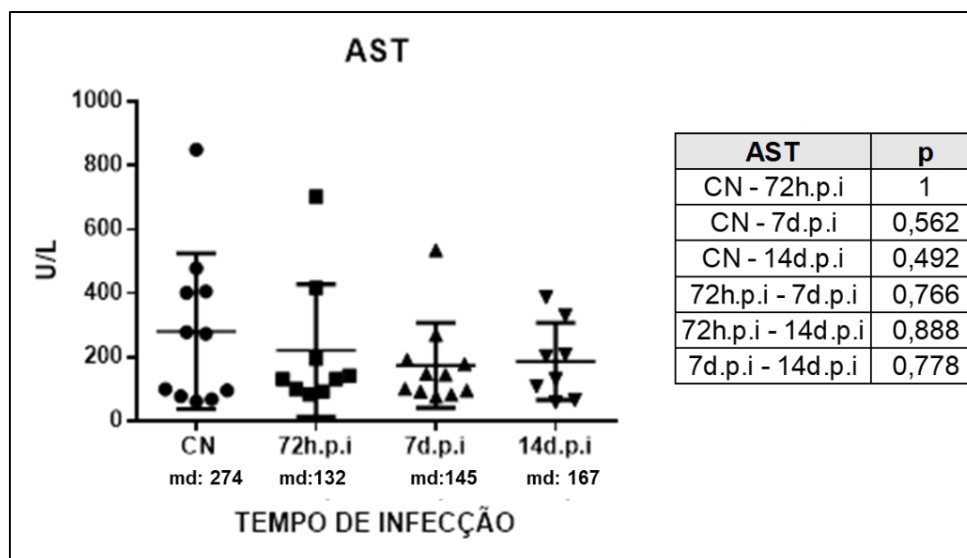
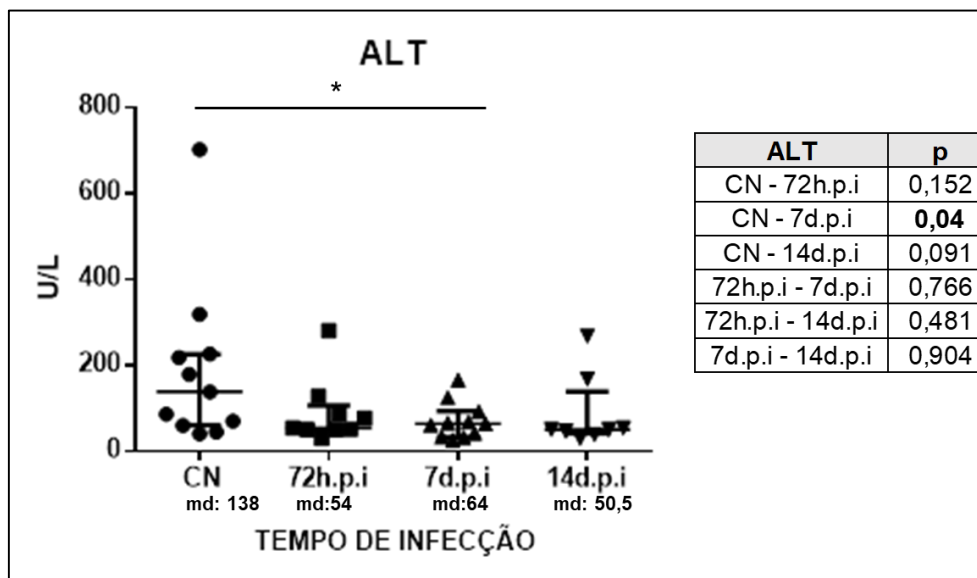


Gráfico 10. Valores da enzima ALT dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.



* $p < 0,05$

Gráfico 11. Valores da enzima fosfatase alcalina dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

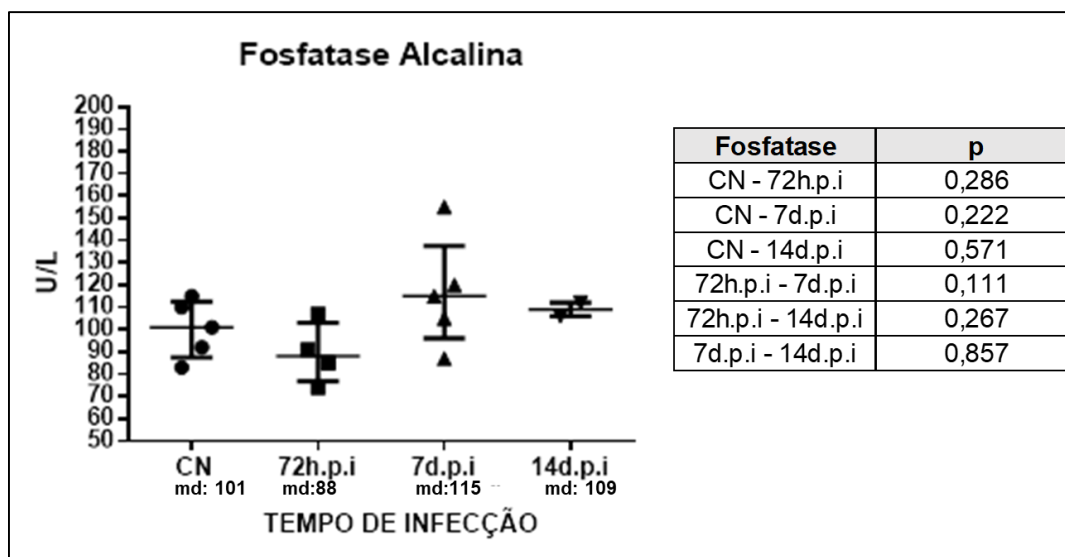


Gráfico 12. Valores de uréia BUN dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

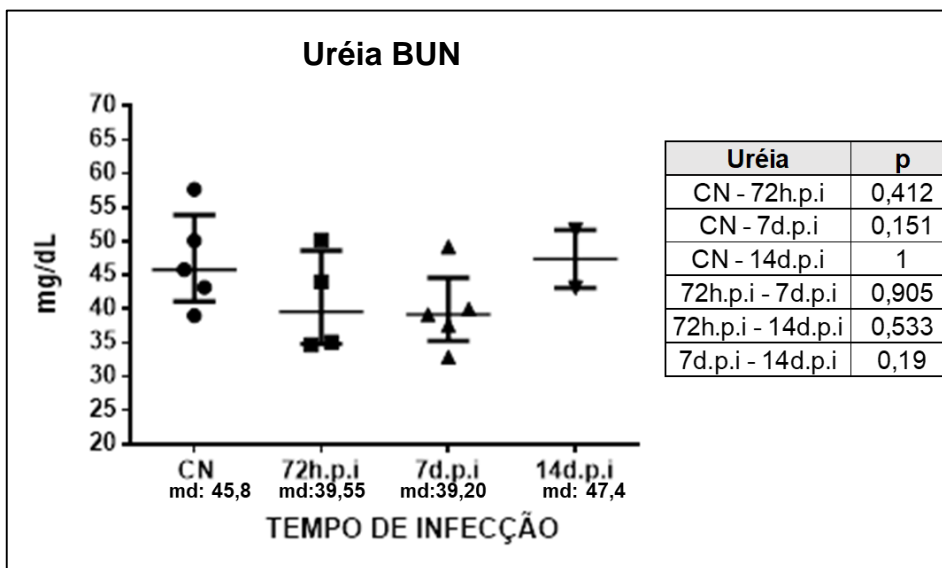


Gráfico 13. Valores de colesterol dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

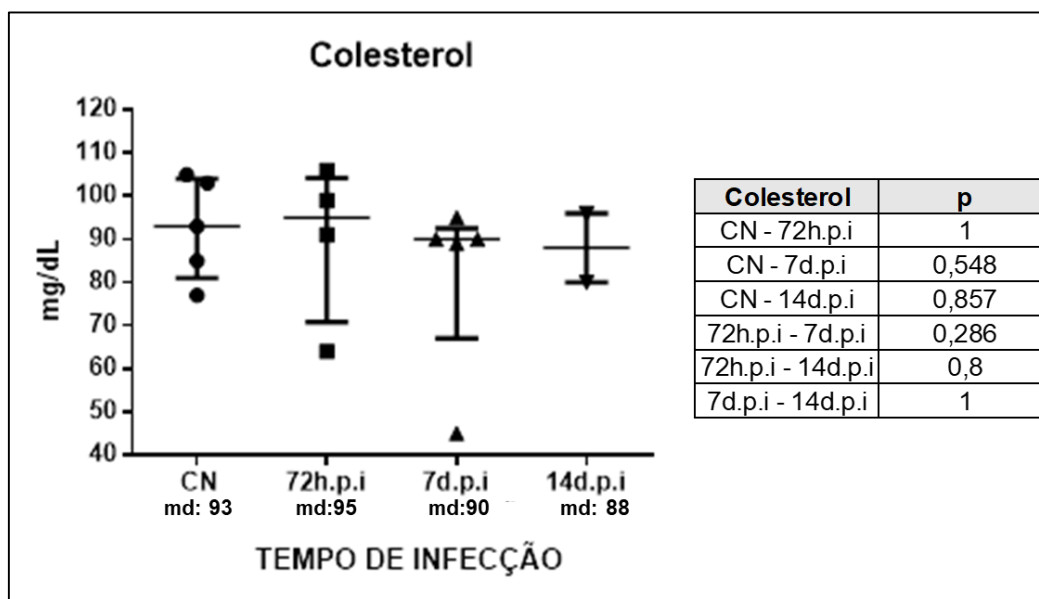
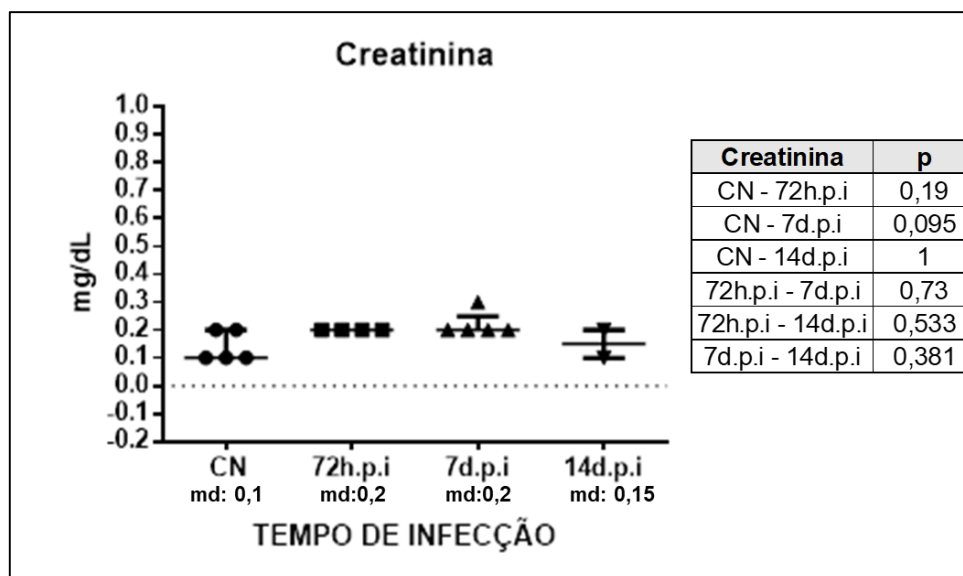


Gráfico 14. Valores de creatinina dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.



5.6. Análises de hemograma

Os resultados referentes às análises de hemograma realizadas a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c controles negativos (não infectados) mostraram mediana do hematócrito igual a 52%, com valores variando de 50,2% a 54,9%. Contagem de hemácias e contagem de leucócitos apresentaram medianas iguais a 10,51 milhões/mm³ (min: 10,15 – máx: 11,03 milhões/mm³) e 3,4 mil/mm³ (min:1,4 mil/mm³ – máx: 6,5 mil/mm³), respectivamente. A contagem de plaquetas apresentou mediana igual a 1268 mil/mm³, com valores desde 1032 a 1880 mil/mm³. A tabela 12 mostra os dados de hemograma individuais de cada camundongo do grupo controle, bem como as medianas referentes a cada parâmetro avaliado.

Camundongos 72 h p.i apresentaram mediana de hematócrito igual a 51,8% (min: 49,7 %- máx: 52,3%). A contagem de hemácias e contagem de leucócitos apresentaram medianas iguais a 10,5 milhões/mm³ (min: 10,33 milhões/mm³ - máx: 10,86 milhões/mm³) e 2,30 mil/mm³ (min: 1,1 mil/mm³ - máx: 5,8 mil/mm³). A contagem de plaquetas apresentou mediana igual a 1364 mil/mm³ (min: 1301 mil/mm³ - máx: 1551 mil/mm³), respectivamente.

Dois camundongos (2/5) apresentaram valor de hematócrito acima da mediana do controle (52,30%, ambos). Esses mesmos animais também apresentaram valores de contagem de hemácias acima da mediana do controle – 10,86 e 10,78 milhões/mm³,

respectivamente. Três animais apresentaram valores de contagem de leucócitos inferiores à mediana do controle – 1,6 mil/mm³, 1,1 mil/mm³ e 2,3 mil/mm³. Em relação à contagem de plaquetas, nenhum animal apresentou valores inferiores à mediana do controle. A tabela 13 apresenta os valores individuais dos parâmetros avaliados para cada camundongo do grupo 72 h.p.i.

Obs: A identificação de cada camundongo (1, 2, 3...) é específica para este grupo experimental e para esta metodologia, não tendo correlação com a identificação usada para os animais do grupo de análises bioquímicas, por exemplo.

Tabela 12. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos).

Animal	Hematócrito (%)	Contagem de hemáceas (milhões/mm ³)	Contagem de leucócitos (mil/mm ³)	Contagem de Plaquetas (mil/mm ³)
1	54,9	11,03	2,2	1161
2	50,2	10,15	2,2	1435
3	50,7	10,25	2,6	1249
4	51,5	10,47	2,4	1330
5	52,1	10,72	1,6	1330
6	54,1	10,85	1,4	1214
7	AH	AH	AH	AH
8	52	10,33	3,4	1032
9	53,3	10,8	6,5	1268
10	50,9	10,3	5,2	1325
11	51,6	10,51	4,7	1880
12	53	10,76	4,5	1300
13	51,6	10,41	3,5	1247
14	AH	AH	AH	AH
15	53,1	10,79	4,6	1187
Mediana	52%	10,51 milhões/mm³	3,4 mil/mm³	1268 mil/mm³

AH: Amostra hemolisada.

Tabela 13. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c 72h.p.i.

Animal	Hematócrito (%)	Contagem de hemáceas (milhões/mm³)	Contagem de leucócitos (mil/mm³)	Contagem de Plaquetas (mil/mm³)
1	51,8	10,5	1,6	1438
2	AH	AH	AH	AH
3	51,5	10,42	1,1	1551
4	52,3	10,86	2,3	1364
5	AH	AH	AH	AH
6	52,3	10,78	4,2	1301
7	AH	AH	AH	AH
8	AH	AH	AH	AH
9	AH	AH	AH	AH
10	AH	AH	AH	AH
11	AH	AH	AH	AH
12	AH	AH	AH	AH
13	AH	AH	AH	AH
14	49,7	10,33	5,8	1332
15	AH	AH	AH	AH
Mediana	51,8%	10,50 milhões/mm³	2,3 mil/mm³	1364 mil/mm³

AH: amostra hemolisada

Camundongos pertencentes ao grupo experimental 7 d.p.i apresentaram mediana de hematócrito igual a 52% (min: 49,9%- máx: 52,7%). A contagem de hemácias e contagem de leucócitos apresentaram medianas iguais a 10,55 milhões/mm³ (min: 10,09 milhões/mm³ - máx: 10,73 milhões/mm³) e 2,10 mil/mm³ (min: 0,6 mil/mm³ - máx: 7,8

mil/mm³). A contagem de plaquetas apresentou mediana igual a 1062 mil/mm³ (min: 34 mil/mm³ - máx: 1255 mil/mm³), respectivamente.

Quatro animais apresentaram valores de hematócrito superiores à mediana do controle. Os mesmos animais também apresentaram valores referentes à contagem de hemácias superiores ao valor de mediana do grupo controle. Cinco animais apresentaram valores referentes à contagem de leucócitos inferiores ao valor da mediana do controle. Em relação à contagem de plaquetas, todos os animais apresentaram valores inferiores à mediana do controle. A tabela 14 apresenta os valores individuais dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c 7 d.p.i.

Tabela 14. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c 7 d.p.i.

Animal	Hematócrito (%)	Contagem de hemáceas (milhões/mm ³)	Contagem de leucócitos (mil/mm ³)	Contagem de Plaquetas (mil/mm ³)
1	AH	AH	AH	AH
2	52,2	10,62	3,6	1104
3	AH	AH	AH	AH
4	50,4	10,09	2,5	1069
5	AH	AH	AH	AH
6	AH	AH	AH	AH
7	49,9	10,12	1,9	34
8	52,3	10,66	0,6	959
9	AH	AH	AH	AH
10	AH	AH	AH	AH
11	52,2	10,55	2,1	950
12	51,8	10,41	1,2	1062
13	52,7	10,73	7,8	1255
14	AH	AH	AH	AH

15	AH	AH	AH	AH
Mediana	52%	10,55 milhões/mm³	2,1 mil/mm³	1062 mil/mm³

AH: Amostra hemolisada

As análises referentes aos camundongos pertencentes ao grupo 14 d.p.i apresentaram mediana de hematócrito igual a 54% (min: 52%- máx: 57,30%). A contagem de hemácias e contagem de leucócitos apresentaram medianas iguais a 11,02 milhões/mm³ (min: 10,36 milhões/mm³ - máx: 16,40 milhões/mm³) e 2,2 mil/mm³ (min: 1,5 mil/mm³ - máx: 9,40 mil/mm³). A contagem de plaquetas apresentou mediana igual a 1048 mil/mm³ (min: 24 mil/mm³ – máx: 1382 mil/mm³), respectivamente.

Sete camundongos apresentaram tanto valores individuais de hematócrito quanto de contagem de hemácias superiores à mediana do grupo controle. Seis animais apresentaram valores de contagem de leucócitos inferiores ao valor referente à mediana do grupo controle. Em relação à contagem de plaquetas, quatro animais apresentaram valores individuais inferiores à mediana do grupo dos animais controle. A tabela 15 apresenta os valores individuais dos parâmetros analisados para cada camundongo do grupo 14 d.p.i.

Tabela 15. Valores individuais dos parâmetros de hemograma avaliados, obtidos a partir de amostras de sangue total de camundongos BALB/c 14 d.p.i.

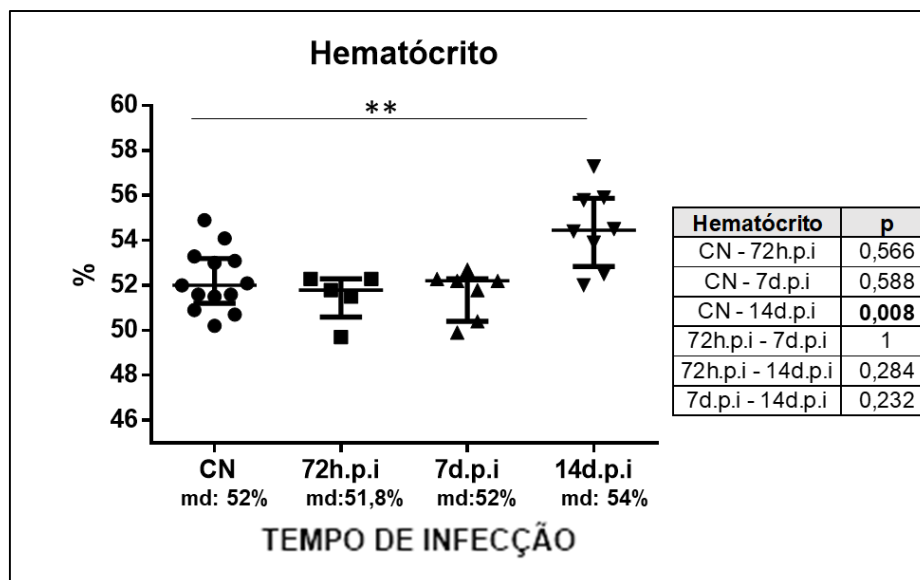
Animal	Hematócrito (%)	Contagem de hemáceas (milhões/mm³)	Contagem de leucócitos (mil/mm³)	Contagem de Plaquetas (mil/mm³)
1	AH	AH	AH	AH
2	55,9	11,27	1,9	27
3	52	10,36	2,7	24
4	AH	AH	AH	AH
5	AH	AH	AH	AH
6	57,3	16,4	2	814
7	AH	AH	AH	AH
8	AH	AH	AH	AH
9	54,4	10,91	1,9	63

10	52,5	10,79	1,5	1337
11	AH	AH	AH	AH
12	AH	AH	AH	AH
13	55,8	11,31	2,4	1282
14	53,9	10,88	9,4	1382
15	54,5	11,14	4,8	1308
Mediana	54%	11,02 milhões/mm³	2,2 mil/mm³	1048 mil/mm³

AH: Amostra hemolisada

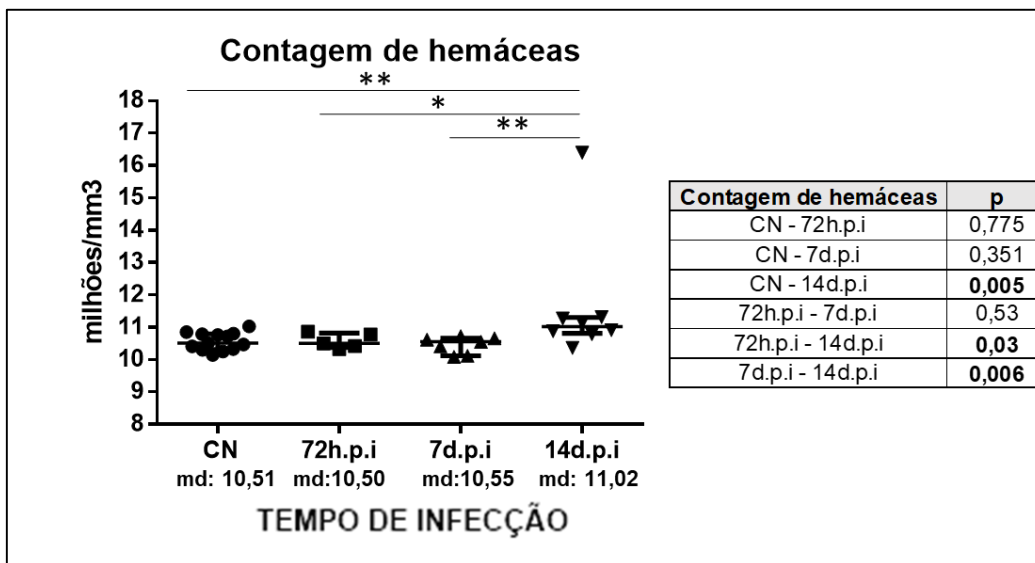
Os gráficos resultantes das análises do hemograma de cada grupo, bem como os valores de p resultantes da comparação de medianas entre os grupos experimentais estão dispostos abaixo.

Gráfico 15. Valores de hematócrito dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.



** $p < 0,01$

Gráfico 16. Valores de contagem de hemácias dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.



* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Gráfico 17. Valores de contagem de leucócitos dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de p resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.

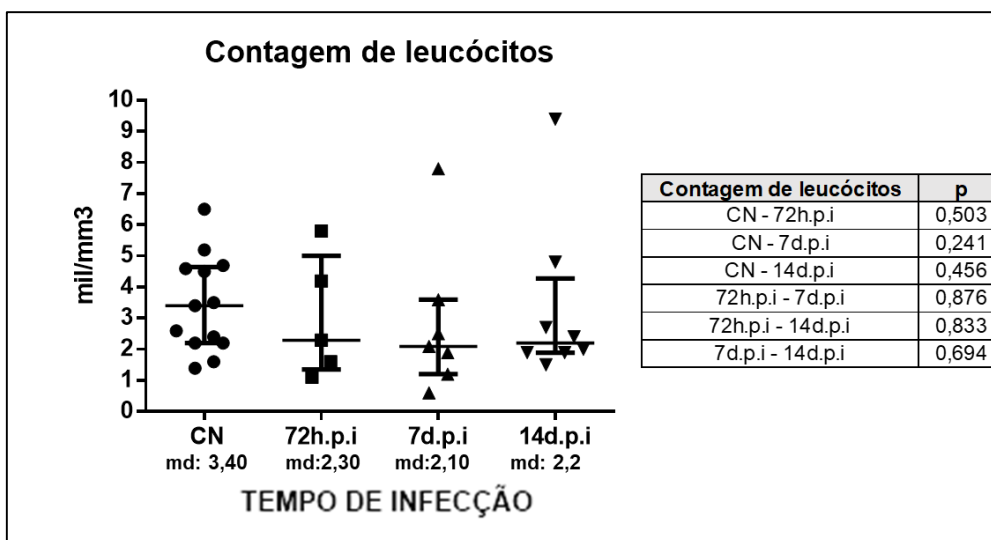
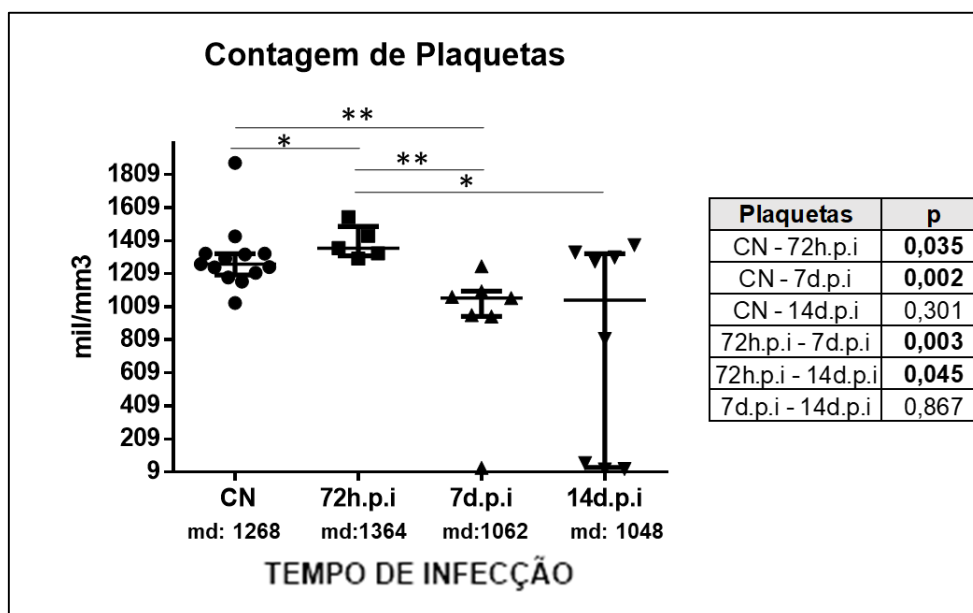


Gráfico 18. Valores de contagem de plaquetas dos camundongos pertencentes ao grupo controle (não infectados), 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i, com as respectivas medianas (md) e valores de *p* resultantes da comparação das medianas entre os grupos experimentais.



* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

5.7. Análises morfológicas – histopatologia, ultraestrutura e histomorfometria

5.7.1. Análises histopatológicas, ultraestruturais e histomorfométricas de pulmões de camundongos BALB/c

5.7.1.1. Análises histopatológicas

Análises histopatológicas de fragmentos pulmonares de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) demonstraram bronquíolos respiratórios, bronquíolos terminais, sacos alveolares, alvéolos e septos interalveolares sem qualquer sinal de espessamento, rompimento, edema, hemorragia ou outra alteração morfológica (Figura 8). A imagem apresentada abaixo representa todo o grupo controle negativo.

Estudos histopatológicos de fragmentos pulmonares de camundongos BALB/c infectados com DENV-3 e corados com hematoxilina e eosina revelaram espessamento de septo interalveolar com presença de infiltrado inflamatório majoritariamente mononuclear, focos de atelectasia alveolar e hiperventilação, focos de hemorragia no

septo interalveolar e em bronquíolos, acúmulo de líquido no capilar sanguíneo e focos de congestão capilar periférica (Figuras 9a-9e). Em análises posteriores, com coloração por resorcina fucsina, foi evidenciado o rompimento focal de fibras elásticas dos septos interalveolares (Figura 10). As imagens mostradas abaixo são representativas de todo o grupo experimental (n=5).

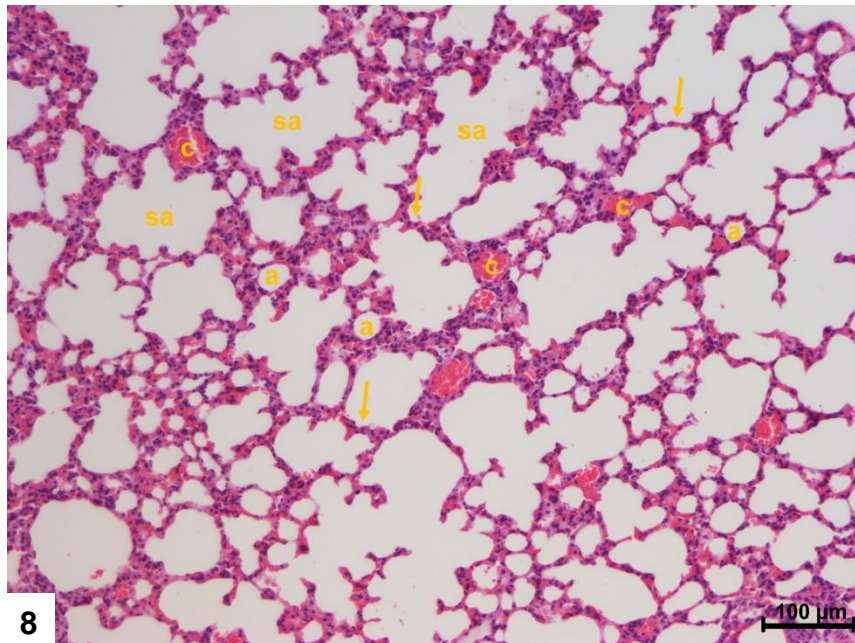
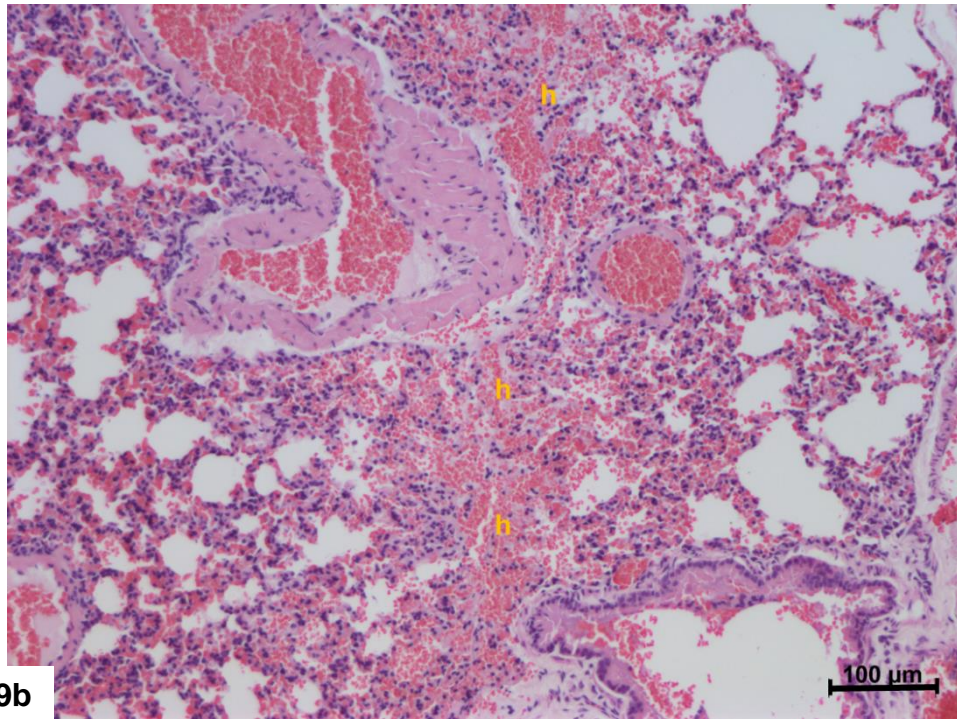
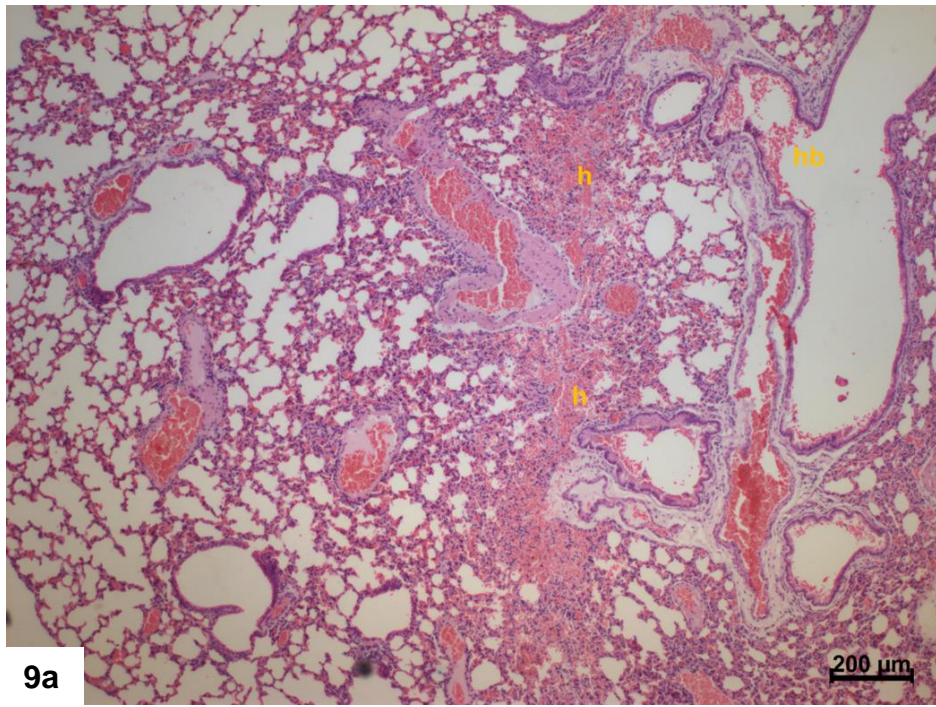
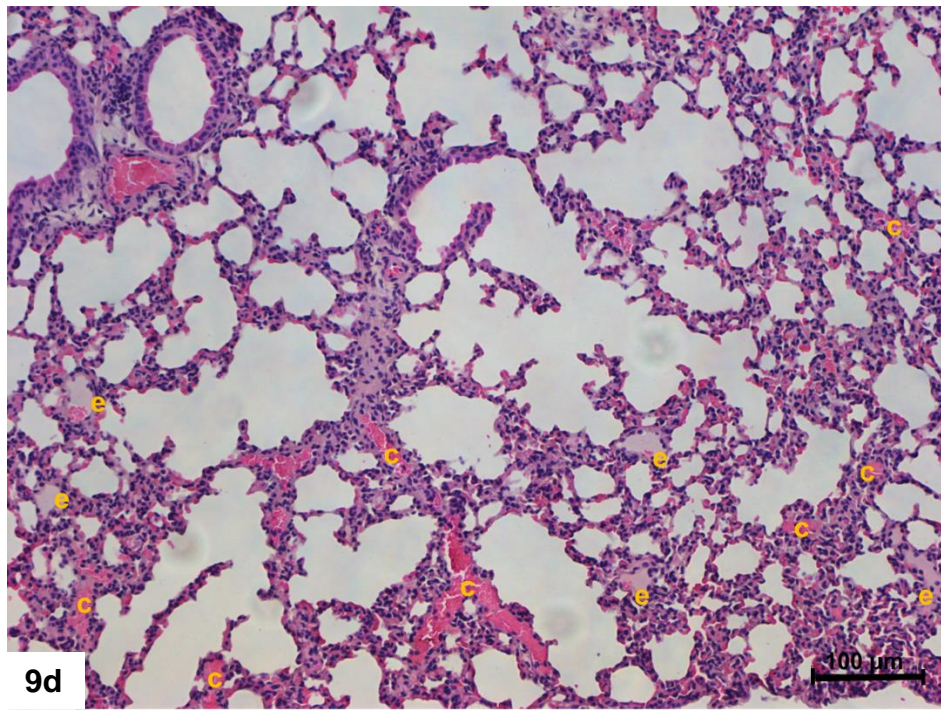
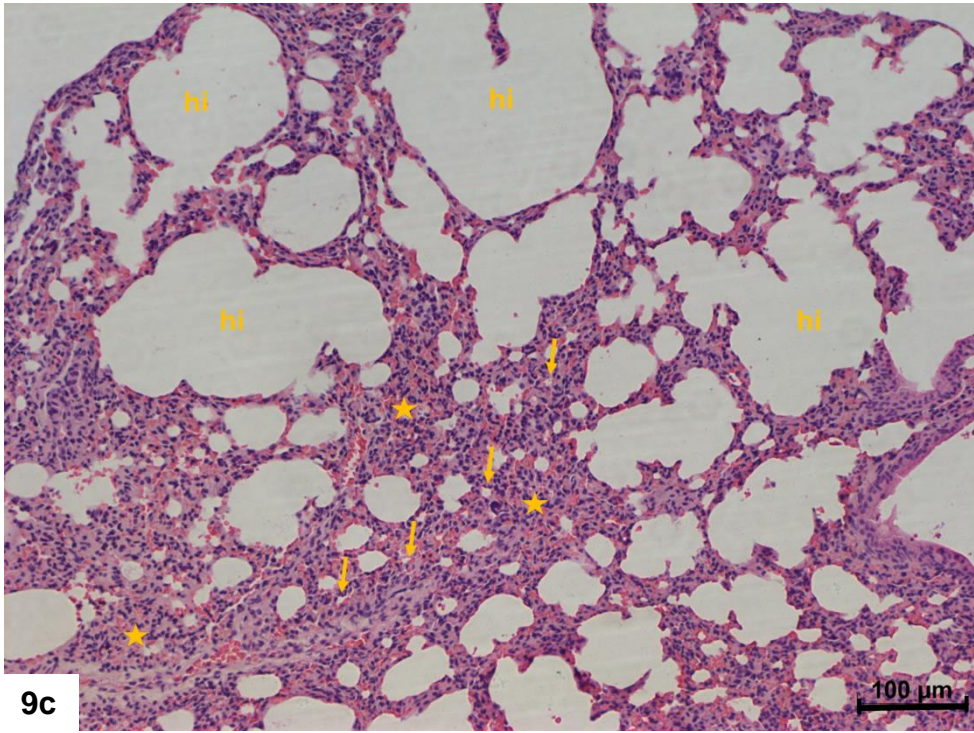
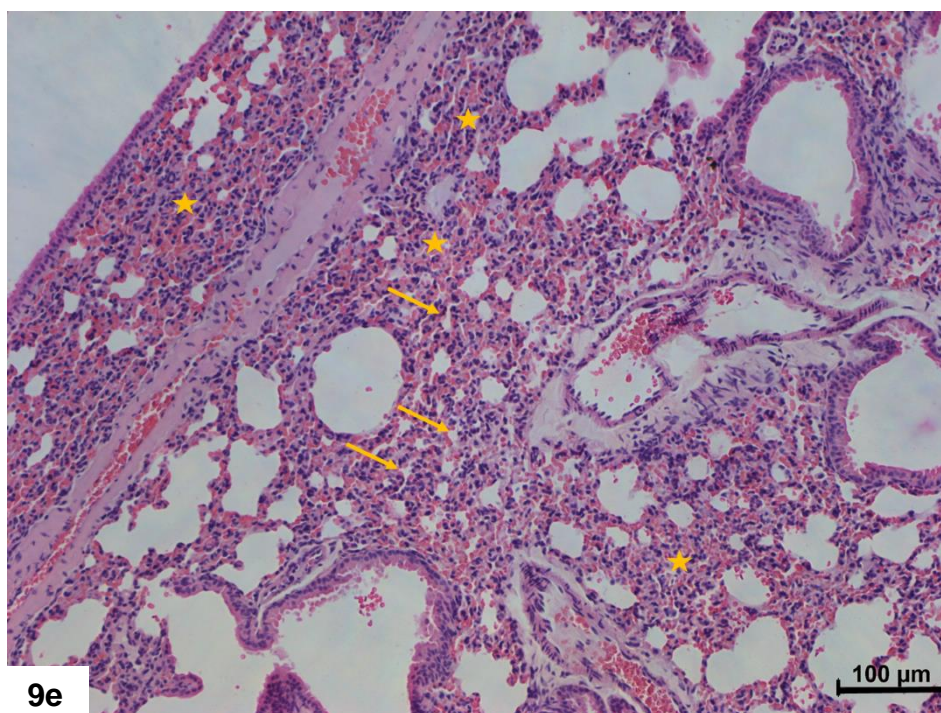


Figura 8. Secção histológica de pulmão de camundongo BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina. Alvéolos (a) e saco alveolares (sa) com ausência de eritócitos em seu lúmen, septos intralveolares (setas) delgados e sem sinais de hemorragia e presença de eritrócitos contidos nos capilares sanguíneos (c). Barra= 100μm.







Figuras 9a-9e. Secções histológicas de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i por DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. **[a]** Extensa área de hemorragia no parênquima pulmonar (h) e hemorragia no bronquíolo (hb). **[b]** Extensa área de hemorragia no parênquima pulmonar (h). **[c]** Espessamento do septo interalveolar devido à presença de infiltrados celulares (★) culminando no colapso alveolar (setas). Áreas de hiperinsuflação alveolar (hi), mecanismo compensatório do espessamento de septo interalveolar e diminuição da área útil respiratória. **[d]** Sinais de acúmulo de líquido (e) em capilares e congestão capilar periférica (c). **[e]** Espessamento de septo interalveolar devido à presença de infiltrados celulares (★) acarretando a colapso alveolar (setas). Barra (a) = 200μm. Barras (b,c,d,e) = 100 μm.

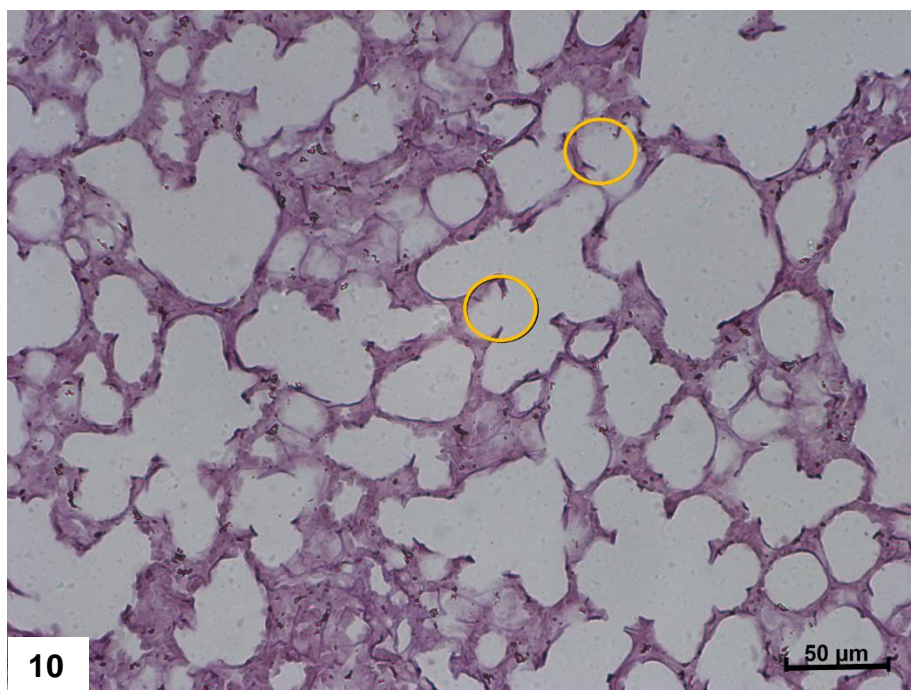


Figura 10. Secção histológica de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i por DENV-3 corada com resorcina – fucsina de Weigert. Os círculos indicam áreas de rompimento das fibras elásticas dos septos interalveolares. Barra = 50 μ m.

5.7.1.2. Análises ultraestruturais

Análises ultraestruturais de fragmentos pulmonares de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram parênquima pulmonar preservado. Não foram observados sinais de espessamento, presença de células do sistema imune ou hemorragia nos septos interalveolares. Foi possível observar a presença dos dois tipos celulares do epitélio pulmonar– o pneumócito do tipo I e tipo II – sem qualquer alteração ultraestrutural. Eritrócitos encontravam-se contidos nos capilares alveolares, sem sinais de congestão capilar ou edema (Figura 11). A imagem apresentada é representativa de todo o grupo controle negativo (n=5)

Já em camundongos infectados experimentalmente com o DENV-3, as análises ultraestruturais de fragmentos pulmonares evidenciaram presença de células mononucleares e polimorfonucleares no interstício, resultando no espessamento de septo interalveolar, acúmulo de líquido no capilar alveolar, focos de congestão capilar periférica, sinais de degeneração de células intersticiais, presença de células mononucleares e plaquetas circulando nos capilares e interação de plaquetas e células endoteliais evidenciada pela produção de vesículas de transporte. Além disso, foi observada a ativação de células endoteliais, plaquetas e de célula mononucleada,

evidenciada pela emissão de prolongamento da membrana citoplasmática (Figuras 12a – 12i). As imagens mostradas abaixo são representativas de todo o grupo experimental (n=5).

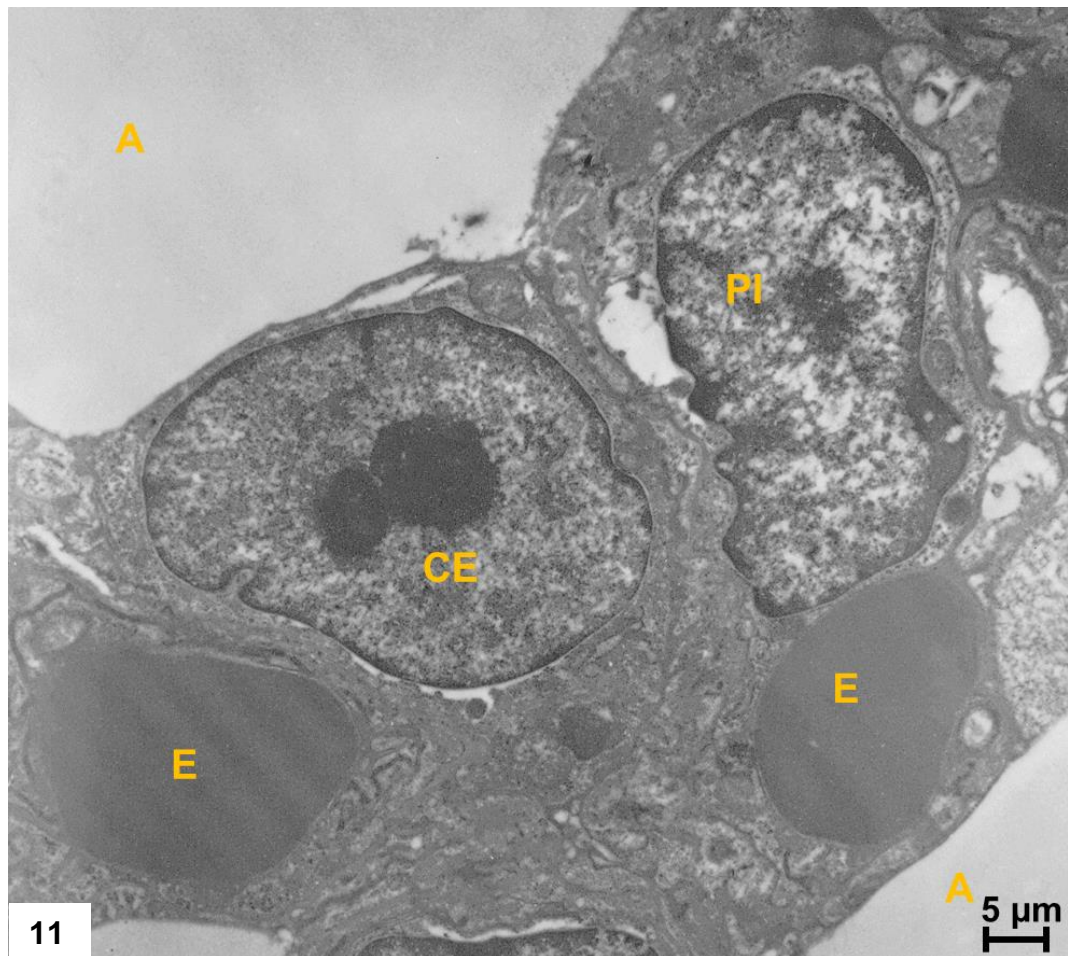
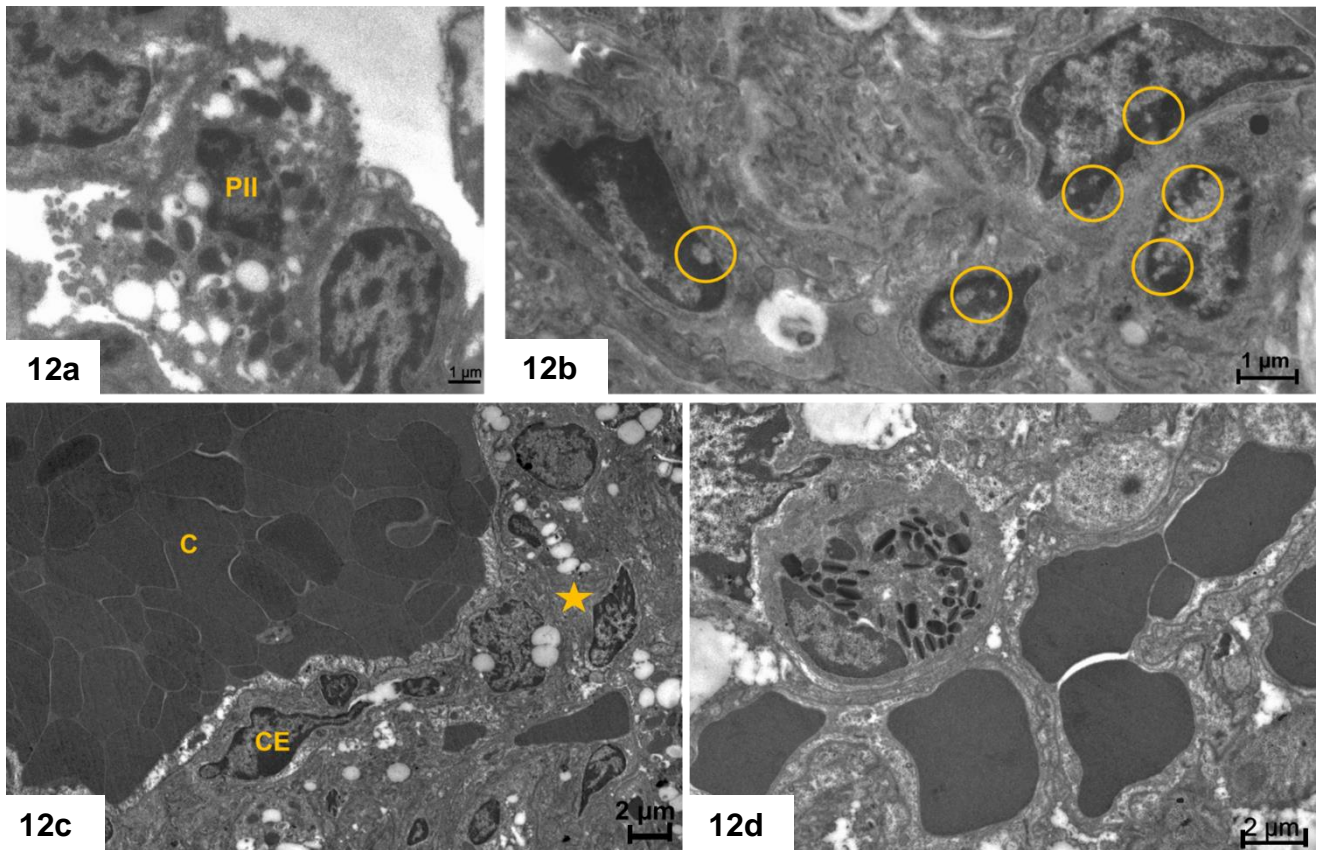
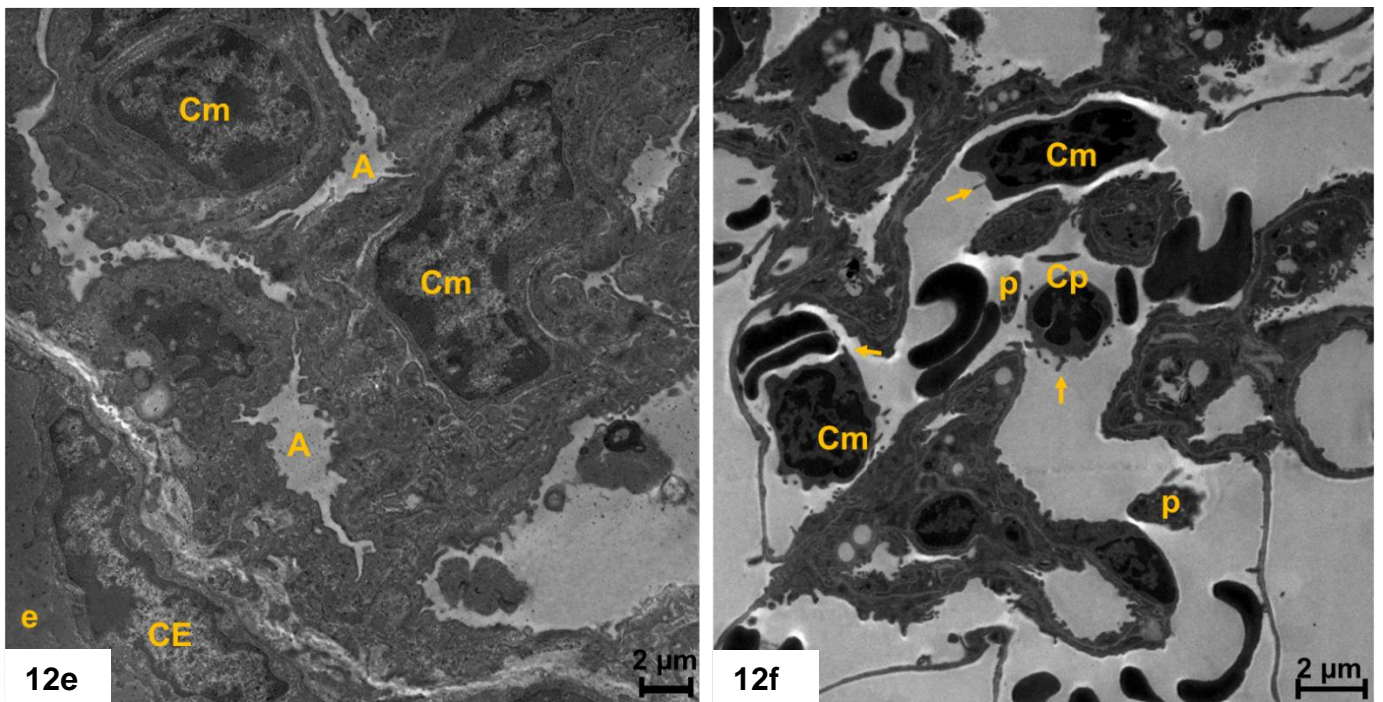
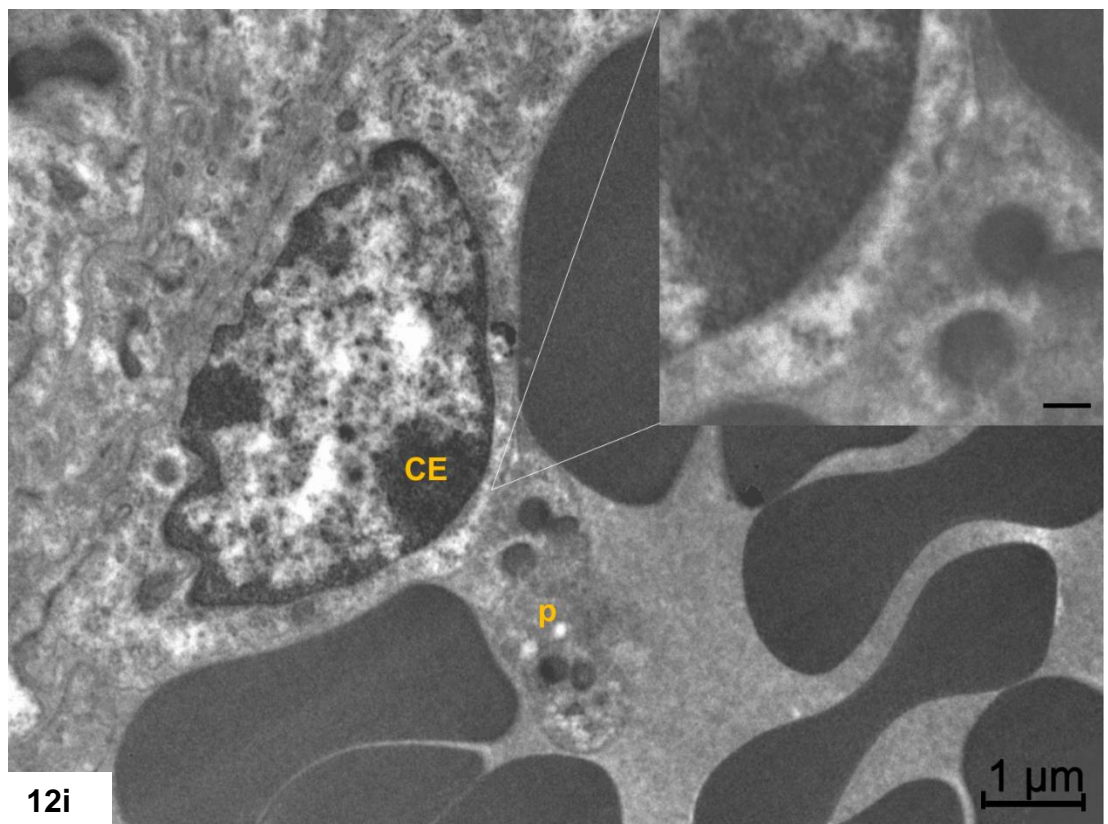
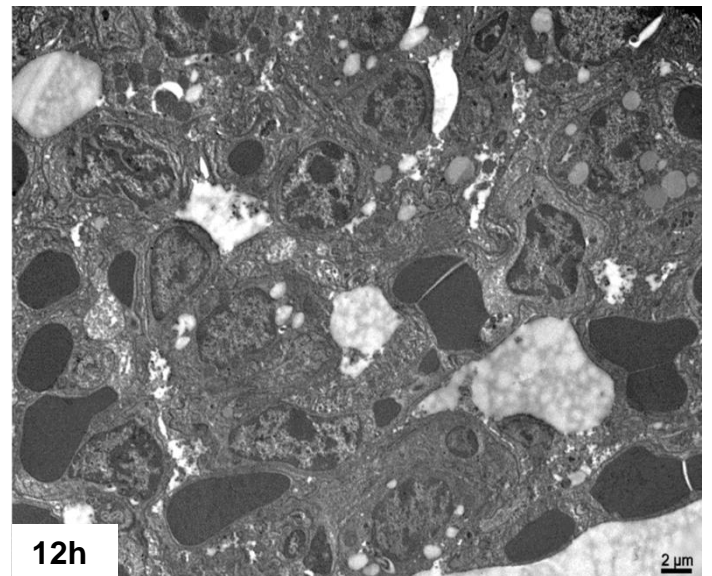
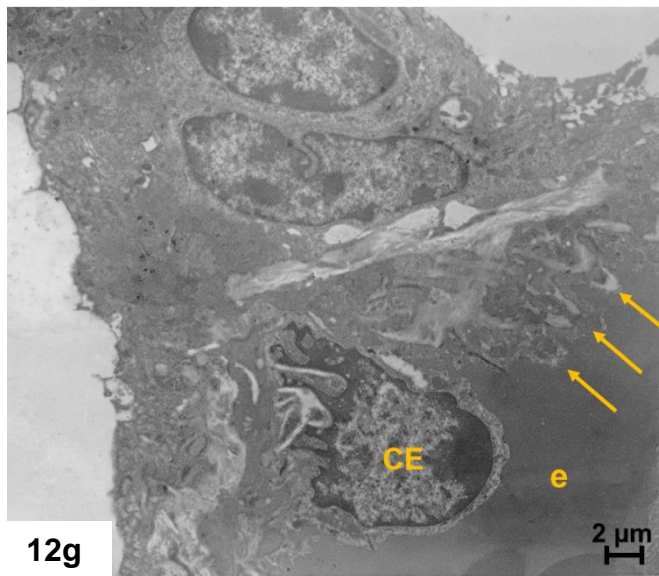


Figura 11. Secção ultrafina de pulmão de camundongo BALB/c não infectado contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Alvéolos (A), septo intralveolar, pneumócito do tipo I (PI). Célula endotelial (CE) e eritrócitos (E) contidos no capilar. Barra= 5µm.



Figuras 12a-12d. Secções ultrafinas de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. **[a]** Sinais de degeneração de pneumócito do tipo II (PII). **[b]** Sinais de degeneração nuclear de células intersticiais (círculo). **[c]** Congestão capilar periférica (C). Célula endotelial (CE). Espessamento de septo interalveolar (★). **[d]** Presença de célula polimorfonuclear (Cp) do tipo eosinófilo no interstício. Barra (a, b) = 1 μ m. (c,d)= 2 μ m.





Figuras 12e-12i. Secções ultrafinas de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. **[e]** Compressão alveolar (A) devido ao espessamento dos septos interalveolares pela presença de células mononucleares (Cm); Acúmulo de líquido (e) no capilar. **[f]** Presença de células mononucleares (Cm), polimorfonucleares (Cp) e plaquetas (p) no capilar sanguíneo. Ativação de células mononucleares evidenciada pela emissão de prolongamentos de membrana citoplasmática (setas). **[g]** Ativação de célula endotelial (CE) evidenciada pela emissão de prolongamentos de membrana citoplasmática (setas). Acúmulo de líquido no capilar (e). **[h]** Espessamento do septo interalveolar devido à presença de inúmeras células mononucleadas (Cm). **[i]** Interação de plaqueta (p) com célula endotelial (CE)

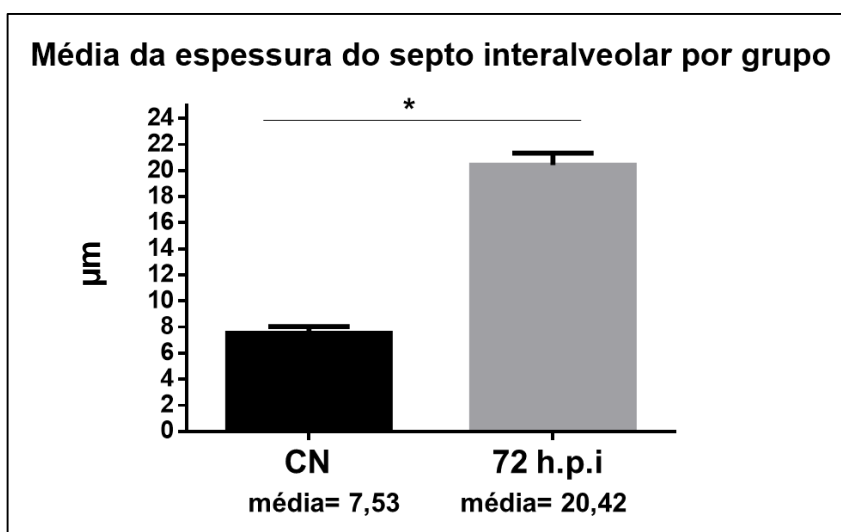
evidenciada pela emissão de vesículas citoplasmáticas (inset). Barra (e, f, g) = = 2 μm . (h)= 5 μm . (i) =1 μm .

5.7.1.3. Análises histomorfométricas

Ao final das análises histomorfométricas de secções histológicas de pulmão de camundongos BALB/c pertencentes ao grupo controle e ao grupo 72h.p.i, foram analisados 300 campos distintos (150/grupo), referentes às 10 lâminas (5/grupo) estudadas.

Tanto no grupo controle quanto no grupo 72 h.p.i, foram medidos 3.000 septos interalveolares. A média da largura dos septos do grupo controle foi de 7,53 μm ($\pm 0,52$ μm), enquanto a média da largura dos septos do grupo 72 h.p.i foi de 20,42 μm ($\pm 0,91$ μm) (Gráfico 19), indicando um aumento de 2,71 vezes na espessura do septo interalveolar. A comparação das médias entre os dois grupos apresentou diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0,02 ($\alpha < 0,05$).

Gráfico 19. Média da espessura do septo interalveolar por grupo experimental analisado.



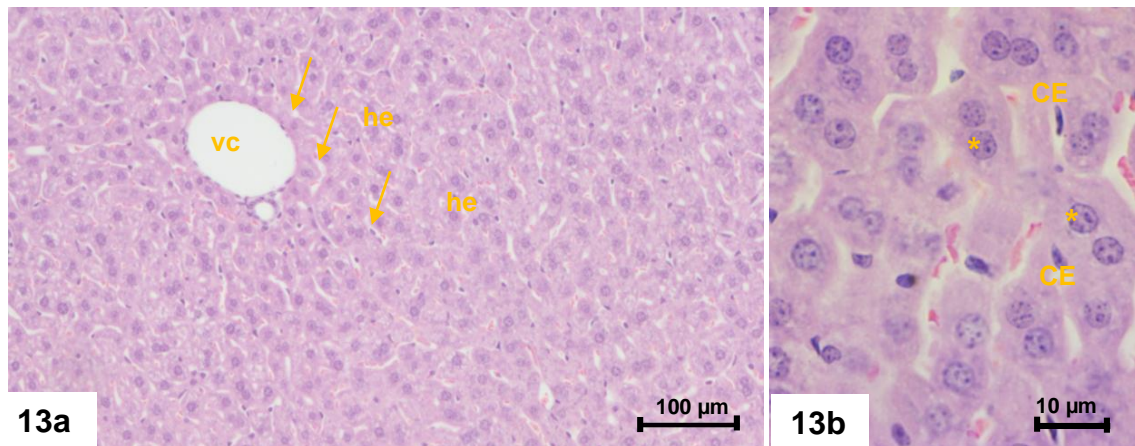
* $p < 0,05$

5.7.2. Análises histopatológicas, ultraestruturais e histomorfométricas de fígado de camundongos BALB/c

5.7.2.1. Análises histopatológicas

Análises histopatológicas de fragmentos de fígado de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) demonstraram parênquima hepático sem sinais de edema, congestão, esteatose e hemorragia (Figura 13a). As análises demonstraram hepatócitos sem alteração nuclear ou citoplasmática e capilares sinusóides com ausência de sinais de dilatação, infiltrado celular ou hemorragia (Figura 13b). A camada descontínua de células endoteliais fenestradas, assim como células de Kupffer também não apresentavam alterações histopatológicas. As imagens apresentadas abaixo representam 80% do grupo controle negativo (n=4).

Análises histopatológicas de fragmentos hepáticos de camundongos BALB/c 72 h.p.i com DENV-3 demonstraram alterações focais no parênquima, como dilatação dos capilares sinusóides (Figura 14), sinais de congestão vascular (Figuras 15a-15b) e discretos infiltrados celulares (Figuras 16a-16c). Em relação aos hepatócitos, foi observada a presença de inclusões semelhantes a lipídeos, por vezes únicas, no citoplasma dessas células (esteatose macro e microgoticular). Na maioria dos casos, a inclusão não provocou o deslocamento do núcleo (Figuras 17a - 17f). Porém, em casos focais, observou-se um estágio avançado de vacuolização, levando à balonização hepatocitária e compressão e/ou deslocamento do núcleo para a periferia celular (Figuras 18a-18c). Além da esteatose macrogoticular, pode-se observar uma extensa área de esteatose microgoticular, na qual o cordão hepatocitário apresentou inúmeras inclusões semelhantes a lipídeos citoplasmáticas (Figura 19). Por fim, foram observados sinais de atipia nuclear, caracterizados por megacariose com alteração no padrão da distribuição de cromatina e presença de inclusões nucleares atípicas (Figuras 20a-20d). As imagens mostradas abaixo são representativas de 60% do grupo experimental (n=3).



Figuras 13a-13b. Secções histológicas de fígado de camundongo BALB/c não infectado coradas com hematoxilina e eosina. **[a]** Região central de um lóbulo hepático, composto principalmente por uma veia centrolobular (vc) e por cordões de hepatócitos (he) que se distribuem radialmente ao redor da veia. Inúmeros vasos de pequeno calibre (setas), principalmente capilares do tipo sinusóide, compõem o estroma hepático. **[b]** Hepatócitos com citoplasma bem distribuído e citoplasma finamente granuloso [b]. Núcleo (*), Célula endotelial (CE). Barra (a) = 100μm. (b)= 10μm.

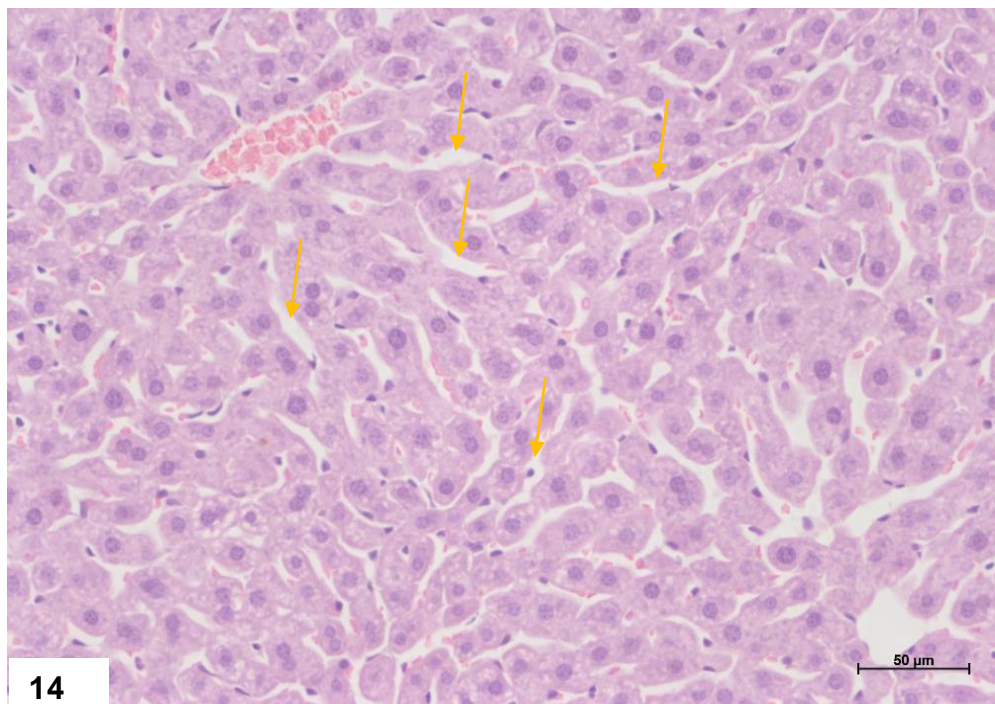
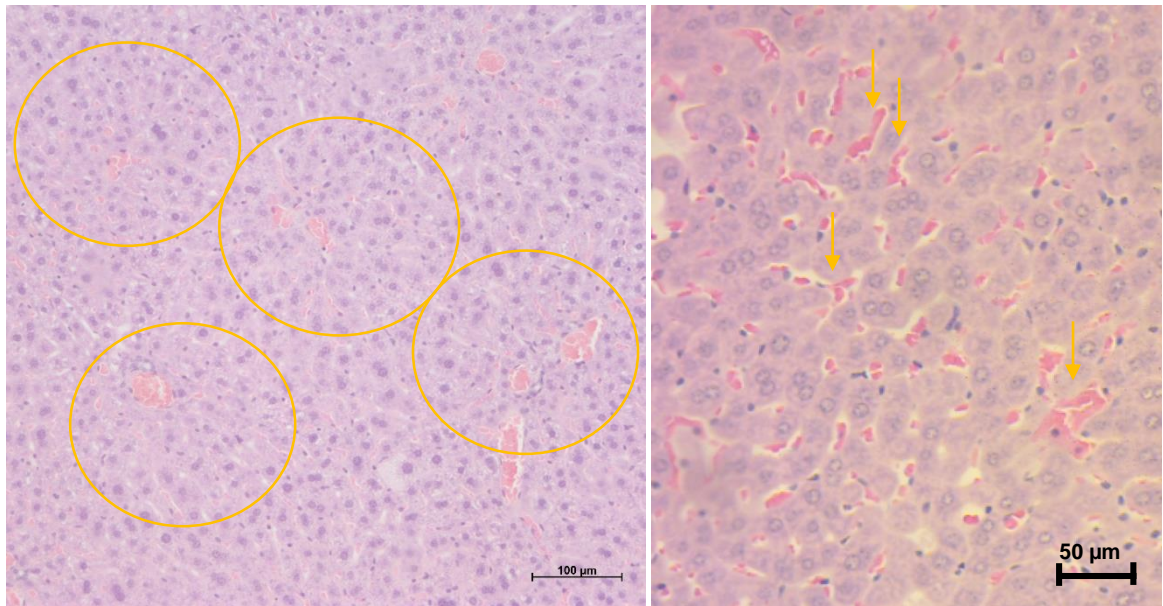
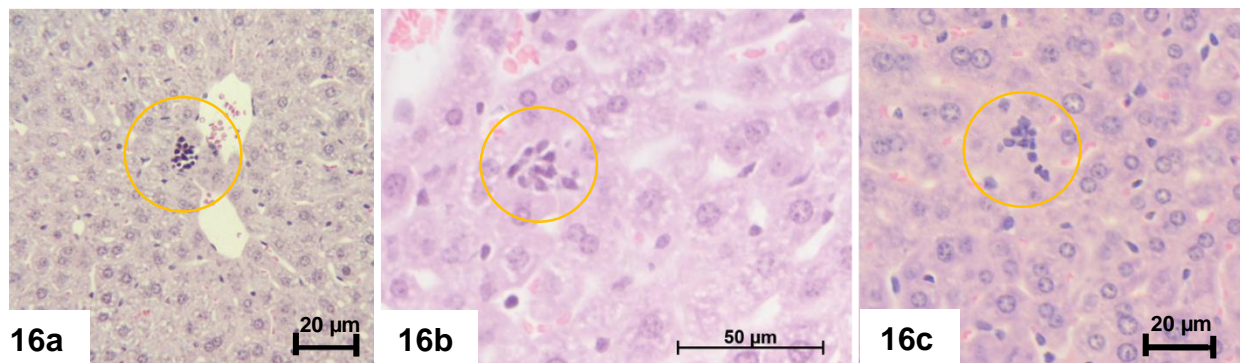


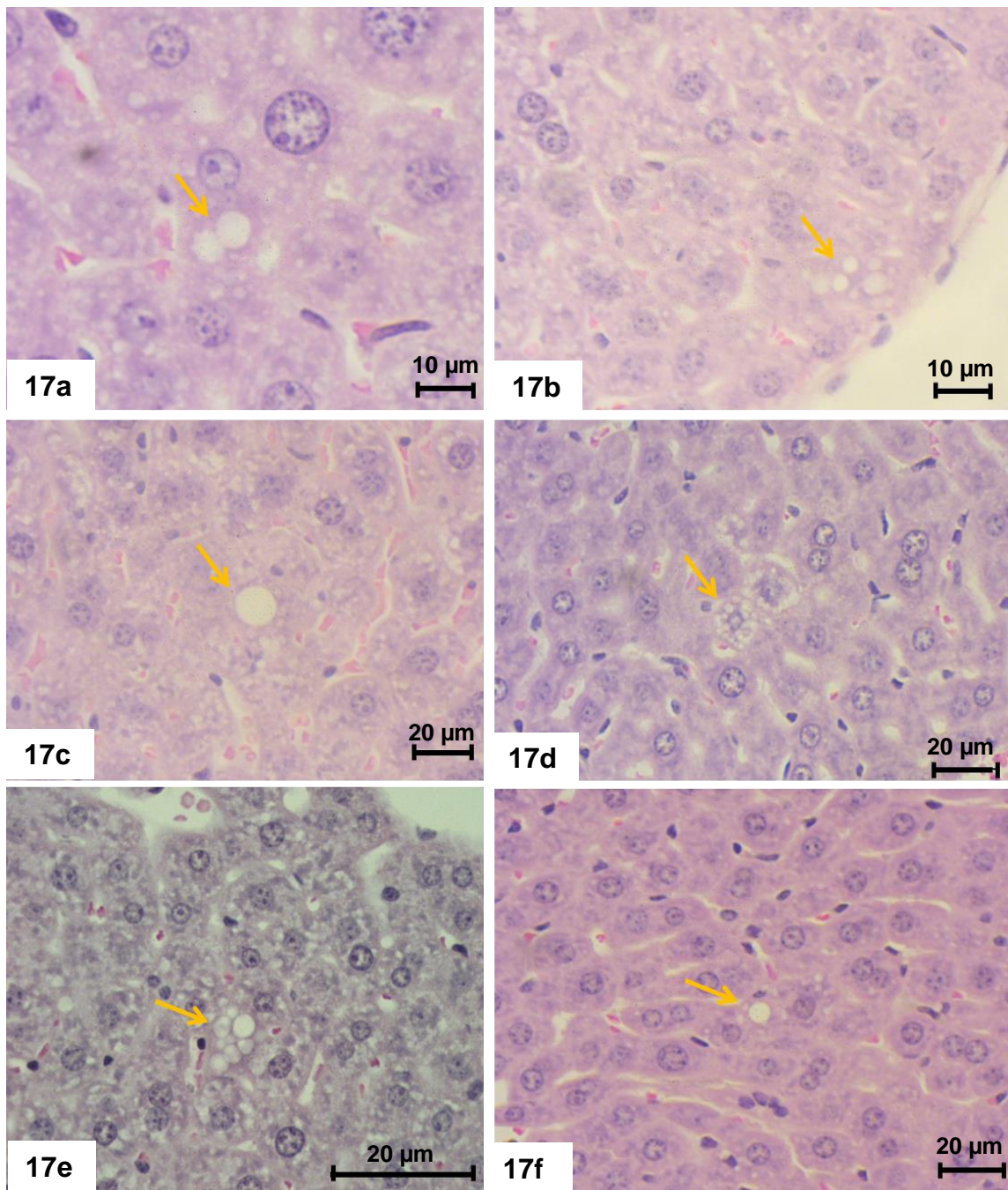
Figura 14. Secção histológica de fígado de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Dilatação de capilares sinusóides (setas). Barra= 50μm.



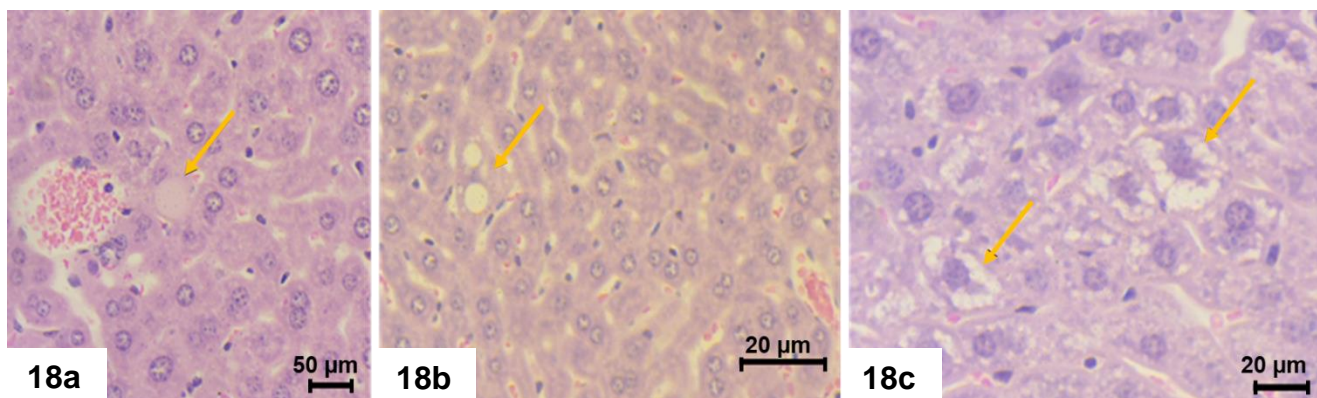
Figuras 15a-15b. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Sinais de congestão de capilares sinusóides (círculos [a] e setas [b]). Barra (a)= 100μm. (b) =50 μm



Figuras 16a-16c. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Discretos infiltrados celulares no interstício (círculos). Barra (a,c)= 20μm. (b)= 50μm.



Figuras 17a – 17f. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Presença de inclusões semelhantes a lipídeos (sugestão de esteatose macrogoticular) (setas) no interior do citoplasma de hepatócitos. Barra (a) = 10 µm. (b, c, d, e, f) = 20 µm.



Figuras 18a-18c. Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. **[a]** Presença de inclusões (setas) no citoplasma do hepatócito, deslocando o núcleo celular para a periferia e **[b]** comprimindo-o. **[c]** Estágio avançado de vacuolização, levando à balonização hepatocitária [c]. Barra (a) = 50 μm . (b,c) = 20 μm .

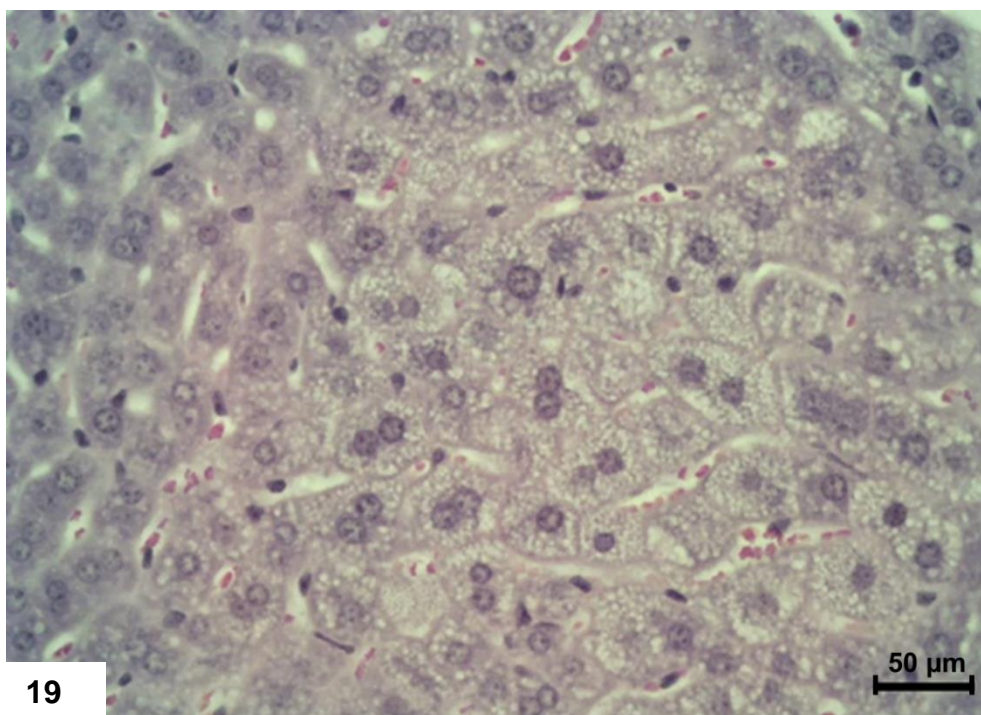
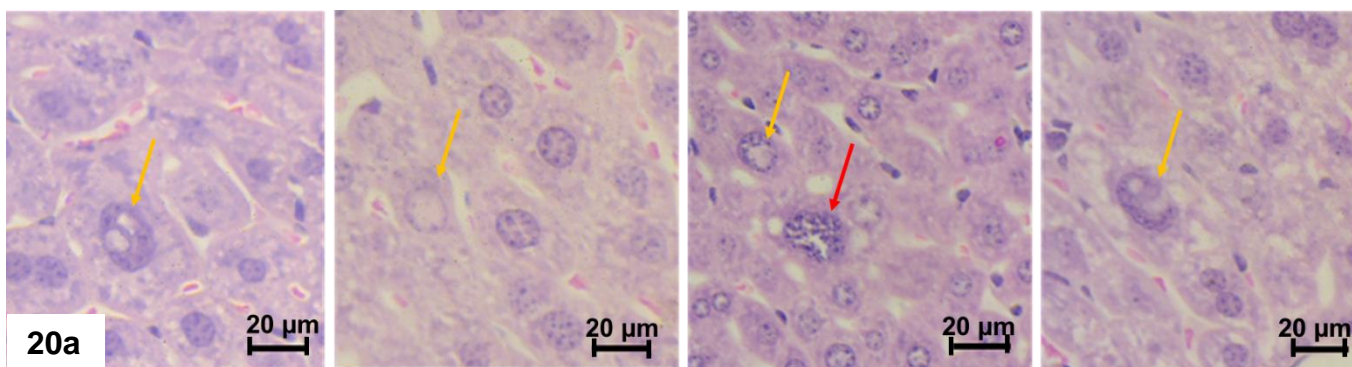


Figura 19. Secção histológica de fígado de camundongo BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Presença de múltiplas inclusões semelhantes a lipídeos no citoplasma de hepatócitos, sugerindo esteatose microgoticular, em uma extensa área do parênquima hepático. Barra= 50 μm .



Figuras 20a – 20d. Secções histológicas de fígados de camundongo BALB/c 7 2h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Degeneração de hepatócitos, com presença de inclusões nucleares atípicas (setas amarelas) e sinais de megacariose. [c] A seta vermelha aponta para um núcleo de hepatócito com alteração no padrão de distribuição da cromatina. Barras = 20 µm.

5.7.2.2. Análises ultraestruturais

Para a viabilização das análises ultraestruturais a partir de fragmentos hepáticos, camundongos BALB/c foram submetidos à fixação por perfusão com paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,2. Após 30 min, os órgãos foram coletados e submetidos à fixação por imersão em glutaraldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,2 M, pH 7,2. Apesar deste protocolo ser padrão para este tipo de análise, a fixação mostrou-se insatisfatória para a obtenção de secções bem preservadas para análise por MET.

Em uma segunda tentativa, camundongos BALB/c foram submetidos à eutanásia, o fígado imediatamente coletado, clivado e fixado por imersão em glutaraldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,2 M, pH 7,2. Infelizmente, novamente a fixação mostrou-se insatisfatória para a obtenção de secções bem preservadas para análises ultraestruturais e, por essa razão, os resultados não serão mostrados.

5.7.2.3. Análises histomorfométricas

Ao final das análises histomorfométricas de secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c pertencentes ao grupo controle e ao grupo 72 h.p.i, foram contabilizados 300 campos distintos (150/grupo), referentes às 10 lâminas (5/grupo) estudadas.

No grupo controle, foram contabilizados 20.065 hepatócitos (média de 4.013/animal ± 166), das quais 17.187 eram mononucleados (média de 3.437/lâmina ± 175) e 2.906 eram binucleados (média de 581/lâmina ± 57). No grupo 72 h.p.i foram contabilizados 19.394 hepatócitos (média de 3878/lâmina ± 442), dos quais 16.506 eram mononucleados (média de 3.300/lâmina ± 338) e 2.809 eram binucleados (média de 561/lâmina ± 131). O gráfico 20 indica a relação entre hepatócitos binucleados, mononucleados e a contagem total por grupo experimental. Não foram encontrados hepatócitos com mais de dois núcleos nos campos analisados. Comparando a contagem de hepatócitos mononucleados e binucleados entre os grupos experimentais, os valores de p encontrados foram de 0,45 e 0,7, respectivamente.

Em relação à contagem de células sinusoidais, o resultado foi de 10.420 células do grupo controle, sendo a média de 2.092 células/lâmina (± 105). Já no grupo 72 h.p.i, o resultado da contagem foi de 11.098 células, sendo a média de 2.219 células/lâmina (± 310). O gráfico 21 mostra a média de células sinusoidais por lâmina analisada. Comparando a contagem de células sinusoidais entre os grupos experimentais, o valor de p encontrado foi de 0,4. Porém, quando comparada a contagem de células entre os campos analisados, o valor de p encontrado foi de 0,01 ($\alpha < 0,05$) (Gráfico 22).

Gráfico 20. Relação entre hepatócitos mononucleados (azul), binucleados (laranja) e a contagem total de hepatócitos por grupo experimental.

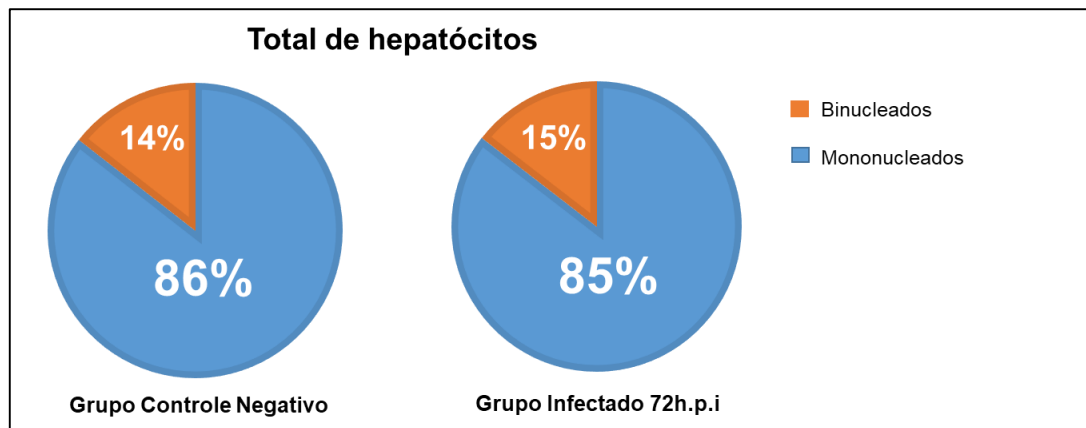


Gráfico 21. Média de células sinusoidais contabilizadas por lâmina analisada.

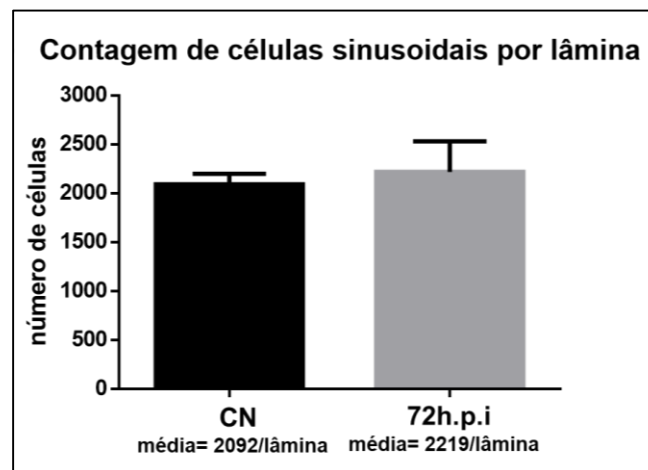
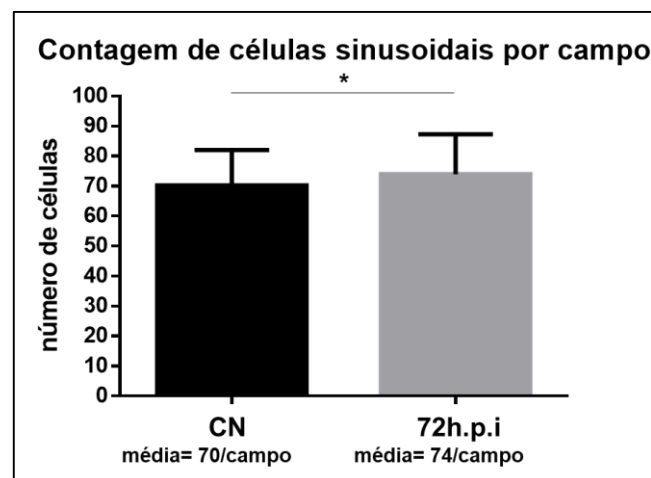


Gráfico 22. Média de células sinusoidais contabilizadas por campo analisado.



* $p < 0,05$

5.7.3. Análises histopatológicas e ultraestruturais de coração de camundongos BALB/c

5.7.3.1. Análises histopatológicas

Análises histopatológicas de fragmentos de coração de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram cardiomiócitos fusiformes, de tamanho normal, arranjados em feixes paralelos. Não foram observados sinais de edema, congestão, hemorragia e infiltrado celular clássico (Figura 21). A imagem apresentada representa todo o grupo controle negativo (n=5)

Análises histopatológicas de fragmentos cardíacos de camundongos BALB/c 72 h.p.i com DENV-3 revelaram áreas bem preservadas e sem alterações histopatológicas relevantes, apenas aumento visual na celularidade do tecido conjuntivo interfascicular/endomísio (Figura 22) e discreta infiltração celular no miocárdio (Figura 23). As imagens apresentadas abaixo são representativas de 40% do grupo experimental analisado (n=2)

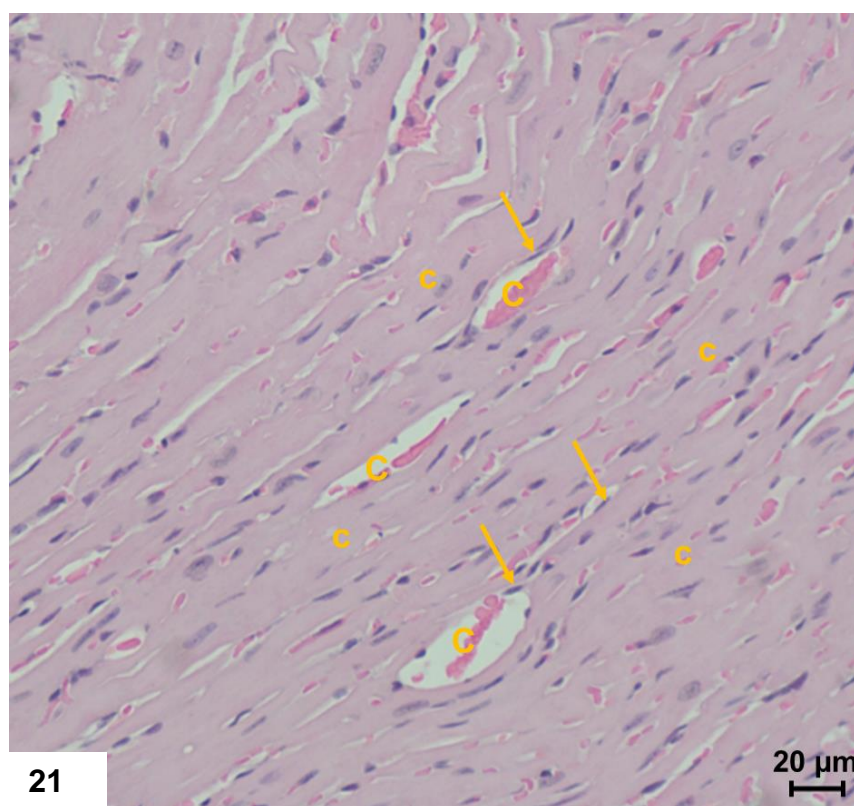


Figura 21. Secção histológica de coração de camundongo BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina. Área tecidual bem preservada, sem sinais de edema, congestão ou infiltrados celulares. Cardiomiócitos (c) fusiformes, de tamanho normal,

arranjados em feixes paralelos. Capilar sanguíneo (C), célula endotelial (setas). Barra= 20 μ m.

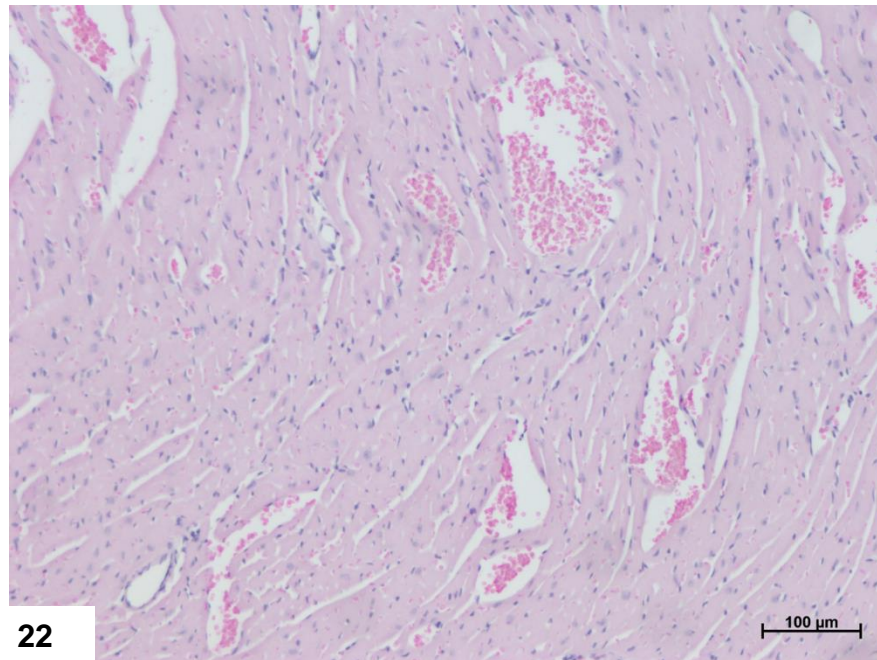


Figura 22. Secção histológica de coração de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 corada com hematoxilina e eosina. Área do miocárdio apresentando aumento de celularidade no endomísio. Barra=100 μ m

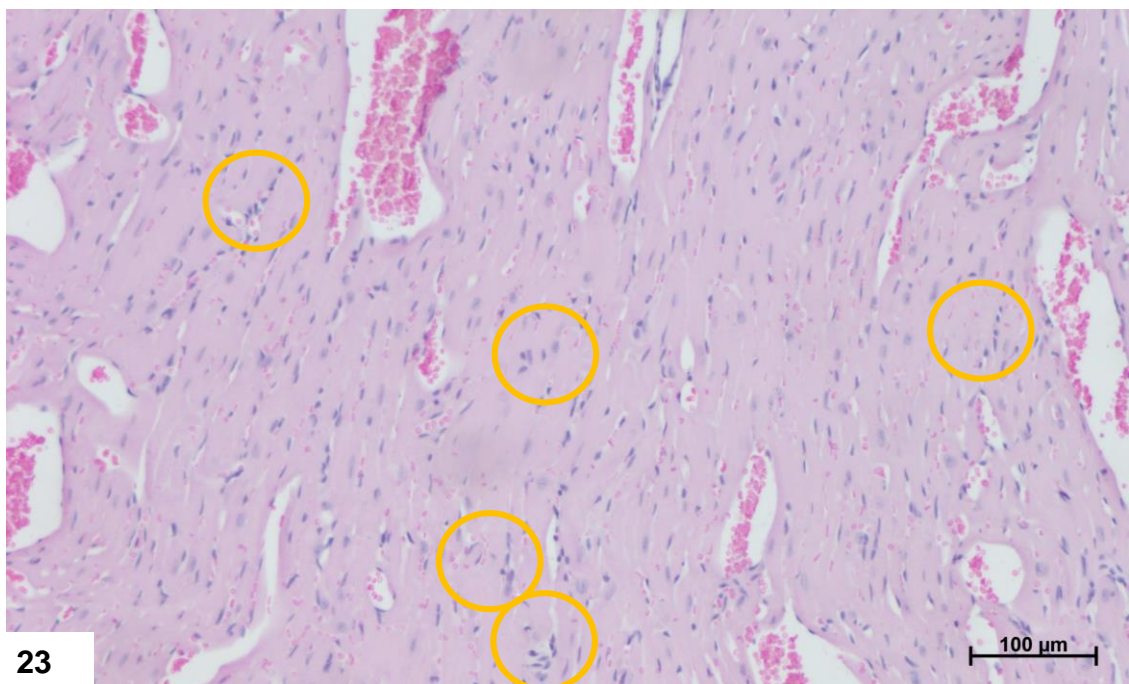
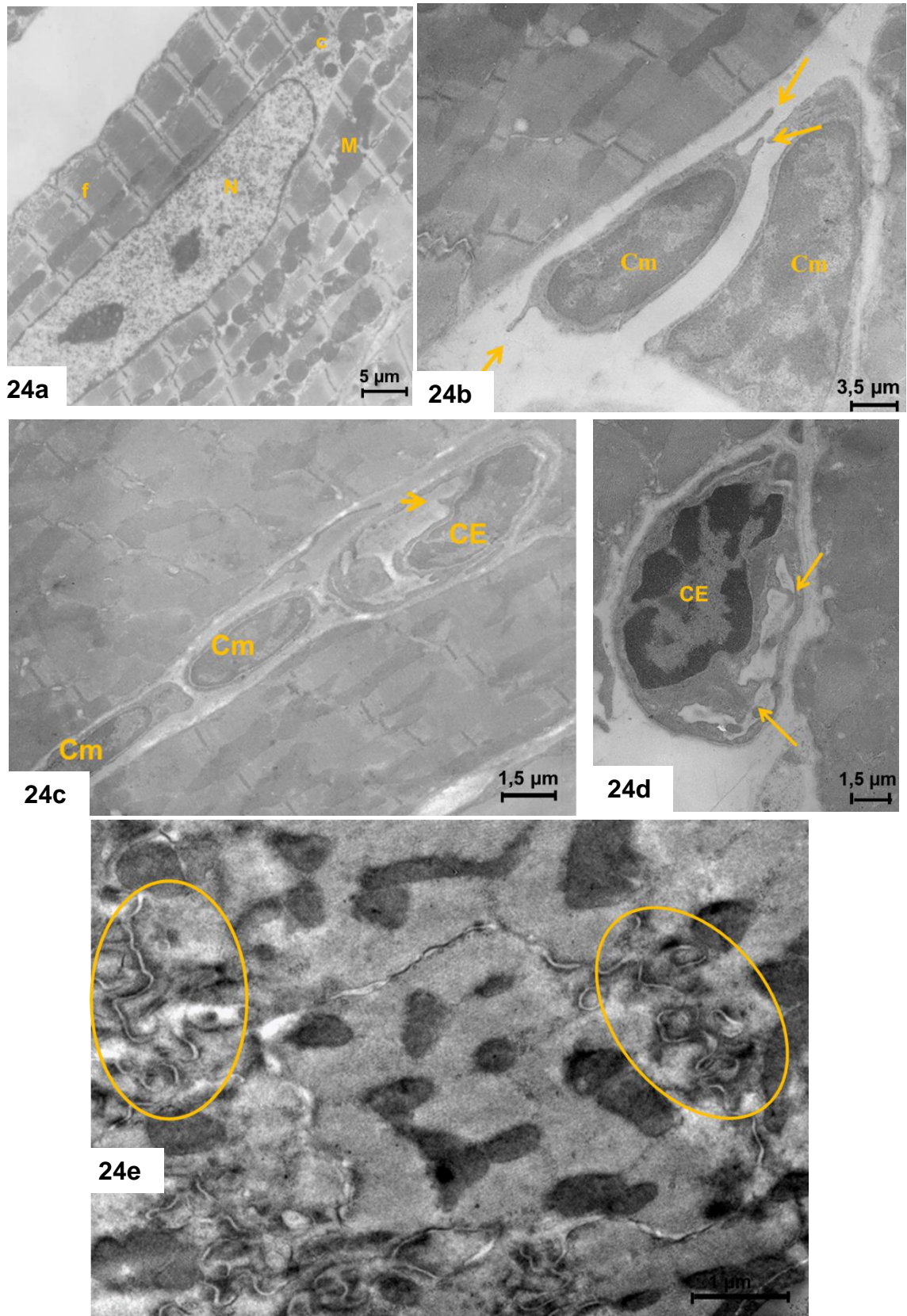


Figura 23. Secção histológica de coração de camundongo BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 corada com hematoxilina e eosina. Discretos infiltrados celulares no pericárdio (círculos). Barra=100 μ m

5.7.3.2. Análises ultraestruturais

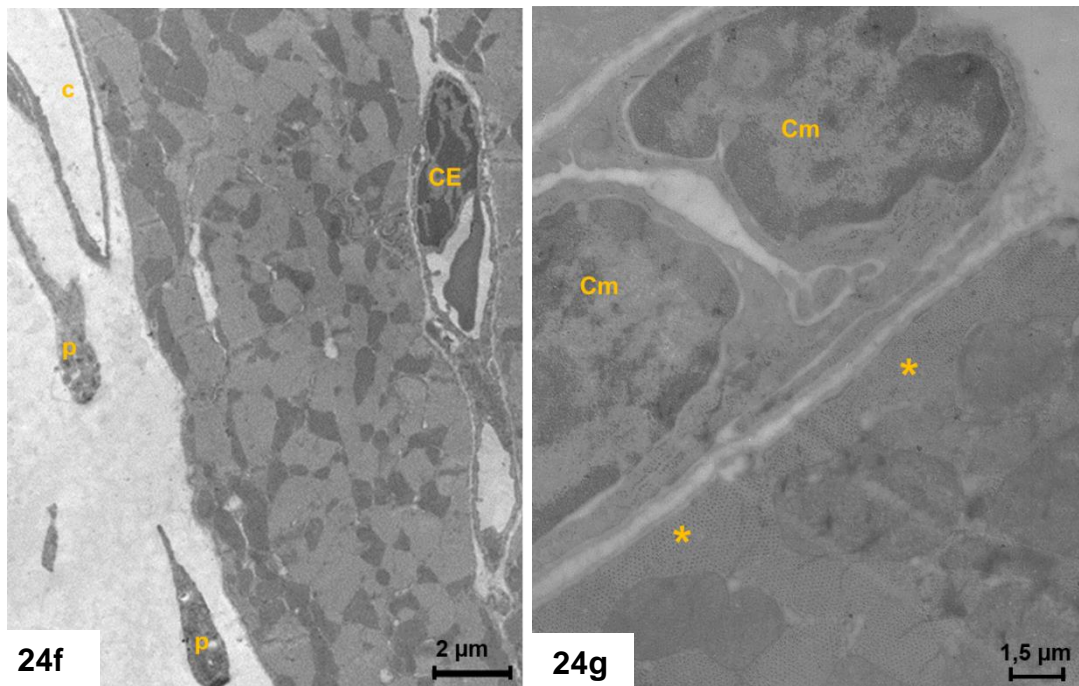
Análises ultraestruturais de fragmentos cardíacos de camundongos BALB/c não infectados mostraram cardiomiócitos com citoarquitetura preservada (Figura 24a), fibras arranjadas em feixes na mesma direção e interstício sem infiltração celular, sinais de edema ou congestão. A imagem apresentada representa todo o grupo controle negativo.

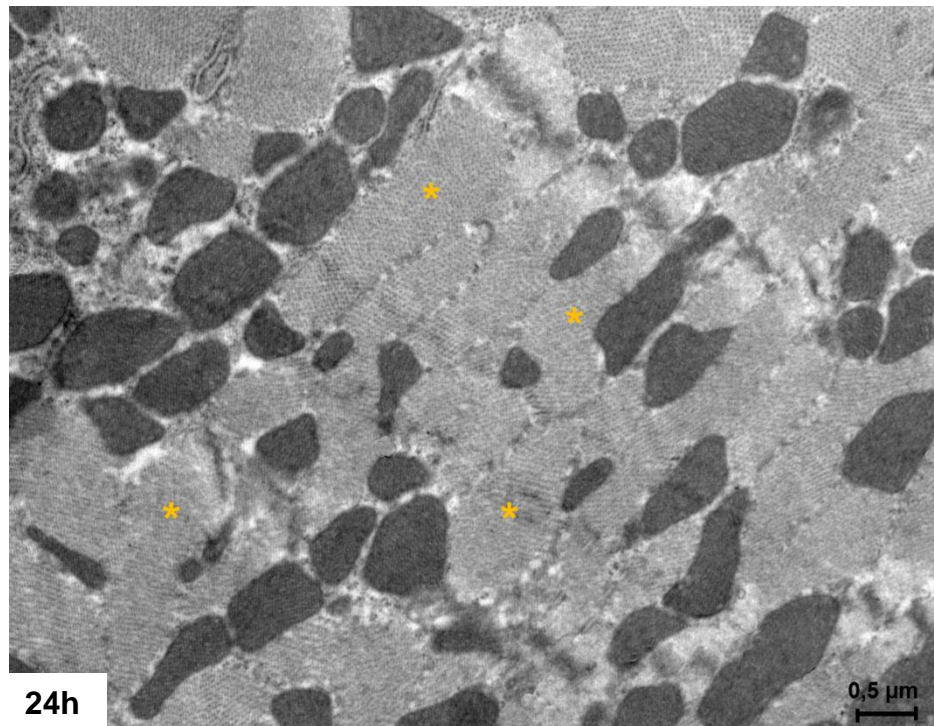
Análises ultraestruturais de coração de camundongos infectados experimentalmente com DENV-3 demonstraram alterações pontuais havendo áreas totalmente preservadas. As principais alterações observadas foram: infiltração de células mononucleadas e plaquetas no interstício e desorganização discreta das fibras cardíacas e dos discos intercalares. Além disso, foram observados sinais de ativação do endotélio e de células mononucleadas, evidenciada pelo espessamento do citoplasma de células endoteliais e emissão de prolongamento da membrana citoplasmática de células endoteliais e células mononucleadas (Figuras 24b - 24h). As imagens apresentadas abaixo são representativas de todo o grupo experimental (n=5).



Figuras 24a – 24e. Secções ultrafinas de coração de camundongo BALB/c contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. **[a]** Secção ultrafina de coração de

camundongo BALB/c não infectado. Área bem preservada, sem sinais de necrose, infiltrado clássico, edema, congestão e/ou desorganização de fibras. Cardiomiócito (c), núcleo (N), fibras cardíacas (f), mitocôndrias (M). **[b-e]** Secções ultrafinas de coração de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3. **[b,c]** Presença de células mononucleares (Cm) no interstício. **[b-d]** Ativação de célula mononuclear (Cm) e células endoteliais (CE), evidenciada pela emissão de prolongamento de membrana citoplasmática (setas) e **[d]** espessamento de citoplasma de célula endotelial. **[e]** Sinais de desorganização dos discos intercalares (círculos). Barra (a)= 5 μm . (b)= 3,5 μm . (c,d) = 1,5 μm . (e) = 1 μm .





Figuras 24f – 24h. Secções ultrafinas de coração de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3. **[f]** Plaquetas (p) circulando fora do capilar sanguíneo (c). Célula endotelial (CE). **[g]** Presença de células mononucleares (Cm) no interstício. **[g, h]** Desorganização de fibras cardíacas (*). Barra (f)= 2 μm. (g)= 1,5 μm. (h)= 0,5 μm.

5.7.4. Análises histopatológicas, ultraestruturais e histomorfométricas de rins de camundongos BALB/c

5.7.4.1. Análises histopatológicas

Análises histopatológicas em fragmentos renais de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) demonstraram corpúsculos de Malpighi, formados pela cápsula de Bowman e glomérulos, bem preservados e sem sinais de atrofia, glomerulite ou hemorragia. Além disso, o interstício, túbulos contorcidos proximais, túbulos contorcidos distais e túbulos coletores não apresentavam sinais de exsudato, infiltrados inflamatórios ou hemorragia (Figuras 25 e 26). As imagens apresentadas são representativas de todo o grupo controle negativo (n=5).

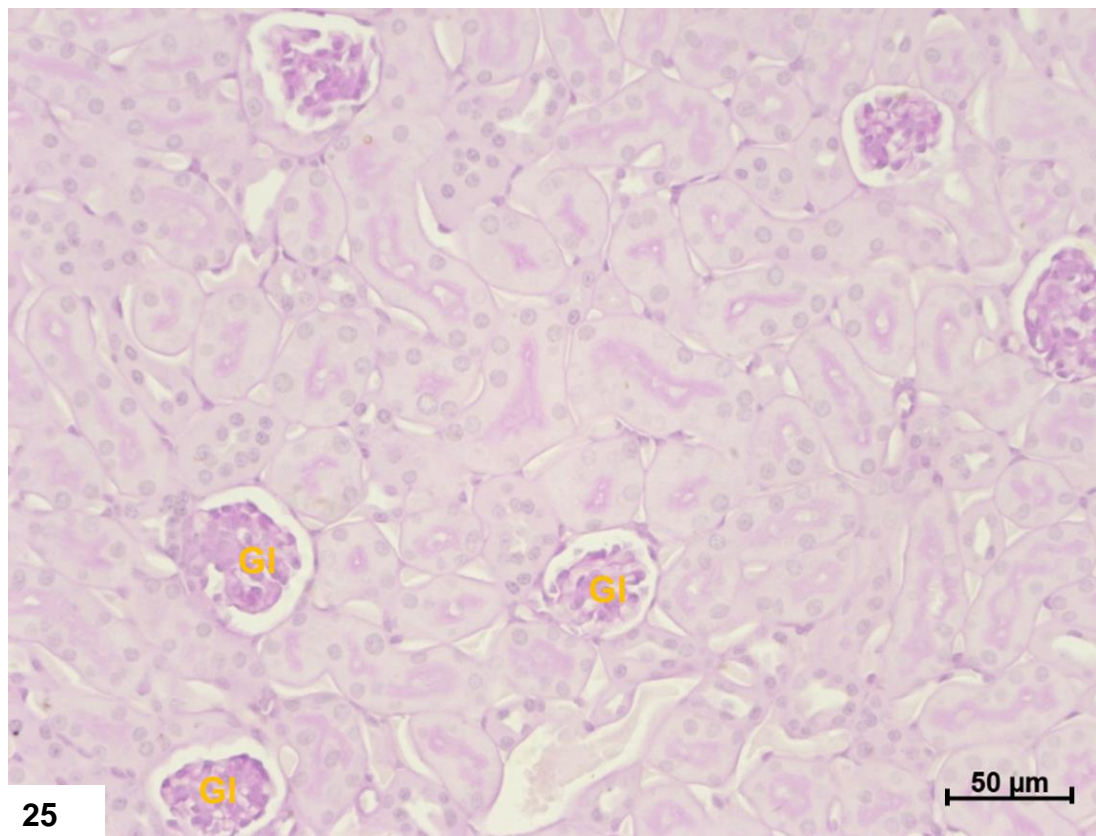


Figura 25. Secção histológica de rim de camundongos BALB/c não infectado corada pela reação de PAS. Glomérulos bem preservados, sem sinais de glomerulite ou atrofia. Parênquima renal sem exsudato ou infiltrados celulares. Barra = 50 μm.

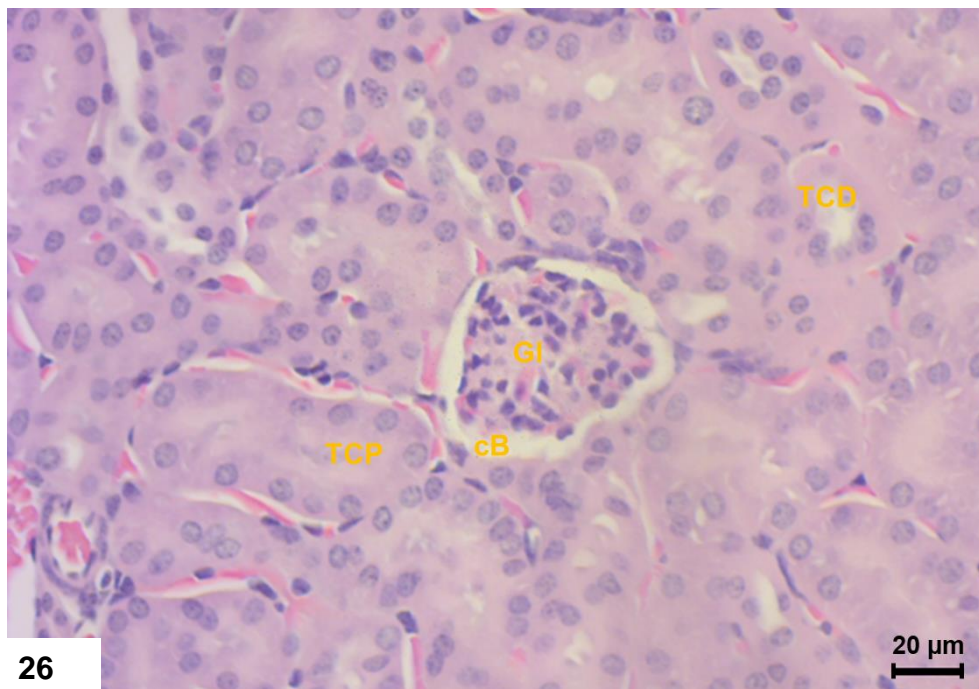
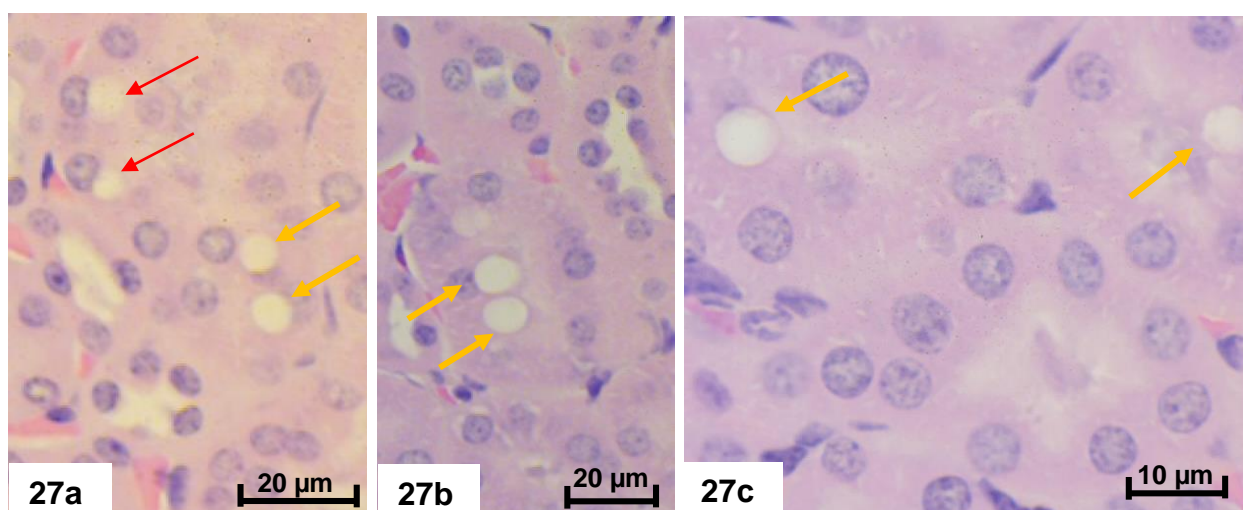


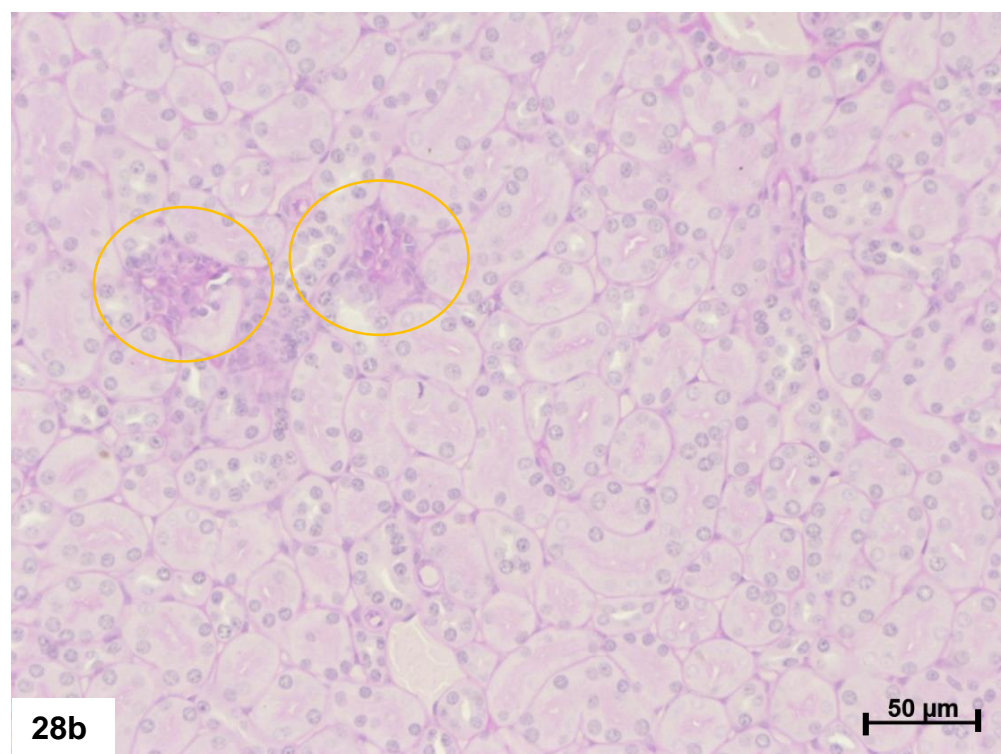
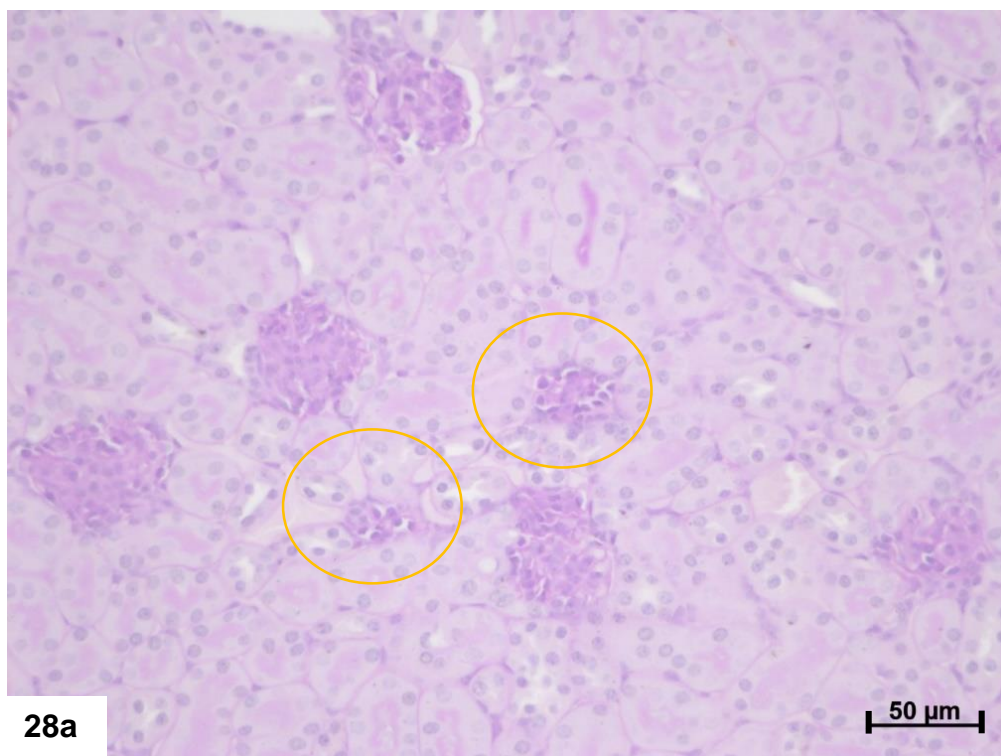
Figura 26. Secção histológica de rim de camundongos BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina. Parênquima renal bem preservado, com túbulo contorcido distal

(TCD), túbulo contorcido proximal (TCP) e corpúsculo de Malpighi, formado pela cápsula de Bowman (cB) e glomérulo (GI) sem qualquer alteração. Barra = 20 μ m.

Análises histopatológicas a partir de lâminas de rins de camundongos infectados experimentalmente com DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina sugeriram atrofia glomerular e revelaram presença de inclusões citoplasmáticas em células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais (Figuras 27a – 27c). O aprofundamento da análise, realizado com PAS, revelou atrofia glomerular, com estrutura mesangial desarranjada e ausência da cápsula de Bowman (Figuras 28a – 28b). Foram observadas áreas de glomérulos atróficos ao lado de extensas áreas com ausência de glomérulos e aumento da densidade da planura estriada de túbulos contorcidos proximais (Figura 29). Áreas apresentando figuras de mitose em células tubulares, sinais indiretos de hiperplasia, também foram observadas (Figuras 30a – 30c). As imagens referentes a essas alterações são representativas de 80% do grupo experimental (n=4). Além disso, foram observados sinais de congestão com presença de transudato (Figura 31) e células infiltradas no interstício (Figura 32). As imagens referentes a essas alterações são representativas de 40% do grupo experimental (n=2). Análises histopatológicas em lâminas coradas com tricômico de Masson revelaram ausência de fibrose e de depósito de imunocomplexos no interstício (não mostrado).



Figuras 27a – 27c. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72h.p.i pelo DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Presença de inclusões citoplasmáticas únicas (setas) no citoplasma de células epiteliais tubulares. As setas vermelhas indicam aparente abaulamento do núcleo, devido à presença da inclusão no citoplasma. Barra (a, b) = 20 μ m. (c) = 10 μ m.



Figuras 28a – 28b. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 coradas pela reação de PAS. Glomérulos atróficos (círculos), com estrutura mesangial desarranjada e ausência da cápsula de Bowman. Barras= 50 μm.

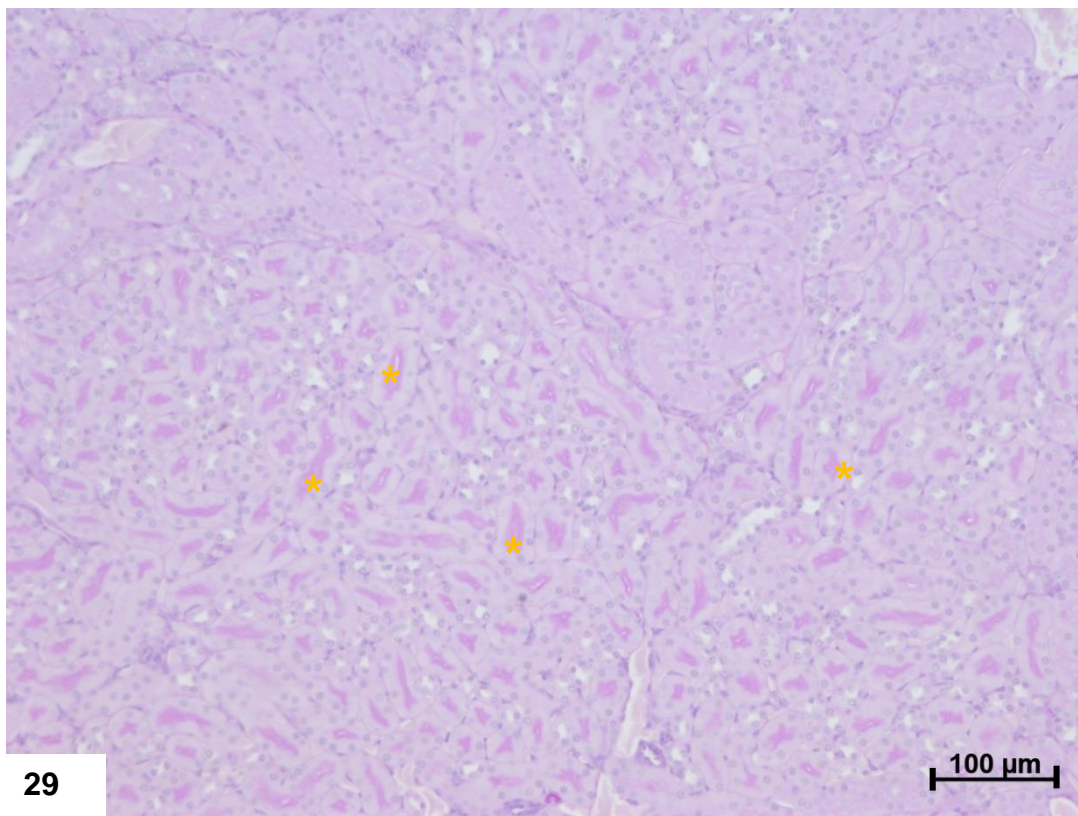
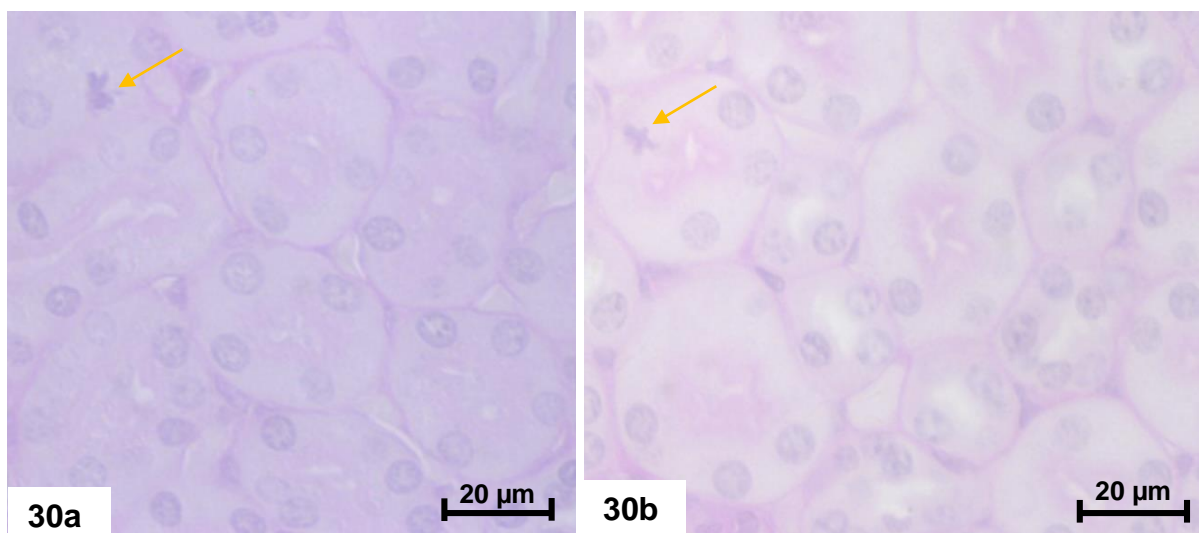
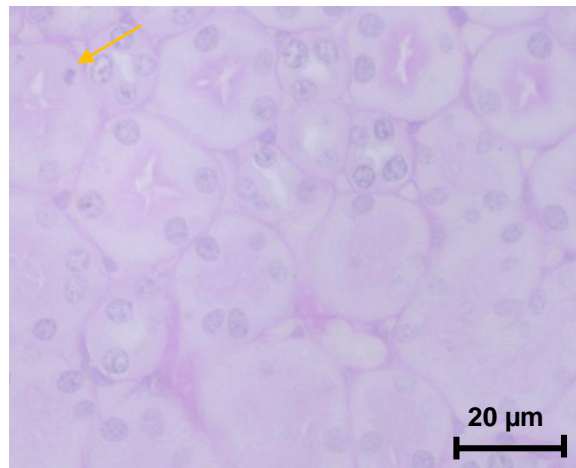
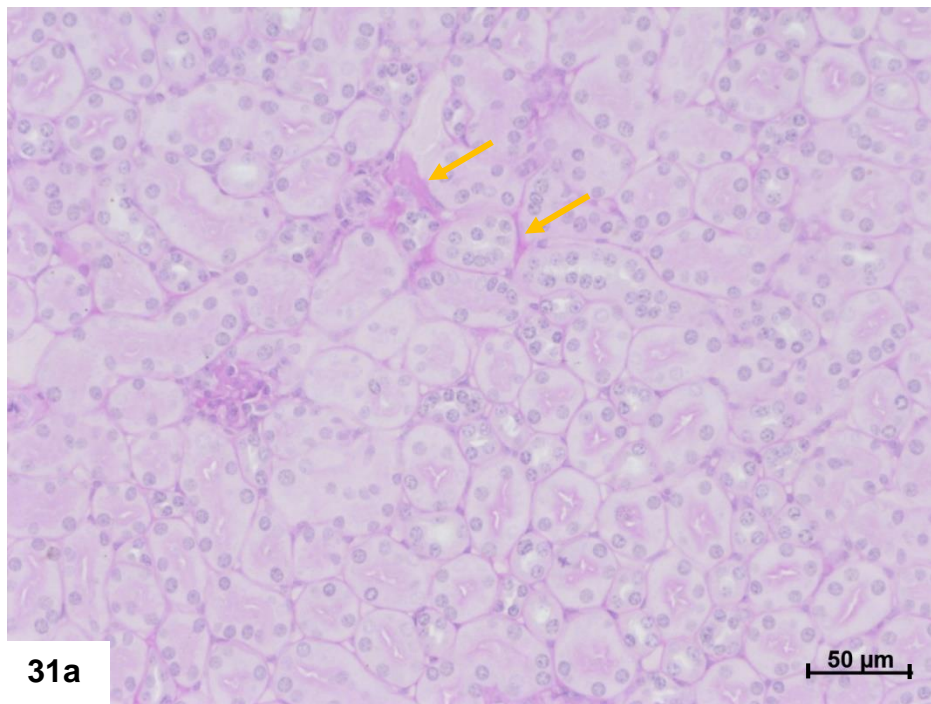


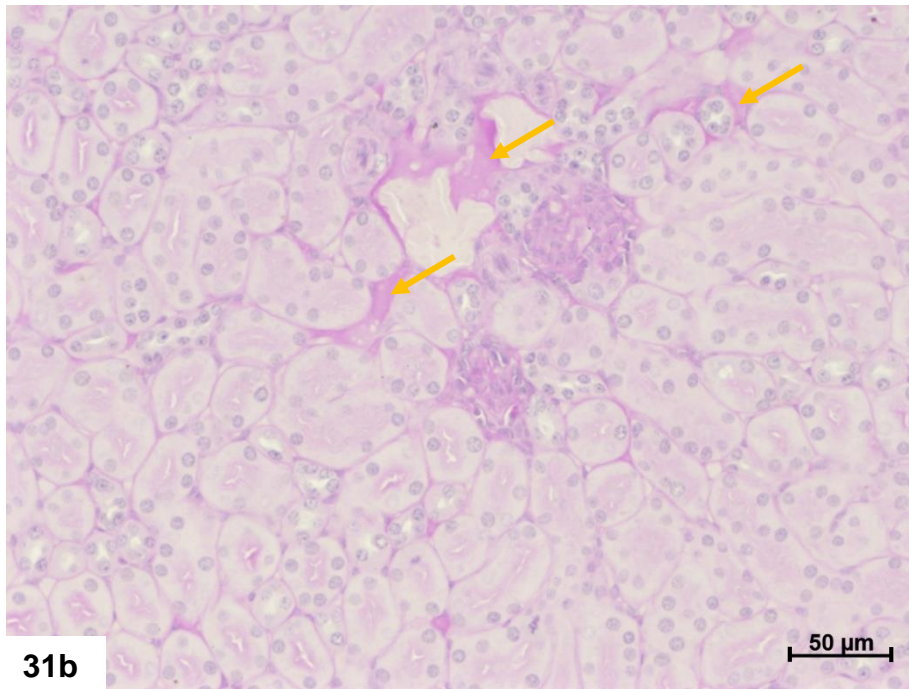
Figura 29. Secção histológica de rim de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 corada pela reação de PAS. Extensa área do parênquima renal apresentando ausência de glomérulos e adensamento da planura estriada de túbulos contorcidos proximais (*). Barra= 100 μm.





Figuras 30a – 30c. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 coradas pela reação de PAS. Figuras de mitose (setas), sinais indiretos de hiperplasia, podendo estar relacionados à lesão tubular primária. Barras= 20 μ m.





Figuras 31a – 31b. Secções histológicas de rins de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 coradas pela reação de PAS. Sinais de congestão, evidenciada pela presença de exsudato no interstício (setas). Barras= 50 μ m.

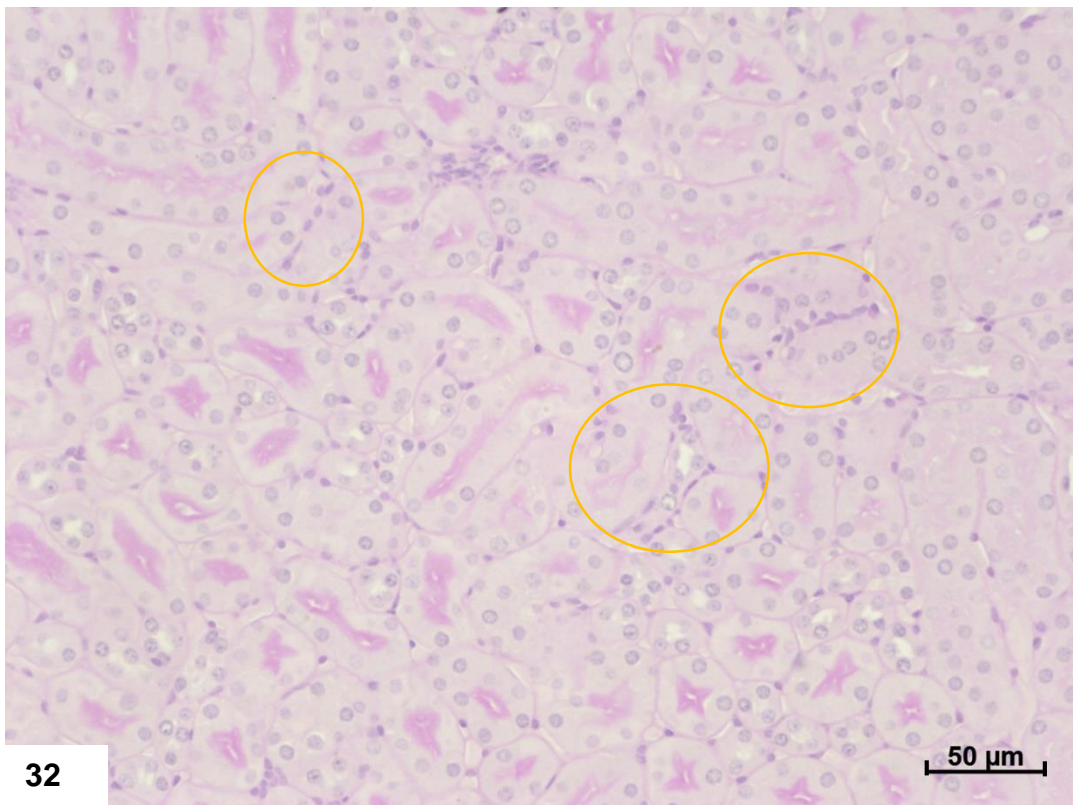
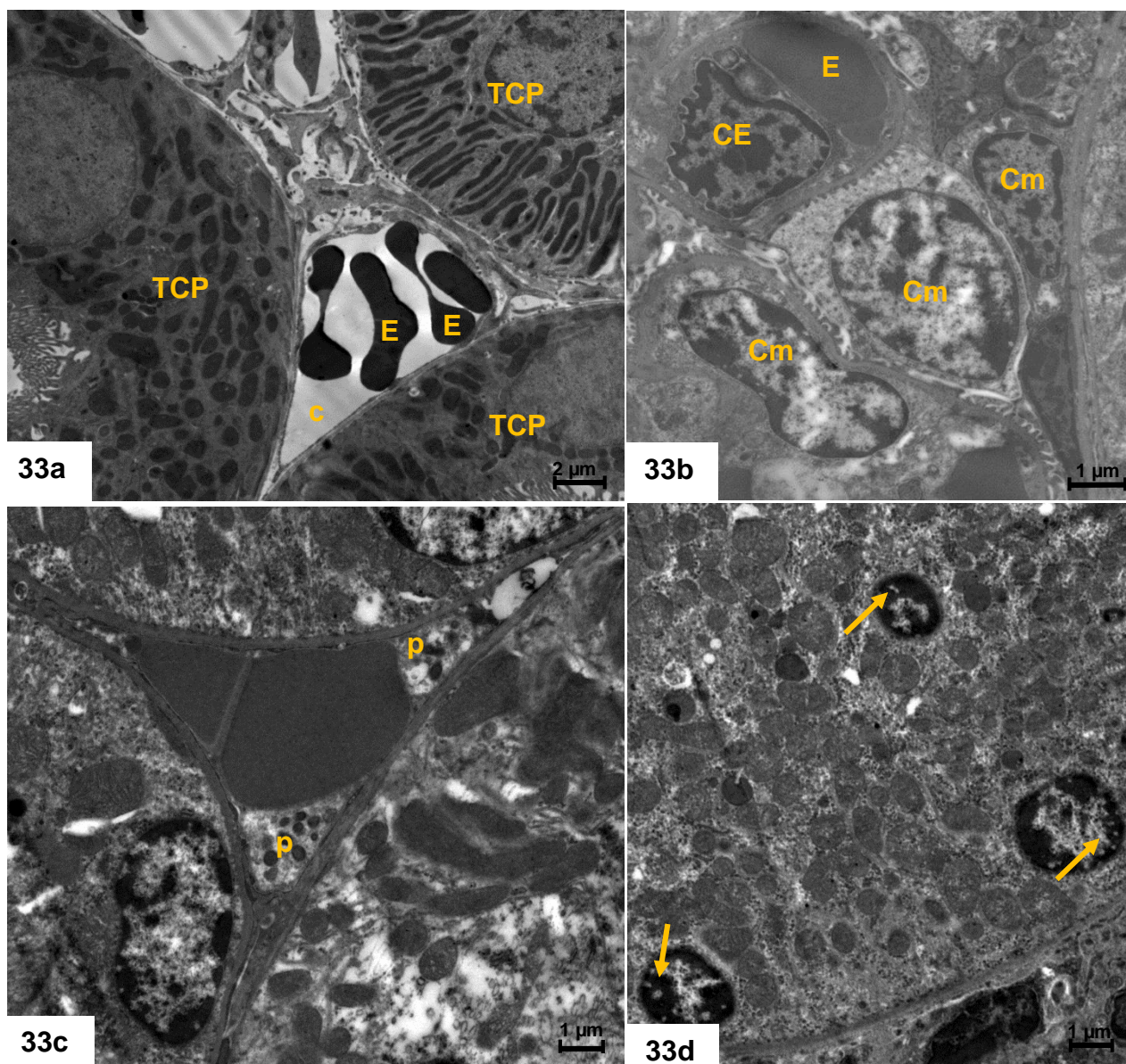


Figura 32. Secção histológica de rim de camundongo BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 corada pela reação de PAS. Presença de infiltrado celular no interstício (círculos) Barra= 50 μ m.

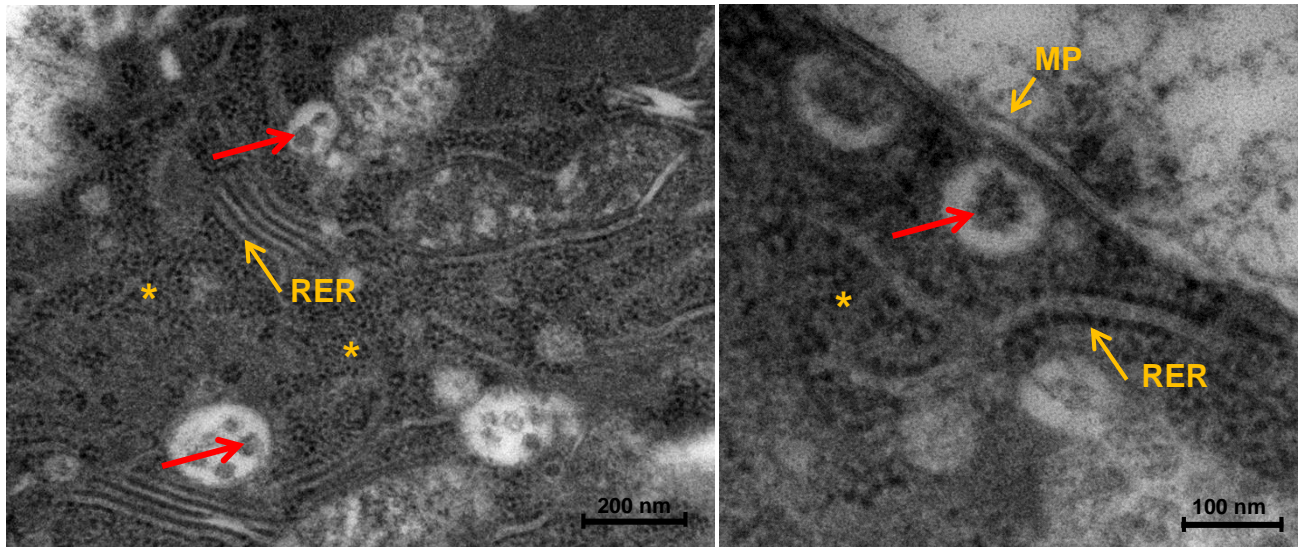
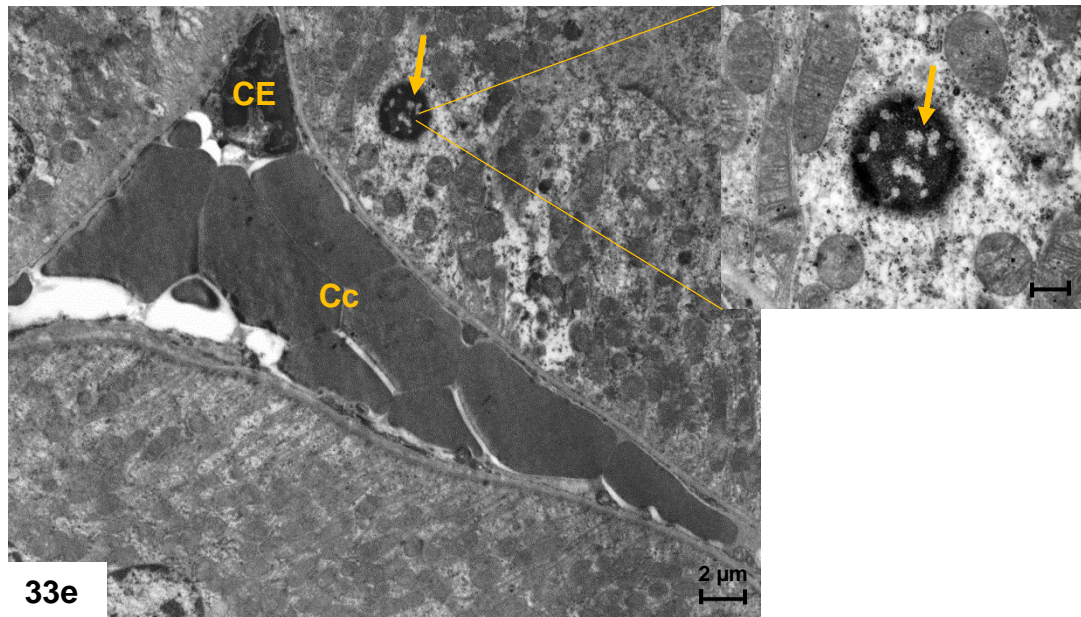
5.7.4.2. Análises ultraestruturais

Análises ultraestruturais de rins de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram parênquima renal totalmente preservado, ausência de infiltrados, sinais de congestão, edema ou atrofia de glomérulos (Figura 33a). A imagem apresentada é representativa de todo o grupo controle negativo.

Já em rins de camundongos 72 h.p.i pelo DENV-3, as análises ultraestruturais revelaram presença de células mononucleares no interstício e em capilares, adesão de plaquetas ao endotélio, focos de congestão vascular, sinais de degeneração celular, caracterizados pela presença de núcleos picnóticos e degeneração nuclear de células intersticiais. As imagens referentes à essas alterações são representativas de todo o grupo experimental (n=5). Além disso, foram observados sinais de intensa atividade de síntese proteica em célula intersticial, evidenciados pelo espessamento do retículo endoplasmático rugoso e presença de inúmeros ribossomos eletrondensos. Neste mesmo campo, também foi observada presença de partículas semelhantes em morfologia e diâmetro aos DENV (Figuras 33b – 33g). As imagens referentes à essas alterações são representativas de somente um animal do grupo experimental.



Figuras 33a – 33g. Secções ultrafinas de rins de camundongos BALB/c contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. **[a]** Secção ultrafina de rim de camundongo BALB/c não infectado. Eritrócitos (E) contidos no capilar (c) e células do túbulo contorcido proximal (TCP) sem qualquer alteração. **[b]** Presença de células mononucleares (Cm) no interstício. **[c]** Plaquetas (p) aderidas ao endotélio. **[d]** Sinais de degeneração de células do túbulo contorcido, caracterizada pela presença de núcleos picnóticos (setas) Barra (a) = 2 μ m. (b,c,d)= 1 μ m.



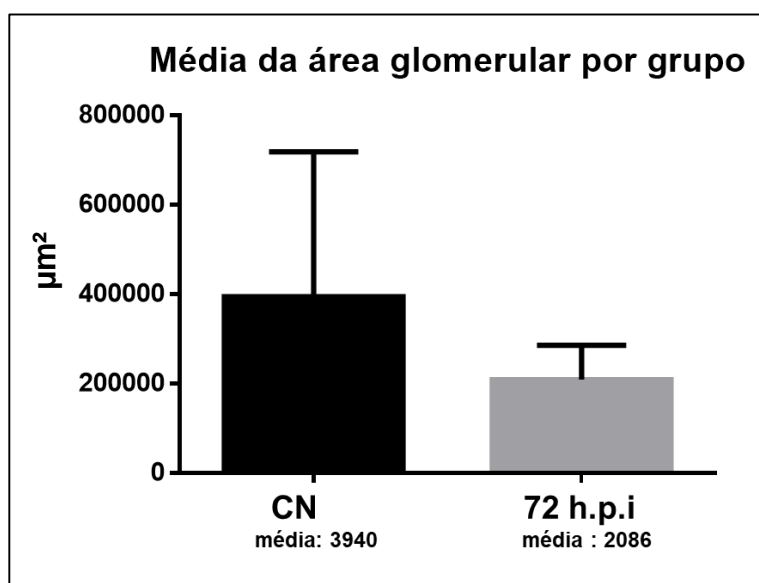
Figuras 33e – 33f. Secções ultrafinas de rins de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. **[e]** Sinais de congestão capilar (Cc) e degeneração de células do túbulo contorcido, caracterizada pela presença de núcleos picnóticos (setas e inset). **[f,g]** Intensa atividade proteica de célula do túbulo contorcido proximal, evidenciada pelo espessamento de retículo endoplasmático rugoso (RER) (setas) e áreas com inúmeros ribossomos eletrondensos (*). Partículas semelhantes em morfologia e diâmetro aos DENV (setas vermelhas) no interior de compartimento membranoso no citoplasma. Membrana plasmática (MP). Barra (e) = 2 μ m. (f)= 200nm. (g) = 100nm.

5.7.4.3. Análises histomorfométricas

Ao final das análises histomorfométricas de secções histológicas de rins de camundongos BALB/c pertencentes ao grupo controle e ao grupo 72 h.p.i, foram analisados 300 campos distintos (150/grupo), referentes às 10 lâminas (5/grupo) estudadas.

Foi analisado um total de 189 glomérulos pertencentes ao grupo controle negativo, com área média glomerular de $3940 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1450 \mu\text{m}^2$) Em relação ao grupo 72 h.p.i, foram analisados 226 glomérulos, com área média glomerular de $2086 \mu\text{m}^2$ ($\pm 344 \mu\text{m}^2$). Embora tenha sido observado um aumento relevante no número de glomérulos atróficos nas análises histopatológicas do grupo 72 h.p.i, com consequente diminuição da área glomerular (Gráfico 23), a comparação das médias referentes à área glomerular dos grupos controle e infectado não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,104$)

Gráfico 23. Média da área glomerular por grupo experimental analisado.



5.8. Detecção do genoma viral

O resultado do teste de RT-PCR em tempo real a partir de amostras de soro, saliva, urina e macerados de órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV-3 demonstrou que estes animais foram suscetíveis à cepa epidêmica, não neuroadaptada utilizada neste estudo.

Considerando a detecção de RNA viral em diferentes órgãos, fígado, baço, pulmão, cerebelo e rim apresentaram maior recuperação do RNA viral (Tabela 16).

Tabela 16. Detecção do genoma viral de DENV-3 por RT-PCR em tempo real em macerado de órgãos de camundongos BALB/c.

Órgão	Pulmão	Fígado	Coração	Baço	Rim	Cérebro	Cerebelo
Positivos/Testados	4/17	6/17	1/17	5/17	3/17	1/17	4/17

Em relação à viremia, foi possível detectar o genoma viral em 2 dos 5 soros testados, com média da quantificação igual a $3,65 \times 10^6$ cópias de RNA/mL. De maneira semelhante, 2 das 5 salivas testadas mostraram-se positivas na detecção e quantificação do RNA viral, com média de título igual a $3,68 \times 10^6$ cópias de RNA/mL. Não foi detectado o genoma viral nas amostras de urina testadas (Tabela 17).

Tabela 17. Detecção do genoma viral de DENV-3 por RT-PCR em tempo real em amostras de soro, saliva e urina de camundongos BALB/c.

Fluido	Soro	Saliva	Urina
Positivos/Testados	2/5	3/5	0/5

Conforme mostrado na tabela 18, o órgão que obteve a maior média de título recuperado foi o baço ($5,89 \times 10^{10}$ cópias de RNA/mL). O RNA viral pôde ser recuperado de 6 das 17 amostras de fígado testadas, com média dos títulos igual a $1,60 \times 10^6$ cópias de RNA/mL. No cerebelo e pulmão, a fita positiva do RNA foi recuperada em 4 das 17 amostras testadas, com média dos títulos igual a $1,88 \times 10^4$ e $2,79 \times 10^4$ cópias de RNA/mL, respectivamente. Em relação ao rim, o RNA viral pode ser detectado em 3 das 17 amostras, com média de títulos igual a $4,17 \times 10^5$ cópias de RNA/mL. Somente 1

amostra de coração e cérebro mostrou-se positiva em relação às 17 amostras testadas, sendo a média da quantificação igual a $1,89 \times 10^2$ e $1,61 \times 10$ cópias de RNA/mL, respectivamente.

Em relação à quantificação e levando em consideração a correlação cópias de RNA vs partículas virais em DENV-2 (PFU= cópias de RNA – 2 logs) (Richardson *et al.*, 2006) uma amostra de fígado (camundongo 13), duas de baço (camundongos 4 e 13) e uma amostra de saliva (camundongo 17) apresentaram títulos superiores ao inóculo utilizado nas infecções experimentais confirmado por imunofluorescência (10^4 PFU/mL), sugerindo replicação viral nestes locais (Tabela 18).

A fita positiva do RNA viral foi detectada em 13 dos 17 camundongos, em pelo menos um órgão testado. Em cinco animais, o RNA do DENV-3 foi detectado em dois órgãos distintos (Tabela 18), e em três detectamos a carga viral em três órgãos. Em dois animais, foi possível detectar o RNA viral no soro, além dos órgãos. Em três animais, foi possível detectar o RNA viral na saliva, além dos órgãos. No animal 16, foi possível detectar o genoma viral tanto na saliva quanto no soro, além dos órgãos positivos. Conforme mostrado na tabela 19, o camundongo 4 apresentou maior média de título de RNA recuperado.

Obs: A identificação de cada camundongo (1, 2, 3...) é específica para este grupo experimental, não tendo correlação com a identificação usada para os animais do grupo de análises bioquímicas ou de hemograma.

Tabela 18. Quantificação da carga viral do DENV-3 por RT-PCR em tempo real, a partir de macerado de órgãos, saliva e soro de camundongos BALB/c.

Camundongo	Quantificação do DENV-3 (cópias de RNA/mL)								
	Pulmão	Fígado	Coração	Baço	Rim	Cérebro	Cerebelo	Soro	Saliva
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SA	AS
2	3,68x10 ⁴	ND	ND	ND	ND	ND	2,65x10 ⁴	SA	AS
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	SA	AS
4	ND	ND	ND	1x10 ¹²	ND	ND	2,23x10 ⁵	SA	AS
5	ND	8,93x10 ⁴	ND	ND	ND	ND	ND	SA	AS
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,93x10 ⁴	AS	AS
7	4,15x10 ⁵	6,01x10 ⁴	ND	ND	2,14x10 ⁴	ND	ND	AS	AS
8	2,05x10 ⁴	ND	ND	ND	ND	ND	ND	AS	AS
9	ND	4,18x10 ⁵	ND	ND	ND	ND	ND	AS	AS
10	ND	3,86x10 ³	ND	ND	ND	ND	ND	AS	AS
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	AS	AS
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	AS	AS
13	ND	2,66x10 ⁷	ND	4,80x10 ⁸	ND	ND	7,85 x10 ²	ND	ND
14	1,32x10 ³	2,93x10 ³	ND	ND	ND	2,73x10 ¹	ND	ND	1,16x10
15	ND	ND	ND	2,07x10 ¹	2,28x10 ¹	ND	ND	4,24x10 ¹	ND
16	ND	ND	ND	2,39x10 ²	7,06x10 ⁶	ND	ND	1,96 x10 ¹	6,26 x10 ⁷
17	ND	ND	3,21x10 ³	5,71 x10 ¹	ND	ND	ND	ND	1,84 x10 ²
Média/ amostra	2.79 x10 ⁴	1.60 x10 ⁶	1.89 x10 ²	5.89 x10 ¹⁰	4.17 x10 ⁵	1.61 x10	1.88 x10 ⁴	3.65 x10	3,68 x10 ⁶

ND = não detectado. SA= sem amostra

Tabela 19. Média da quantificação dos títulos de RNA viral recuperados por camundongo BALB/c.

Camundongos	Média dos títulos recuperados por animal (cópias de RNA/mL)
1	ND
2	$7,03 \times 10^3$
3	ND
4	$1,11 \times 10^{11}$
5	$9,92 \times 10^3$
6	$7,70 \times 10^3$
7	$5,52 \times 10^4$
8	$2,28 \times 10^3$
9	$4,64 \times 10^4$
10	$4,29 \times 10^2$
11	ND
12	ND
13	$5,63 \times 10^7$
14	$4,80 \times 10^2$
15	$9,54 \times 10$
16	$7,74 \times 10^6$
17	$3,83 \times 10^2$

ND = não detectado

6. Discussão

Atualmente, fortes evidências sugerem uma relação específica entre a genética viral e o resultado clínico da infecção por DEN. Apesar de todos os quatro sorotipos serem capazes de causar SCD/FHD, as infecções por DENV-2 e DENV-3 estão mais associadas a uma maior gravidade da doença (Nisalak *et al.*, 2003).

A circulação do DENV-3 no Brasil foi identificada em 2000, no município de Nova Iguaçu, RJ. Dois anos depois, esse sorotipo foi responsável pela maior e mais grave epidemia ocorrida no país até então, correspondendo a 80% dos casos ocorridos nas Américas (Nogueira *et al.*, 2002). A infecção por DENV-3 pode levar ao desenvolvimento de doença grave tanto em infecções primárias como secundárias, como observado em estudos epidemiológicos conduzidos na Indonésia (Eram *et al.*, 1979; Sumarmo *et al.*, 1983), Sri Lanka (Messer *et al.*, 2002), Cuba (Guzman *et al.*, 2006), Tailândia (Vaughn *et al.*, 2000) e Nicarágua (Gutierrez *et al.*, 2011). No Brasil, infecções por este sorotipo estão fortemente associadas a sinais e sintomas mais graves, incluindo choque, dor abdominal e exantema, em comparação aos outros três sorotipos (Passos *et al.*, 2004). Como ainda não estão bem definidos os fatores que determinam o porquê de certos indivíduos apresentarem DEN e outros desenvolverem DG, o estabelecimento de modelos animais é de grande relevância para estudos sobre a patogênese da doença.

A maioria dos estudos a respeito de modelos murinos propostos na literatura utiliza camundongos neonatos, humanizados ou imunodeficientes (Sriurairatna, Bhamarapavati & Phalavadhtana, 1973; Tan *et al.*, 2010; Rajmane *et al.*, 2013), que são inoculados por vias invasivas, como a intracraniana (Falgout *et al.*, 1990; Raut *et al.*, 1996) ou com cepas de vírus neuroadaptadas (Raut *et al.*, 1996; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2012). Modelos murinos imunocompetentes não são capazes de produzir viremia eficientemente quando inoculados com amostras provenientes de isolados clínicos (Ashour *et al.*, 2010; Zompi & Harris, 2012). Contudo, estudos prévios realizados no Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (IOC/FIOCRUZ) utilizando camundongos BALB/c infectados com cepas de DENV-1 e DENV-2 não neuroadaptadas e inoculadas pelas vias IV ou IP detectaram viremia do 2^o ao 11^o dia pós-infecção (Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005), além de alterações teciduais similares às aquelas observadas em casos humanos (Barth *et al.*, 2006; Barreto *et al.*, 2007, 2009; Paes *et al.*, 2009; Rasinhas, 2013; 2017; Jácome, 2015a; Caldas, 2016).

A DEN é uma doença febril aguda que apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. A maioria dos pacientes é assintomática ou apresenta sinais leves de FD ou DC, que incluem febre de início súbito, com duração média de 2 a 7 dias, cefaléia, dor retro-orbital, congestão conjutival, mialgia, artralgia, prostração, anorexia, sensação de paladar alterado, podendo ocorrer erupção cutânea maculopapular (Souza *et al.*, 2008; Dalrymple & Mackow, 2012). Durante a cinética experimental realizada neste estudo sinais clínicos como petéquias, tremores ou diarreia não foram observados. Tais achados corroboram os observados por Jácome (2015) e Rasinhas (2017), que também não observaram sinais clínicos durante a cinética experimental em camundongos BALB/c infectados pelo DENV-2 e DENV-4, respectivamente. Porém, ao contrário destes autores, no presente estudo foi observado eriçamento de pelo em camundongos 72 h.p.i pelo DENV-3.

A análise da temperatura retal de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 revelou uma variação de temperatura (T2-T1) igual a 0,5 °C. Já em camundongos não infectados, não houve variação de temperatura. Comparando as medianas das temperaturas finais (T2) de camundongos controles negativos e 72 h.p.i, foi possível observar um aumento de 0,7 °C, que se mostrou estatisticamente significativo ($p=0,013$). A variação de temperatura retal dos camundongos 72 h.p.i mostrou-se menor que a observada por Rasinhas (2017) em camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-4, que foi de 1,5 °C a 2 °C.

Embora não existam estudos na literatura que estabeleçam valores para uma temperatura febril específica em camundongos BALB/c, de um modo geral, aumentos significativos da temperatura basal caracterizam alterações metabólicas e fisiológicas no organismo do animal, além de estarem diretamente relacionados à tempestade de citocinas causada pela infecção pelos DENV. 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.

Acompanhando os sintomas, alterações no hemograma são comumente observados e indicam o prognóstico durante o curso da DEN. Dentre as alterações no hemograma, destaca-se a trombocitopenia (contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³) acompanhada de hemoconcentração (aumento de hematócrito em 20% do valor basal). A contagem de leucócitos é variável, podendo ocorrer desde leucopenia até leucocitose leve (MS, 2002). A linfocitose com atipia linfocitária é um achado comum. A diminuição do número de linfócitos pode ser consequência do aumento da apoptose

de células mononucleares do sangue periférico observada durante a infecção por DENV (Myint *et al.*, 2006; Torrentes-Carvalho *et al.*, 2014). A hemoconcentração e os valores crescentes de hematócrito, manifestam uma das principais características fisiopatológicas associadas à gravidade da DEN – o extravasamento plasmático (John, Lin & Perng, 2015). Em relação à trombocitopenia, diversos mecanismos levam à depleção plaquetária nos indivíduos infectados, incluindo a infecção direta de megacariócitos pelo DENV, bem como a destruição das plaquetas devido à ligação da NS1 viral e anticorpos anti-plaquetários (Sun *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2012; Sridharan *et al.*, 2013). Estudos utilizando camundongos imunocompetentes também observaram alterações no hemograma, como a trombocitopenia e aumento do hematócrito (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007).

Em relação à contagem de plaquetas, um significativo aumento foi observado neste estudo, no grupo 72 h.p.i, com uma diminuição em 7 d.p.i que foi considerada significativa quando comparado com os grupos controle negativo (animais não infectados) e 72 h.p.i. Em 14 d.p.i foi observada uma nova queda na contagem de plaquetas, que foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo 72 h.p.i. No grupo 72 h.p.i, nenhum animal apresentou valor de contagem de plaquetas inferior à mediana do grupo controle. Já no grupo 7 d.p.i, todos os animais apresentaram valores inferiores à mediana do controle. No grupo 14 d.p.i, quatro animais (50%) apresentaram valores individuais de contagem de plaquetas inferiores à mediana do grupo dos animais controle. Tais dados demonstram que, assim como pacientes humanos, camundongos BALB/c apresentam alterações no hemograma quando infectados pelos DENV.

A relação entre a infecção por DENV e desenvolvimento de distúrbios no sistema nervoso central (SNC) foi descrita pela primeira vez em 1976, por Sanguanserm Sri e colaboradores (1976) e mais tarde por Gulati & Maheshwari (2007). As manifestações neurológicas em pacientes com DEN são diversas e incluem convulsões febris, encefalopatia, encefalite, meningite asséptica, trombose e hemorragias intracranianas, efusões subdurais, mononeuropatias, polineuropatias, síndrome de Guillain-Barré e transmielite (Verma, Sahu & Holla, 2014; Aggarwal, Kumar & Faridi, 2015). Os fatores envolvidos na fisiopatologia das lesões são diversos e incluem a lesão tecidual direta causada pelo vírus devido a sua neurotropidade, hemorragia capilar, coagulação intravascular disseminada e distúrbios metabólicos (Lum *et al.*, 1996; Gulati & Maheshwari, 2007).

Neste trabalho, nenhum sinal de alteração neurológica foi observado nos camundongos infectados pela cepa de DENV-3 durante o período entre a infecção e eutanásia, porém, em cinco animais pertencentes ao grupo 72 h.p.i, sinais de hemorragia subdural foram observados. Sinais de encefalite, paralisia e cegueira já foram reportados em trabalhos desenvolvidos com camundongos (Falgout *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Johnson & Roehrig, 1999; Huang *et al.*, 2000; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2013), porém tais alterações podem estar relacionadas à via de inoculação invasiva escolhida ou à escolha de camundongos humanizados ou imunodeficientes como modelo experimental.

Alterações nos pulmões durante a infecção pelos DENV são comumente observadas e são caracterizadas pela congestão alveolar, hemorragia septal e alveolar, hemoptise, pneumonite e efusão pleural (Setlik *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Marchiori *et al.*, 2009; Weerakoon *et al.*, 2009; de Almeida *et al.*, 2017). Inclusive, considera-se a efusão pleural como um sinal da DG, devido à sua ocorrência em casos de FHD e SCD (Namvongsa *et al.*, 2013; Neeraja *et al.*, 2014). Análises de raio-X torácico de pacientes revelaram opacidades em ambos os lobos pulmonares, que condizem com o quadro de hemorragia pulmonar que, embora raro, apresenta alta gravidade (Sharma *et al.*, 2007). Manifestações mais incomuns incluem a síndrome do desconforto respiratório agudo e disfunção pulmonar (Gulati & Maheshwari, 2007).

Neste estudo, as análises morfológicas de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV-3 revelaram espessamento de septo interalveolar com presença de infiltrado inflamatório majoritariamente mononuclear, focos de atelectasia alveolar e hiperventilação, focos de hemorragia no septo interalveolar e em bronquíolos, acúmulo de líquido no capilar e focos de congestão capilar periférica. Além das alterações supracitadas, análises por MET também revelaram sinais de degeneração de células intersticiais, presença de células mononucleares e plaquetas circulando nos capilares e interação de plaquetas e células endoteliais evidenciada pela produção de vesículas de transporte. Além disso, foi observada a ativação de células endoteliais, plaquetas e de célula mononucleada, evidenciada pela emissão de prolongamento da membrana citoplasmática. Estas alterações assemelham-se às observadas em amostras provenientes de casos de óbito por DEN em humanos (Burke *et al.*, 1988; Miagostovich *et al.*, 1997; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2014), exceto pela formação de membrana hialina no tecido pulmonar e hiperplasia de pneumócitos tipo II (Rodrigues *et al.*, 2014).

Modelos murinos infectados experimentalmente com os DENV apresentaram alterações em diferentes tecidos (Bhamarapavati, 1989, Hotta *et al.*, 1981, Atrasheukaya *et al.*, 2003). Nossos achados corroboram os de Barreto (2004; 2007), Barth (2006), Jácome (2015a), Caldas (2016) e Rasinhas (2017), que observaram espessamento de septo interalveolar, focos de hemorragia no interstício e em bronquíolos, recrutamento de plaquetas, presença de infiltrado inflamatório e presença de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares em pulmão de camundongos BALB/c infectados com o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. No entanto, até onde sabemos, apenas os estudos conduzidos em pulmão de camundongos infectados pelo DENV-3 relataram degeneração de células intersticiais pulmonares (Caldas, 2016).

Com relação ao endotélio, este estudo revelou integridade morfológica da CE e dos complexos juncionais. Porém a ativação de CE foi uma alteração recorrente, caracterizada pela emissão de prolongamentos de membrana citoplasmática e pela produção de vesículas de transporte citoplasmáticas, observada na adesão de plaquetas ao endotélio. A produção e grande concentração de vesículas de transporte pinocíticas já foi relatada em estudos específicos sobre a FHD como uma alteração endotelial (Sahaphong *et al.*, 1980; Bhamarapavati *et al.*, 1989).

O espessamento de septo interalveolar observado neste estudo foi decorrente da intensa migração de células para este local, que passam a compor o interstício em conjunto aos pneumócitos do tipo I e do tipo II. Os estudos histomorfométricos mostraram que septos interalveolares de camundongos infectados com DENV-3 apresentaram-se 2,7 vezes mais espessos que os septos dos camundongos não infectados. As análises histopatológicas revelaram que áreas de maior espessamento estavam acompanhadas por regiões aparentemente normais, fisiológicas e regiões de hiperinsuflação alveolar. Estas observações permitiram duas conclusões. A primeira delas é que áreas de espessamento do septo interalveolar são focais nos pulmões dos camundongos BALB/c infectados, que ainda apresentam regiões sem alteração. A segunda é que regiões com o septo interalveolar com espessura comum à de um controle negativo não necessariamente correlaciona-se a uma condição fisiológica normal: foi observado que as áreas de atelectasia alveolar estavam correlacionadas ao espessamento do septo interalveolar, resultando na restrição de trocas gasosas. A hiperinsuflação alveolar, próxima a essas áreas, representa um mecanismo compensatório para a manutenção da função fisiológica. Isso pode ser algumas vezes

confundindo a uma condição histológica controle, mas configura uma resposta à inflamação e à infecção, indiretamente. Além disso, em alguns casos, a hiperinsuflação alveolar teve como causa o rompimento de septos interalveolares, como mostraram as análises histopatológicas pela coloração resorcina fucsina. Todos esses achados são confirmações de que, em modelo murino, assim como em casos humanos, pode haver o envolvimento do pulmão durante a infecção pelos DENV.

A presença de PSD em pulmão humano já foi demonstrada previamente, em células endoteliais e macrófagos alveolares (Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014). O antígeno viral já foi detectado em macrófagos alveolares, em pneumócitos do tipo II, no endotélio vascular e em monócitos circulando nos vasos sanguíneos (Miagostovich *et al.*, 1997; Jessie *et al.*, 2004, Araújo *et al.*, 2009). A fita complementar do RNA viral, indicativa de replicação viral, já foi identificada em macrófagos alveolares (Póvoa *et al.*, 2014). Em pulmão de camundongos BALB/c, estudos prévios demonstraram o isolamento dos DENV (Barreto *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2006) e PSD foram observadas em retículo endoplasmático rugoso de macrófagos alveolares (Barreto *et al.*, 2007). Neste estudo, o RNA do DENV-3 pôde ser recuperado em 4 das 12 amostras de pulmão de camundongos BALB/c infectados. Embora a média dos títulos encontrados ($2,79 \times 10^4$) fosse menor que o inoculado, a detecção do RNA sugere que houve disseminação viral neste órgão.

A disfunção hepática é um aspecto comum durante a infecção por DENV e o envolvimento do fígado na patogênese da DEN é demonstrado pelo aumento dos níveis das transaminases TGO e TGP, hepatomegalia, icterícia, lesão tecidual e presença de antígenos e RNA do DENV em amostras provenientes de casos humanos (Bhamarapavati & Halstead, 1964; Bhamarapavati, Tuchinda & Boonpucknavik, 1967; Burke, 1968; Kuo *et al.*, 1992.; Kalayanarooj *et al.*, 1997; Miagostovich *et al.*, 1997; Nguyen, Nguyen & Tieu, 1997; Rosen, Khin & Tin, 1989; Rosen, Drouet & Deubel 1999; Wang *et al.*, 1990; Póvoa *et al.*, 2014).

Em relação à hepatomegalia, Halstead e colaboradores (1969) propuseram que esta alteração não apresenta diferenças em infecções primárias ou secundárias pelo DENV, sendo resultado de uma resposta patológica comum na DEN. Entretanto, estudos posteriores demonstram maiores taxas de hepatomegalia em casos de DG (Wahid *et al.*, 2000; Chongsrisawat, Hutagalung & Povorawan, 2009). No presente estudo, não foram observados sinais de hepatomegalia em nenhum dos camundongos analisados, nos

tempos 72 h.p.i, 7 e 14 d.p.i. O peso do fígado também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais analisados.

O padrão bioquímico da lesão hepática em pacientes com DEN é semelhante ao observado em pacientes com hepatite viral aguda, marcado pela elevação acentuada das aminotransferases séricas – AST e ALT (Fernando *et al.*, 2016). A AST e ALT são consideradas indicadores de lesão hepática quando são liberadas na circulação sanguínea. Embora também seja encontrada em baixas concentrações no músculo esquelético, cérebro e intestinos, a ALT é considerada predominantemente uma enzima específica do fígado. Em contraste, a AST é liberada após dano do fígado, músculo estriado cardíaco e esquelético (Ozer *et al.*, 2008). Alguns estudos já demonstraram que pacientes com DG apresentaram níveis de aminotransferases mais altos quando comparados aos pacientes com DF, e o valor médio de AST era significativamente maior do que o de ALT (de Souza *et al.*, 2007; Mohan *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2014), o que provavelmente sugere que outras fontes além do fígado também podem contribuir para o aumento dos níveis séricos de AST.

Diversos estudos relatam que as taxas de elevação de ALT e AST na DEN variaram de 7% a 73% e 11% a 88%, respectivamente (Riaz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016; Fernando *et al.*, 2016). Como demonstrado por Fernando e colaboradores (2016), os níveis das transaminases aumentam durante o curso da DEN, com pico de AST no 6º dia da doença e pico de ALT no 7º dia. Após os picos, os níveis de AST e ALT declinam rapidamente. No presente estudo, de maneira geral, foi observada uma diminuição dos níveis das transaminases ao longo da cinética experimental. No grupo 72 h.p.i, dois animais (22%) apresentaram valores de AST acima da mediana do controle, com um desses animais (11%) também apresentando o único valor de ALT acima da mediana do controle. No grupo 7 d.p.i, somente um animal (9%) apresentou valor de AST acima da mediana do controle e outro animal (9%) apresentou valor de ALT acima da mediana do controle. No grupo 14 d.p.i, dois animais (25%) apresentaram tanto valores de AST quanto de ALT acima da mediana do controle. Tais achados não corroboram os descritos por Paes e colaboradores (2009), que observaram um aumento significativo nos níveis de ambas as transaminases em camundongos BALB/c infectados pelo DENV-2 (n=10), mostrando pico de detecção de ALT no 7º d.p.i e de AST no 14º d.p.i (Paes *et al.*, 2009). Porém, se comparados os valores individuais dos camundongos analisados, a variação do aumento dos níveis de cada transaminase avaliada em cada grupo experimental está inserida dentro da variação observada pelos estudos conduzidos em humanos.

A fosfatase alcalina (FA) não é uma enzima específica do fígado, sendo encontrada em muitos locais além desse, como os ossos, intestinos e placenta. Níveis de FA geralmente encontram-se aumentados nas doenças hepatobiliares, resultando em colestase (Van Hoof & De Broe, 1994). Embora aumento dos níveis de FA já tenham sido descritos em pacientes com DEN (Kumarasena *et al.*, 2016; Iqtadar *et al.*, 2017), outros estudos sugerem que é improvável que ocorra colestase na doença hepática induzida por DEN, uma vez que a elevação da enzima, quando ocorre, é discreta e não ocorre na maioria dos pacientes (Fernando *et al.*, 2016). No presente estudo, foi observada uma diminuição no nível de FA em 72 h.p.i, com elevação máxima em 7 d.p.i e discreta diminuição em 14 d.p.i. Analisando os valores individuais dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental estudado, apenas 1 animal (25%) do grupo 72 h.p.i apresentou valor de FA acima da mediana do controle. Em relação ao grupo 7 d.p.i, quatro animais (80%) apresentaram valores de FA acima da mediana do controle. Por fim, os dois animais analisados do grupo 14 d.p.i apresentaram valores de fosfatase alcalina acima da mediana do controle. Apesar do envolvimento biliar na doença hepática induzida por DEN em humanos não ser considerado significativo, os achados deste estudo sugerem que esta relação deva ser melhor estudada.

O fígado é o principal local de síntese de colesterol em humanos e a taxa de produção depende do seu nível intracelular. Lipoproteínas de alta e baixa densidade, HDL e LDL, são responsáveis pelo transporte do colesterol pela corrente sanguínea (Berg, Tymoczko & Stryer, 2002). Lesões hepáticas causadas pela infecção por DENV podem culminar no desbalanço dos níveis séricos de colesterol, e, de fato, diversos estudos já relataram que níveis séricos de colesterol total, HDL e LDL são significativamente menores em pacientes com DEN em comparação a pacientes saudáveis (Van Gorp *et al.*, 2002; Villar-Ceteno, Díaz-Quijano & Martínez-Vega, 2008; Suvana & Rane, 2009; Seet *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2015). Entre os pacientes positivos para DEN, a redução dos níveis ocorre do 2º para o 6º dia da doença, aumentando do 6º até o 8º dia. Em relação à gravidade da DEN, os níveis séricos de colesterol total foram significativamente menores em pacientes com DG em comparação com DF entre o 5º e 7º dia da doença (Biswas *et al.*, 2015).

O aumento da permeabilidade endotelial, associada à DG, poderia potencialmente permitir o extravasamento de moléculas de colesterol, culminando nos níveis séricos mais baixos (Wills *et al.*, 2004). Outras possíveis explicações para a diminuição do nível de colesterol sérico na DEN, em particular na DG, incluem o acúmulo

no fígado, onde a esteatose é observada, absorção por macrófagos, ou captação por células infectadas pelo DENV, uma vez que o colesterol está envolvido no processo de replicação dos flavivírus (Greenspan, Mao & Gutman, 1997; Lee *et al.*, 2008; Rothwell *et al.*, 2009). No presente estudo, um discreto aumento do nível de colesterol foi observado no grupo 72 h.p.i. Porém, um contínuo declínio dos níveis séricos de colesterol foi observado nos grupos 7 e 14 d.p.i. Analisando os níveis séricos de colesterol individuais de cada camundongo dos grupos experimentais, observou-se que 50% dos animais pertencentes ao grupo 72 h.p.i apresentaram níveis menores que a mediana do grupo controle negativo. No grupo 7 d.p.i, quatro animais (80%) apresentaram valores de colesterol inferiores à mediana do grupo controle negativo. Por fim, um dos dois animais pertencentes ao grupo 14 d.p.i apresentou nível sérico de colesterol inferior à mediana do controle negativo. A redução do nível de colesterol sérico observada neste estudo corrobora a descrita em casos humanos de DEN e aponta para o fato que mais estudos são necessários para entender a dinâmica do colesterol e das lipoproteínas na patogênese da infecção por DEN.

As alterações histopatológicas observadas em pacientes com FHD/SCD revelam que, além da ocorrência de hemorragia e edema, danos causados por alterações metabólicas e/ou inflamatórias, como a presença de esteatose, necrose centrolobular, vacuolização de citoplasma de hepatócitos, hiperplasia de células de Kupffer e áreas com células infiltradas são também encontrados (Burke, 1968; 1997; Huerre *et al.*, 2001; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005). O mecanismo da lesão hepática na DEN ainda não está completamente elucidado e podem incluir o efeito citopático causado pelo vírus; morte das células infectadas mediada pelo sistema imune do hospedeiro e efeitos não específicos relacionados ao choque e à hipotensão (Itha *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2013).

Nas análises de fígado de camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 realizadas neste estudo, diferentes alterações histopatológicas foram observadas e corroboram as pontuadas por Basílio-de-Oliveira (2005), Gulati (2007) e Póvoa (2014) que, a partir de casos humanos, detectaram inclusões lipídicas na região perinuclear de hepatócitos, dilatação de capilares sinusóides, esteatose macro e microgoticular, infiltrado inflamatório no interstício, focos de congestão e degeneração nuclear. O espessamento de mitocôndrias, indicativo de processo apoptótico e reportado em estudos realizados com cultura de células HepG2 (ElBacha *et al.*, 2007) e biópsia de caso fatal de DEN (Póvoa *et al.*, 2014) não pode ser avaliado neste estudo, devido ao estado de preservação do material para análises em MET.

Em modelo murino, o comprometimento hepático, com alterações das funções hepáticas e da morfologia também é observado (Chen *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Jácome, 2015; Sakinah *et al.*, 2016; Rasinhas, 2017). Infiltrado celular, congestão e dilatação de capilares sinusóides, esteatose macro e microgoticular, verificados durante este estudo, já foram previamente reportados (An *et al.*, 1999; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012; Jácome, 2015a; Sakinah *et al.*, 2016; Rasinhas, 2017). Necrose, acúmulo de líquido no capilar, infiltrado inflamatório periportal, sinais de hemorragia e hiperplasia de células de Kupffer (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005; Jácome, 2015a; Rasinhas, 2017) não foram verificados durante este estudo. Em relação aos hepatócitos, foi observada a presença de inclusões semelhantes a lipídeos únicas no citoplasma dessas células, sugestivo de esteatose macrogoticular.

O aumento do número de células sinusoidais, devido à hiperplasia de células de Kupffer e da infiltração de células majoritariamente mononucleares é descrito tanto em casos humanos de DEN quanto em modelos murinos (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2014; Sakinah *et al.*, 2016). Neste estudo, análises histopatológicas sugeriram um aumento de células sinusoidais em fígado de camundongos 72 h.p.i. A análise histomorfométrica, conduzida posteriormente, revelou um discreto aumento da média das células sinusoidais contabilizadas por grupo experimental, porém sem relevância estatística. No entanto, quando o total de células sinusoidais foi comparado entre os campos estudados, a diferença mostrou-se estatisticamente significativa ($\alpha < 0,05$). Uma vez que a análise morfométrica conduzida neste estudo não diferenciou o tipo celular contabilizado, ensaios de imunomarcção prévios à análise histomorfométrica são necessários para elucidar se o aumento das células sinusoidais reflete a hiperplasia de células de Kupffer ou a migração de outros tipos celulares para o espaço sinusoidal.

Estudos conduzidos em camundongos BALB/c a partir de uma infecção primária pelo DENV-2 (Sakinah *et al.*, 2016) e a partir de uma reinfecção DENV-1/DENV-3 (de Almeida, 2018) revelaram aumento no número de hepatócitos binucleados no fígado dos camundongos infectados por esses vírus. Hepatócitos de até quatro ou cinco núcleos foram recorrentes nos camundongos reinfecidos. A binucleação pode ser explicada pela divisão celular com cariocinese completa, mas citocinese incompleta (Guidotti *et al.*, 2003) e/ou fusão homotípica (Faggioli *et al.*, 2008). Embora seja mais comum em

camundongos que em humanos (Hsu *et al.*, 2016), a binucleação de hepatócitos vem sendo associada a um evento patológico (Grizzi & Chiriva-Internati, 2007). No presente estudo, não houve aumento significativo no número de hepatócitos binucleados, quando comparados os grupos controle e 72 h.p.i. Mais estudos são necessários para investigar se a binucleação de hepatócitos está mais associada a infecções secundárias por DENV ou a uma infecção por um sorotipo específico, como o DENV-2.

Através da análise histopatológica, uma das alterações observadas nos hepatócitos e já citada anteriormente foi a presença de inclusões citoplasmáticas únicas, semelhantes a lipídeos, delimitadas por membrana. Na maioria dos casos observados, tais inclusões não provocavam o deslocamento do núcleo. Porém, em casos focais, observou-se um estágio avançado de vacuolização, levando à compressão e/ou deslocamento do núcleo para a periferia celular. Pela análise histopatológica, acredita-se que tais casos tratam-se de um estágio avançado de macroesteatose. Porém, a avaliação morfológica a partir de MET conduzida por Almeida (2018) em fígado de camundongos BALB/c com quadro de reinfecção DENV-1 /DENV-3 revelou que tais estruturas são lisossomos que foram visualizados em diversos tamanhos e nas mais variadas regiões da célula, incluindo a perinuclear, causando distorção física do núcleo. É possível que essas estruturas estejam associadas ao processo de auto-degradação da célula, que passa por colapso não-direcionado do citoplasma até a possível perda total de função e morte celular. Autofagossomos são formados englobando estruturas celulares e, então, fusionam-se a lisossomos e liberam seus conteúdos em compartimentos líticos como parte dos corpos autofágicos de membrana simples (Mizushima, Yoshimori & Levine, 2010).

Além disso, neste estudo foram observadas inclusões nucleares semelhantes às observadas em fígados de camundongos BALB/c 13 d.p.i com DENV-2. Embora descritas por Paes e colaboradores (2005) como inclusões nucleares semelhantes a lipídeos, a natureza dessas inclusões ainda precisa ser investigada.

A presença do DENV já foi verificada em amostras de fígado humano e murino através da detecção do genoma viral, do antígeno viral ou da fita complementar do RNA do vírus (Miagostovich *et al.*, 1997; Barreto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2005, 2009; de Macedo *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014; Jácome, 2015a; Rasinhas, 2017). Neste estudo, a fita positiva RNA do DENV-3 pôde ser detectada em 6 das 17 amostras de fígado de camundongos BALB/c infectados, com média dos títulos igual a $1,60 \times 10^6$ cópias de

RNA/mL. Um animal apresentou título recuperado do fígado superior ao utilizado no inóculo ($2,66 \times 10^7$ cópias de RNA/mL), sugerindo replicação viral neste órgão. A detecção do DENV em amostras de fígado humano através de MET já foi descrita por Limonta e colaboradores (2012) e, embora o RNA do DENV tenha sido detectado, a presença de partículas virais não pôde ser verificada devido à fixação insatisfatória do órgão.

O envolvimento do tecido muscular cardíaco na infecção pelos DENV, apesar de não ser incomum, ainda é pouco estudado (Shivanthan *et al.*, 2015). As manifestações clínicas associadas à DEN podem variar amplamente, desde a bradicardia assintomática a miocardite fatal (Sheetal & Jacob, 2016). Diversos estudos já reportaram taquicardia sinusal, hipotensão, aumento da pressão jugular, alterações do ritmo cardíaco e edema intersticial (Lee, Teo & Low, 2009; Gupta & Gadpayle, 2010; Miranda *et al.*, 2013; Shivanthan *et al.*, 2015; Sheetal & Jacob, 2016). A disfunção sistólica ventricular bilateral também já foi descrita, mas é mais comumente observada em casos de DG (Yacoub *et al.*, 2012). Embora raros, casos de miocardite na infecção pelos DENV estão entre os achados mais comuns observados no tecido cardíaco (Promphan *et al.*, 2004; Weerakoon *et al.*, 2011; Bhasin *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2013; Tahir *et al.*, 2015; Arora & Patil, 2016; Aslam *et al.*, 2016), podendo evoluir para quadros de 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 & Jacob, 2016).

As alterações morfológicas mais comumente reportadas a partir de amostras provenientes de casos humanos de infecção por DENV incluem degeneração das fibras do miocárdio, infiltrado de células inflamatórias mononucleares, sinais de edema intersticial, hemorragia, infiltração de neutrófilos e eosinófilos e degeneração nuclear, com alterações na mitocôndria e presença de núcleos picnóticos (Weerakoon *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2013; Póvoa *et al.*, 2014). Tais alterações não foram verificadas nas análises morfológicas realizadas neste estudo.

Quadros progressivos de cardiomegalia já foram observados em radiografias de pacientes com quadro confirmado de DEN (Lee *et al.*, 2010; Pereda *et al.*, 2015). As análises macroscópicas de coração de camundongos BALB/c infectados pelo DENV-3 72 h.p.i, 7 d.p.i e 14 d.p.i realizadas neste estudo não revelaram sinais de cardiomegalia.

No presente estudo, as análises ultraestruturais a partir de amostras de coração de camundongos BALB/c inoculados com DENV-3 revelaram presença de células

mononucleares e plaquetas no interstício e discreta desorganização de fibras cardíacas e discos intercalares. Ativação de CE e células mononucleares, evidenciada pelo espessamento de citoplasma e emissão de prolongamentos de membrana citoplasmática também foi observada. Tais resultados corroboram os achados de Rasinhas (2013; 2017) e Jácome (2015a) ao estudarem amostras de coração BALB/c infectados por DENV-1, -2, -3 e -4 pela IV. Nesse estudo, entretanto, não foi possível observar rarefação do citoplasma de cardiomiócitos, acúmulo de líquido no capilar, hemorragia, produção de vesículas de transporte e presença de PSD em células endoteliais e cardiomiócitos, como descrito por esses autores.

A presença de células mononucleares no interstício pode sugerir quadro brando de miocardite, resultado direto da infecção pelo DENV ou indireto da ação de citocinas, e/ou mediadores celulares da resposta imune, fatores que podem apresentar importante papel na patogênese da miocardite viral (Pelupessy, Allo & Jota, 1989; Dhan *et al.*, 1990; Kasim *et al.*, 1991; Matsumoria & Sasayama, 1995). 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).

Estudos prévios já confirmaram a presença do DENV em células cardíacas e células endoteliais do coração (Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014; Jácome, 2015a; Rasinhas, 2017) e o antígeno viral foi identificado em células inflamatórias nesse órgão (Miranda *et al.*, 2013; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005). No presente estudo, a presença de PSD em células endoteliais e/ou cardíacas não foi observada e a fita positiva do RNA foi detectada em apenas uma das dezessete amostras de coração testadas, com título igual a $1,89 \times 10^2$.

Em um estudo realizado no Sri Lanka, Kularatne e colaboradores (2005) descreveram três casos de miocardite causada por DENV-3. Embora até o presente momento não haja relatos de manifestações cardíacas em infecções por DENV-1 e DENV-4, é precipitado determinar se um sorotipo específico está preferencialmente associado ao envolvimento cardíaco. Além disso, embora seja postulado que a SCD/FHD ocorra principalmente em infecções secundárias da DEN, não se sabe se o envolvimento cardíaco é mais comum em uma reinfecção por um sorotipo heterólogo. A variabilidade do envolvimento cardíaco entre epidemias é possivelmente um reflexo de

variações na antigenicidade, em relação aos sorotipos e por isso, mais estudos são necessários para estabelecer a relação entre os sorotipos do DENV e o dano cardíaco (Songco *et al.*, 1987; Sheetal & Jacob, 2016).

Diversas formas de comprometimento renal têm sido identificadas em pacientes com DEN, incluindo a síndrome renal aguda, necrose tubular aguda, síndrome urêmica hemolítica, proteinúria, glomerulopatia e síndrome nefrótica (Horvath, McBride & Hanna, 1999; Lombardi *et al.*, 2008). A insuficiência renal aguda é uma complicação potencial da DG e, embora seja mal estudada, apresenta uma alta taxa de mortalidade (Lizarraga & Nayer, 2014; Oliveira & Burdmann, 2015). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a etiopatogenia da insuficiência renal aguda induzida pela infecção por DENV, incluindo a ação direta do vírus, instabilidade hemodinâmica, rabiomiólise, hemólise e lesão glomerular aguda (Lima & Nogueira, 2008). As análises histopatológicas realizadas neste estudo revelaram diversos estágios da atrofia glomerular, desde glomérulos atrofícos ao lado de glomérulos normais até áreas com ausência de glomérulos. A histomorfometria corroborou os achados histopatológicos e, embora não estatisticamente significativo, camundongos BALB/c infectados pelo DENV-3 72 h.p.i apresentaram área glomerular menor que o grupo de camundongos não infectados. Além da lesão glomerular, sinais de lesão tubular primária também foram observados, caracterizados pela presença de vacúolos citoplasmáticos e figuras mitóticas em células dos túbulos contorcidos proximais.

A elevação dos níveis de creatinina e uréia séricas também já foi associada à DEN, podendo ser observada em até 23% dos pacientes. (Horvath, McBride & Hanna, 1999; Lombardi *et al.*, 2008; Rashmi, 2015). No presente estudo, uma discreta elevação do nível de creatinina sérica também foi observada em camundongos BALB/c infectados pelo DENV-3 em 72 h.p.i e 7 d.p.i, com diminuição discreta em 14 d.p.i. Analisando os valores individuais dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental estudado, todos os animais pertencentes aos grupos 72 h.p.i e 7 d.p.i apresentaram níveis de creatinina acima da mediana do controle negativo. No grupo 14 d.p.i, um dos dois animais analisados apresentou nível de creatinina acima da mediana do controle. Em relação à ureia, os grupos 72 h.p.i e 7 d.p.i apresentaram diminuição dos níveis desta substância em relação ao grupo controle negativo (animais não infectados). Já o grupo 14 d.p.i apresentou um aumento do nível de ureia em relação ao grupo controle negativo. Quando analisados os valores individuais de cada camundongo, dois animais pertencentes ao grupo 72 h.p.i (25%) e 7 d.p.i (20%) apresentaram níveis de ureia

superiores à mediana do controle negativo. No grupo 14 d.p.i, um dos dois animais apresentou níveis de ureia superiores à mediana do controle. Analisando o peso do órgão, foi observado um aumento estatisticamente significativo quando a mediana do controle foi comparada à mediana de cada um dos pontos da cinética experimental (72 h.p.i, 7 e 14 d.p.i). O aumento de peso deste órgão pode ser reflexo do exsudato presente no interstício, que por sua vez é consequência do aumento da permeabilidade vascular.

Ao contrário de Atrasheuskaya e colaboradores (2003) que não observaram alterações morfológicas em amostras de rim de camundongos BALB/c infectados por DENV-2, as análises morfológicas realizadas no presente estudo revelaram distúrbios circulatórios e danos no parênquima, caracterizados pela presença de infiltrado inflamatório, congestão vascular e células intersticiais apresentando dilatação do RER e núcleos picnóticos. Tais achados corroboram aos observados em amostras provenientes de casos de óbito por DEN em humanos (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Laoprasopwattana *et al.*, 2010; Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014; Pagliari *et al.*, 2016). Focos de hemorragia e trombos nos capilares glomerulares, apesar de já terem sido descritos (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014), não foram verificados durante este estudo.

Embora sinais de replicação viral (presença da proteína NS3 ou da fita negativa do RNA viral) não terem sido observados, o antígeno viral já foi detectado por imunohistoquímica em células inflamatórias, macrófagos e monócitos circulantes (Jessie *et al.*, 2004; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2014). Neste estudo, o genoma viral foi detectado em três das dezessete amostras testadas e a média dos títulos foi igual a $4,17 \times 10^5$ cópias de RNA/mL. Além disso, partículas semelhantes em diâmetro e morfologia aos DENV foram observadas em célula intersticial. Apesar de Boonpucknavig e colaboradores (1976) terem descrito a presença de PSD em amostras de biópsia renal, ensaios de imunomarcção deverão ser realizados para a confirmação de que as partículas observadas são de fato DENV.

Diversos estudos sugerem que CE desempenham papel importante na patogênese da FHD (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Dalrymple & Mackow, 2012) e trabalhos prévios em cultura celular demonstraram que os DENV modulam a função de CE por ação direta e/ou indireta (Avirutnan *et al.*, 1998; Rothman & Ennis, 1999; King *et al.*, 2000). De acordo com Feroze (1997), a presença de um grande número de vacúolos endocíticos e prolongamentos de membrana em CE podem ser indicativos de ativação das mesmas. De fato, durante o curso da infecção, CEs são ativadas e contribuem

diretamente para patogênese, a partir de mecanismos que envolvem o aumento da viremia, secreção de citocinas, ativação e interação com diversos tipos celulares, incluindo plaquetas e leucócitos (Butthep, Bunyaratvej & Bhamarapravati, 1993; De Azeredo, Monteiro & de-Oliveira Pinto, 2015). Sugere-se que estas células são permissíveis à replicação de DENV, como demonstrado por estudos em modelo murino e em amostras de pacientes (Jessie *et al.*, 2004; Zellweger, Prestwood & Shresta, 2010; Dalrymple & Mackow, 2012) e liberam diversos mediadores inflamatórios, como a IL-8 e RANTES (Avirutnan *et al.*, 1998, Juffrie *et al.*, 2000). Essas substâncias são capazes de recrutar neutrófilos e promover o aumento da permeabilidade vascular. Neste trabalho, CE de capilares sanguíneos no pulmão e coração exibiram prolongamentos de membrana citoplasmática, espessamento de citoplasma e produção de vesículas de transporte. A adesão e interação de plaquetas e endotélio também foi observada, em pulmão e rim.

O envolvimento do baço durante a infecção pelos DENV já foi reportado (Gulati & Maheshwari, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Esplenomegalia e ruptura esplênica espontânea são manifestações raras que já foram verificadas em pacientes com DEN. O baço encontra-se frequentemente congestionado em casos de FHD e hematoma subcapsular é observado em 15% dos casos de óbito (Gulati & Maheshwari, 2007; de Moura Mendonça *et al.*, 2011; Bhaskar & Moorthy, 2012; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Neste estudo, não foram observados sinais de hematoma subcapsular ou qualquer outra alteração macroscópica nos baços analisados. O peso do órgão também apresentou mediana constante, apresentando aumento discreto apenas em 14 d.p.i. Há na literatura, descrição de casos humanos de DEN onde o vírus pode ser detectado em células do baço (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014). Experimentos realizados em camundongos infectados experimentalmente pelo DENV-2, Shresta (2006) isolou o DENV e quantificou o genoma viral a partir de amostras de baços, reportando títulos entre 10^2 e 10^4 PFU/mL. Jácome (2015b), a partir de estudos realizados em camundongos BALB/c também infectados pelo DENV-2, reportou títulos entre $1,46 \times 10^{-1}$ PFU/ml e $3,32 \times 10^4$ PFU/ml. Um título de $5,00 \times 10^{12}$ PFU/ml (superior ao inóculo) foi detectado em um camundongo inoculado através da via IP com a Linhagem I do DENV-2. No presente estudo, o genoma viral foi detectado em três amostras de baço de camundongo BALB/c infectado com DENV-3, apresentando média de títulos recuperados igual a $5,89 \times 10^{10}$ cópias de RNA/mL. Duas das três amostras positivas

apresentaram títulos de RNA superiores ao título utilizado no inóculo, sugerindo replicação viral neste órgão.

Durante a infecção primária em humanos, a circulação do DENV pode ser detectada no sangue periférico já antes do aparecimento dos primeiros sintomas. A viremia tem duração média de 5 dias, com o último dia coincidindo com o início da fase febril (Vaughn *et al.*, 1997, 2000). Estudos realizados em camundongos relataram a detecção da viremia entre o 2º e o 11º dias após a infecção (Atrasheuskaya, 2003; Paes *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2006; Shrestha, 2006). Jácome (2015a), ao realizar a detecção da viremia em camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-2, obteve positividade em apenas quatro amostras de soro. Uma dessas amostras apresentou título de $1,0 \times 10^{13}$ cópias de RNA/mL, título este superior ao título detectado no inóculo utilizado para infectar os animais ($1,09 \times 10^7$ cópias de RNA/ml), sugerindo replicação viral.

Neste trabalho, as amostras de soro de camundongos BALB/c analisadas foram coletadas 72 h.p.i pelo DENV-3. O genoma viral pôde ser detectado em apenas duas das cinco amostras de soro testadas. Os títulos encontrados foram iguais a $4,24 \times 10^1$ e $1,96 \times 10^1$ cópias de RNA/mL. Nestes mesmos dois animais, a fita positiva do RNA foi detectada em rim e baço, sugerindo a disseminação viral em diferentes órgãos. Em um desses animais, os títulos de RNA recuperados do rim e baço foram superiores ao detectado no soro ($2,39 \times 10^2$ e $7,06 \times 10^6$, respectivamente). É possível relacionar os baixos títulos recuperados ao curto período de tempo entre a infecção e a eutanásia, que foi de 72h, tempo este estabelecido através de estudos prévios realizados por Barreto e colaboradores (2007), nos quais uma cinética foi aplicada e notou-se que neste tempo as alterações teciduais eram mais evidentes. Pode-se especular ainda que a quantidade reduzida de amostras positivas pode estar relacionada ao fato de que os DENV estejam infectando neste tempo as células dos diferentes órgãos.

Os espécimes clínicos mais utilizados no diagnóstico da infecção por DENV são o sangue total, plasma, soro e, em alguns casos, o líquido cefalorraquidiano e o leite materno. Porém, mais recentemente, diversos trabalhos vêm descrevendo com sucesso o uso da saliva e da urina como amostras não invasivas para o diagnóstico de DEN (Niedrig *et al.*, 2018).

Estudos relatam a detecção de anticorpos (IgA, IgG e IgM) específicos para DENV na saliva de pacientes infectados (Cuzzubbo *et al.*, 1998; Balmaseda *et al.*, 2003; Yap *et al.*, 2011; Anders *et al.*, 2012; Andries *et al.*, 2016). Em relação à detecção do genoma viral, Andries e colaboradores (2016) analisaram um grupo de 562 casos confirmados de

DEN, dos quais 132 apresentaram o RNA do DENV na saliva. Outro estudo, conduzido por Poloni e colaboradores (2010), também identificou a fita positiva do RNA do DENV na saliva de pacientes sintomáticos, infectados pelo DENV-2 e DENV-3.

Até o momento, há somente um relato de detecção do genoma do DENV em saliva de camundongos. Neste estudo, conduzido por Rasinhas e colaboradores (2018), foram analisadas 15 amostras de saliva de camundongos infectados pelo DENV-4, das quais duas apresentaram positividade pela técnica da qRT-PCR. Os títulos recuperados foram iguais a $5,76 \times 10^9$ e $8,41 \times 10^9$ cópias de RNA/mL. No presente estudo, a fita positiva do RNA viral pode ser recuperada de três das cinco amostras de saliva testadas. Os títulos variaram entre $1,16 \times 10$ e $6,26 \times 10^7$ cópias de RNA/mL e, este último título, mostrou-se superior ao título utilizado para as inoculações experimentais, sugerindo replicação viral.

O uso de amostras de urina mostra-se útil no diagnóstico da infecção pelo vírus do Nilo Ocidental e pelo vírus Zika, ambos flavivírus, uma vez que o genoma desses podem ser detectados na urina por mais tempo que no soro (Barzon *et al.*, 2013; Gourinat *et al.*, 2015) e partículas infecciosas também podem ser recuperadas do fluido em questão (Barzon *et al.*, 2014; Papa, Testa & Papadopolou, 2014; Fonseca *et al.*, 2014). Estudos conduzidos em pacientes com DEN revelaram que amostras de urina podem ser utilizadas para o diagnóstico da DEN, a partir detecção de IgG, IgA, NS1 e RNA viral (Chuansumrit *et al.*, 2011; Hirayama *et al.*, 2012; Andries *et al.*, 2016; Niedrig *et al.*, 2018). Neste trabalho, nenhuma das amostras de urina testadas foi positiva para a detecção do RNA do DENV-3. Apesar de poucas amostras terem sido testadas, uma possível explicação para este resultado negativo é que, em humanos, a liberação dos DENV na urina ocorre de maneira tardia, entre o 8º e 18º dia pós infecção, momento em que as amostras pareadas de soro apresentam resultados negativos na detecção do genoma viral (Ma *et al.*, 2014).

Neste estudo, camundongos BALB/c imunocompetentes, quando inoculados com cepa de DENV-3 epidêmica e não neuroadaptada, apresentaram alterações teciduais semelhantes às observadas em casos humanos de DEN e mostraram-se susceptíveis ao DENV-3, com a presença do genoma viral detectada em todos os órgãos testados por RT-PCR em tempo real e identificação de PSD em célula intersticial renal. Além da detecção em amostras de macerado de órgãos, o RNA do DENV-3 pôde ser encontrado no soro e saliva de camundongos infectados, apesar da baixa viremia. Discretas alterações bioquímicas e significativas alterações de hemograma também foram

observadas. Por fim, mais estudos são necessários buscando um maior entendimento da fisiopatogenia do DENV-3.

7. Sumário de resultados e conclusão

- Camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 apresentaram aumento estatisticamente significativo de temperatura quando comparados com animais não infectados;
- Camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 não sofreram alteração de peso corporal estatisticamente significativa quando comparados com animais não infectados; A infecção pelo DENV-3 não induziu alterações significativa no peso da maioria dos órgãos dos camundongos, independente do ponto da cinética avaliado. Porém, o aumento significativo do peso dos rins de camundongos infectados pelo DENV-3 pode indicar extravasamento plasmático para o parênquima renal;
- Não foram observados sinais clínicos como diarreia, petéquias e tremores nos camundongos infectados pelo DENV-3, independente do ponto de cinética avaliado. Porém, camundongos 72 h.p.i pertencentes ao grupo de análises por microscopia de campo claro apresentaram eriçamento de pelo, possivelmente reflexo do aumento de temperatura causado pela infecção;
- A infecção pelo DENV-3 em camundongos BALB/c resultou em uma diminuição dos níveis das transaminases AST e ALT ao longo da cinética experimental, dados que não corroboram os descritos na literatura, tanto em humanos quanto em modelos murinos;
- A infecção pelo DENV-3 causou discretas alterações bioquímicas em alguns camundongos infectados pelo DENV-3 ao longo da cinética experimental, como o aumento do nível de fosfatase alcalina, diminuição do nível de colesterol, aumento da creatinina sérica e ureia;
- Em relação ao hemograma, a infecção pelo DENV-3 levou a alterações relevantes no hematócrito, contagem de hemácias e contagem de plaquetas dos camundongos infectados pelo DENV-3. Apesar de não ter apresentado significância estatística, a diminuição da contagem de leucócitos também foi observada ao longo da cinética experimental;
- Não foram observadas diferenças no perfil induzidas por DENV-3 em pulmão e fígado de camundongos infectados, quando comparado com estudos prévios realizados pelo LMMV com cepas de DENV-1, DENV-2 e DENV-4;
- Alterações morfológicas, bem como a presença de PSD em célula intersticial renal foi observada em amostras de rim de camundongos BALB/c infectados pelo DENV-3, ao contrário de outro estudo utilizando o mesmo modelo, no qual não foram observadas alterações neste órgão;

- Alterações morfológicas cardíacas em camundongos BALB/c 72 h.p.i pelo DENV-3 mostraram-se muito discretas, quando comparadas às observadas por outros estudos conduzidos pelo LMMV, com DENV-2 e DENV-4;
- O genoma viral foi detectado em todos os órgãos testados por RTqPCR e o maior título observado foi no baço de um dos camundongos. Como a via de inoculação utilizada foi a intravenosa, sugere-se que houve disseminação viral. Alguns títulos recuperados foram superiores ao inóculo utilizado, sugerindo replicação viral;
- Em relação à viremia, o genoma viral pode ser recuperado de somente duas das cinco amostras testadas, com títulos muito baixos. Porém, três das cinco salivas testadas apresentaram positividade para o RNA do DENV-3, com uma dessas amostras apresentando título sugestivo de replicação viral. Nenhuma das urinas testadas apresentou positividade para o genoma viral e, tal resultado, pode estar diretamente relacionado ao tempo de coleta do material (72 h.p.i);

Através deste trabalho e dos resultados apresentados, pode-se concluir que parte dos camundongos BALB/c foi susceptível à cepa de DENV-3 epidêmica e não neuroadaptada utilizada na infecção experimental, apresentando aumento de temperatura retal; alterações histopatológicas, ultraestruturais e de hemograma semelhantes às observadas em casos humanos de DEN e detecção do genoma viral nos órgãos, saliva e soro, podendo ser utilizado como modelo animal para estudos da fisiopatologia da infecção pelo DENV.

8. Perspectivas

- Realizar nova experimentação animal, a fim de padronizar um protocolo de fixação para obtenção de amostras de fígado para análises ultraestruturais satisfatórias e aumentar o quantitativo das amostras para análises bioquímicas e de hemograma;
- Coletar amostras de urina de camundongos BALB/c 7d.p.i e 14 d.p.i para detecção do genoma viral a partir de RTqPCR;
- Realizar ensaios de imunomarcção a fim de identificar a presença da proteína NS3 (indicativa de replicação viral) em diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com o DENV-3;
- Realizar testes imunoenzimáticos e de imunomarcção, a fim de detectar e dosar citocinas no soro e em órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com o DENV-3;
- Fenotipar a população celular sinusoidal, a fim de demonstrar a causa do aumento dessas células em camundongos infectados pelo DENV-3;
- Verificar a presença de PSD em células de diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados pelo DENV-3, através da técnica de imunomicroscopia;
- Realizar estudos histopatológicos e ultraestruturais nas glândulas salivar e submandibular de camundongos BALB/c, a fim de investigar alterações morfológicas provocadas pela infecção pelo DENV-3;
- Realizar análises citoquímicas em amostras de fígado de camundongos BALB/c, a fim de investigar a causa da binucleação e da degeneração hepatocitária observada em camundongos BALB/c infectados pelo DENV-3.

9. Referências Bibliográficas

- Aggarwal A, Kumar P, Faridi MMA. Neurological manifestation as presenting feature of dengue infection. *J Pediatr Neurosci*. 2015; 10(1): 76–77.
- Ahmed A, Alvi AH, Butt A, Nawaz AA, Hanif A. Assessment of dengue fever severity through liver function tests. *J Coll Physicians Surg Pak* 2014; 24(9), 640-644.
- Ahsan J, Ahmad SQ, Rafi T. Postmortem Findings in Fatal Dengue Haemorrhagic Fever. *JCPSP* 2018; 28(6), S137-S139.
- Akkina R. New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects. *Virology*; 2013; 435:14–28.
- Alcaraz-Estrada SL, Manzano MI, Del Angel RM, Levis R, Padmanabhan R. Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature- sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5. *J Gen Virol*. 2010;91(11):2713-8.
- Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. Selective expansion of high- or low- avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(9):4102-7.
- Amaral DCG, Rachid Ma, Vilela MC, Campos RDL, Ferreira GP, Rodrigues DH, *et al*. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. *Journal of Neuroinflammation* 2011; 8:23.
- Amorim JH, Alves R, Boscardin S.B, Ferreira L. The dengue virus nonstructural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res* 2014; 181:53-60.
- An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, Yasui K. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology* 1999; 263(1): 70-7.
- Anders KL, Nguyet NM, Quyen NT, Ngoc TV, Tram TV, Gan TT *et al*. 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, Ong S, Ros S, Sakuntabhai A, Horwood P, Dussart P, Buchy P. Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens. *BMC Infect Dis*. 2016;16:201
- ANVISA. Nota Informativa Nº 13/2018-CGPNI/DEVIT/SVS/MS - Vacina Dengue Dengvaxia®, 2018.
- Araújo FM, Nogueira RM, de Araújo JM, Ramalho IL, Roriz ML, de Melo ME, Coelho IC. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(8): 925-8.
- Araújo JM, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Zanotto PM, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol* 2009; 9(4): 71625.

Ariën KK, Wilder-Smith A. Dengue vaccine: reliably determining previous exposure. *The Lancet. Global Health*, 2018; v. 6, n. 8, p. e830–e831.

Ashour J, Morrison J, Laurent-Rolle M, Belicha-Villanueva A, Plumlee CR, BernalRubio, D et al. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. *Cell Host Microbe* 2010; 8(5): 410-21.

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

Ault S, Bezerra H, Barbiratto SB, de Resende MC, Castellanos LG, Cerezo L, Kleber G.L. The Decline of Dengue in the Americas in 2017: Discussion of Multiple Hypotheses. *Tropical Medicine & International Health* 2019.

Avirutnan P, Malasit B, Seliger S, Bhakdi P, Husmann M. C. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol* 1998; 161:6338–6346.

Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol* 1998; 161, 6338 – 6346.

Azeredo ELD, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM.. Thrombocytopenia in dengue: interrelationship between virus and the imbalance between coagulation and fibrinolysis and inflammatory mediators. *Mediators of inflammation* 2015;

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

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

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

Barreto DF, Schatzmayr HG, Takiya CM, Jácome FC, Silva MEV, Faria NRC et al. Histopathological and ultrastructural studies of lung tissue of mice reinfected with dengue virus serotype 1 or 2. *Virus Reviews and Research* 2009; 14: 21-32

Barreto DF, 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), 44-51.

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

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

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

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis.* 2013; 208: 1086–1092. 23821721

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, et al. Isolation of West Nile virus from urine of patients with acute infection. *J Clin Microbiol.* 2014.

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

Basuki PS, Budiyo, Puspitasari D, Husada D, Darmowandowo W, Ismoedijanto, et al. Application of revised dengue classification criteria as a severity marker of dengue viral infection in Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2010; 41, 1088–1094.

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

Berg J, Tymoczko J, Stryer L. The Complex Regulation of Cholesterol Biosynthesis Takes Place at Several Levels. *Biochemistry* 2002; New York: WH Freeman.

Bhamarapavati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1967; v. 61, n. 4, p. 500–510.

Bhamarapavati, N. Homostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 1989; S826- 829.

Bhamarapavati, N. Pathology of dengue haemorrhagic fever. In P Thong-charoen, *Monograph on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever*. WHO-SEARO 1993; 22:72-79.

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

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

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496(7446): 504-7.

Biswas HH, Gordon A, Nuñez A, Perez MA, Balmaseda A, Harris E. Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Associated with Severe Dengue Outcome. *PLoS neglected tropical diseases* 2015; 9(9), e0003904.

Blaney JE Jr, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Targeted mutagenesis as a rational approach to dengue virus vaccine development. *Curr Top Microbiol. Immunol.* 2010; 338, 145–158.

Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 2010; 87(2), 125–148.

Boonpucknavig V, Bhamarapavati N, Boonpucknavig S, Futrakul P, Tanpaichitr P. Glomerular changes in dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med* 1976; 100:206–212.

Boonpucknavig V, Bhamarapavati N, Boonpucknavig S, Futrakul P, Tanpaichitr P. Glomerular changes in dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med* 1976;100:206–12.

Boonpucknavig V, Soontornniyomkij V. Pathology of renal diseases in the tropics. *Semin Nephrol* 2003; 23:88–106.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6:e1760.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002. 20p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176).

Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 172-180.

Burke, T. Dengue haemorrhagic fever: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1968; 62: 682–692.

Butthep P, Bunyaratvej A, Bhamarapavati N. Dengue virus and endothelial cell: a related phenomenon to thrombocytopenia and granulocytopenia in dengue hemorrhagic fever. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 1993; 24, 246-249.

Byk LA & Gamarnik AV. Properties and functions of the dengue virus capsid protein. *Annual review of virology*, 2016, 3, 263-281.

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.

Cao-Lormeau VM. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology Journal* 2009; 6, 35

Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHM, Chotpitayasunondh T, Chua MN et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014; v. 384, n. 9951, p. 1358–1365.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/>. Acesso em 30 out. 2018

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

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

Chongsrisawat V, Hutagalung Y, Poovorawan Y. Liver function test results and outcomes in children with acute liver failure due to dengue infection. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2009; 40:47-53

Christie J. Remarks on "Kidinga Pepo": A Peculiar Form of Exanthematous Disease. *Br Med J* 1872; v. 1, n. 596, p. 577-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20746649>

Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71(4):467–9.

Clark KB, Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Roback J, Villinger F, et al. Multiploid CD61+ cells are the pre-dominant cell lineage infected during acute dengue virus infection in bone marrow. *PLoS One*. 2012; 7:e52902.

Clark KB, Onlamoon N, Hsiao HM, Perng GC, Villinger F. Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? *Front. Microbiol* 2013; 4, 305.

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

Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JL et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* 2006; 24(2): 195-205.

Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction, *Am. J. Pathol* 2013. 182, 1950–1961.

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

Cummings DA. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science* 2016; v. 353, n. 6303, p. 1033–1036.

Cunha RV; Nogueira RMR. Dengue e Dengue Hemorrágico.. In: Coura JR (ed). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara. p. 1767- 1781. 2005.

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; 36(12):3737-9.

Dalrymple NA & Mackow ER. Roles for Endothelial Cells in Dengue Virus Infection. *Advances in Virology* 2012; 8(8): e840654.

Dayan GH, Garbes P, Noriega F, de Sadovsky ADI, Rodrigues PM, Giuberti C et al. Immunogenicity and safety of a recombinant tetravalent dengue vaccine in children and adolescents ages 9-16 years in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2013; 89(6): 1058–1065.

de Almeida RR, Paim B, de Oliveira SA, Souza AS, Gomes ACP, Escuissato DL *et al*. Dengue Hemorrhagic Fever: A State-of-the-Art Review Focused in Pulmonary Involvement. *Lung* 2017; 195(4): 389-395.

De Maio FA, Risso G, Iglesias NG, Shah P, Pozzi B, Gebhard LG et al. The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. *PloS Pathog*. 2016; 12: 1–29.

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

De Oliveira BCEPD. Funcionalidade dos componentes estruturais da quimera viral: flavivírus-mixovírus. 2004. 96f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

De Simone TS, Nogueira RMR, Araújo ESM, Guimarães FR, Santos FBD, Schatzmayr HG et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98(9): 553-62.

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

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

Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*. 2000; 74(17):7814–23.

Dos Santos FB, FILIPPIS A, Araújo ESM, Lima MDRQ, NOGUEIRA F, Faria NR. A review on dengue diagnosis and epidemiology by a regional reference laboratory from 1986 to 2011, Rio de Janeiro, Brazil. *Dengue Bulletin World Health Organization South-East Region Western Pacific Region* 2013; 37: 61-76.

Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Nat Acad Sci USA* 2010;107(39):16922-7.

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

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

El Sahili A & Lescar J. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses*, 2017; 9(4): 91.

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

Eram S, Setyabudi Y, Sadono TI, Sutrisno DS, Gubler DJ, Sulianti Saroso J. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. II. Clinical Studies. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 711-716.

Erbel P, Schiering N, Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2006; 13(4): 372–373.

Faggioli F, Sacco MG., Susani, L., Montagna, C, Vezzoni P. Cell fusion is a physiological process in mouse liver. *Hepatology* 2008; 48 (5): 1655–1664.

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

Ferguson NM, Rodríguez-Barraguer I, Dorigatti I, Mier-y-Teran-Romero L, Laydon DJ et al. 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 CT, Madusanka SD, Dissanayake H, Jeewandara C, Peiris H, Ogg GS et al. Patterns and causes of liver involvement in acute dengue infection. *BMC infectious diseases* 2016; 16: 319.

Feroze NG. Ultrastructural Pathology on the Cell and Matrix. Ed. Buterworths 1997, 4th ed., p. 619-1414

Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drebot M, MacDonald J, Pabbaraju K, et al. First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91: 1035–1038.

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

Futrakul P, Poshyachinda V, Mittrakul C, Kun-Anake C, Boonpucknavig V, Boompucknavig S, Bhamarapravati N. Renal involvement and reticulo-endothelial- system clearance in dengue hemorrhagic fever, *J. Med. Assoc. Thai* 1973; 56: 33–39

Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 910–13.

Gil L, Martinez G, Tapanes R, Castro O, Gonzalez D, Bernardo L et al. Oxidative stress in adult dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(5):652–7.

Gonçalves D, Prado RQ, Xavier EA, de Oliveira NC, Guedes PMM, da Silva JS, et al. Immunocompetent Mice Model for Dengue Virus Infection. *Sci Wld J* 2012; .525947

Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(10): 3889–3897.

Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21: 84–86.

Greenspan P, Yu H, Mao F, Gutman RL. Cholesterol deposition in macrophages: foam cell formation mediated by cholesterol-enriched oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1997; 38: 101–109.

Grizzi F, Chiriva-Internati M. Human binucleate hepatocytes: are they a defence during chronic liver diseases? *Med. Hypotheses* 2007; 69 (2): 258–261.

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

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

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

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

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

Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J. Biol. Chem* 2003; 278 (21), 19095–19101.

Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *Journal of Virology* 2001; v. 75, n. 16, p.7290–7304.

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

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

Gutierrez G, Standish K, Narvaez F, Perez MA, Saborio S, Elizondo D, Harris E.. Unusual Dengue Virus 3 Epidemic in Nicaragua, 2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2011; 5(11): e1394

Guy B & Jackson N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nature Reviews. Microbiology* 2016; 14(1): 45–54.

Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*, 2010; 28(3): 632–649.

Guzman MG & Harris E. Dengue. *Lancet* 2015; 385: 453–65.

Guzmán MG & Kourí G. Dengue: an update. *The Lancet. Infectious Diseases* 2002; 2(1): 33–42.

Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* 2013; 158: 1445–1459.

Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: A retrospective seroepidemiologic study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1990; 42(2):179-84.

Guzmán MG, Peláez O, Kourí G, Quintana I, Vázquez S, Pentón M, Avila LC. Grupo Multidisciplinario para el Control de la Epidemia de Dengue 2001-2002. [Final characterization of and lessons learned from the dengue 3 epidemic in Cuba, 2001-2002]. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 19(4):282-9.

Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead B. Dengue infection. *Nature reviews Disease primers* 2016; 2:16055.

Hadinegoro SRS. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatrics and International Child Health* 2012; 32(1): 33–38.

Halstead SB & Cohen SN. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. *Microbiol mol biol rev* 2015; v. 79, n. 3, p. 281–291.

Halstead SB, Nimmannitya S, Margiotta MR. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. II. Observations on disease in outpatients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1969; 18:972-983.

Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239 (4839): 476–481.

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

Halstead SB. Which Dengue Vaccine Approach Is the Most Promising, and Should We Be Concerned about Enhanced Disease after Vaccination? There Is Only One True Winner. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2018; v. 10 (6).

Halstead, S.B. Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses. *Advances in Virus Research: Academic Press*; 2003. p. 421-67.

Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* 1960, 131 (3407): 1102-3.

Harris E, Videz E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez ML. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63(1-2):5-11.

Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol* 2001, 4 (4): 450-5.

Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31(4):830-6.

Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T et al. Detection of dengue virus genome in urine by realtime reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(6):2047–51.

Hober D, Delannoy AS, Benyoucef S, Groote DD, Wattré P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengueinfected patients. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 569-573.

Horstick O, Farrar J, See L, Kroeger A, Martinez E, Jaenisch T et al. Comparing the usefulness of the 1997 and 2009 WHO dengue case classification: a systematic literature review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2014; 91 (3): 621–634.

Horvath R, McBride WJH, Hanna JN. Clinical features of hospitalized patients during dengue-3 epidemic in far North Queensland 1997–1999. *Dengue Bull* 1999; 23: 24–29

Hotta S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J Infect Dis* 1952; 90 (1): 1-9.

Hoving JC, Wilson GJ, & Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular microbiology*, 2016, 16(2), 185-94.

Hsu SH, Delgado ER, Otero PA, Teng KY, Kutay H, Meehan KM et al. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology* 2016.

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

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

Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch* 2001; 438: 107–115.

Idrisinghe KAP. Histopathological study of dengue haemorrhagic fever. *J Diagn Pathol* 2013; 50–58

Iqtadar S, Akbar N, Huma N, Randhawa FA. Profile of hepatic involvement in dengue infections in adult Pakistani population. *Pak J Med Sci.* 2017;33(4):963-967.

Itha S, Kashyap R, Krishnani N, Saraswat VA, Choudhuri G, Aggarwal R. Profile of liver involvement in dengue virus infection. *National Medical Journal of India* 2005; 18(3), 127.

Jácome FC. Análise de viremia e ultraestrutural de linhagens do vírus dengue tipo 2 (DENV-2) em camundongos BALB/c . 2015a. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

Jácome FC, dos Santos FB, Rasinhas AC, Silva MAN, Nunes PG, Barth OM, Barreto DF. Heart Compromise and Detection of Dengue Virus-Like Particles in Cardiac Tissue of Experimentally Infected Murine Model. *International Journal of Research Studies in Biosc* 2015b; 3: 101-109.

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

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

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

John DV, Lin YS, Perng GC. Biomarkers of severe dengue disease - a review. *Journal of biomedical science* 2015; 22: 83.

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

Jones CT, Patkar CG, Kuhn RJ. Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 2005; 331: 247-259.

Juffrie M, Meer DM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo Veerman AJ, Thijs LG. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun* 2000; 68: 702-707.

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

Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *The Lancet. Infectious diseases* 2017; 17(3): e88-e100.

Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J.Virol* 2001; 75: 6719-6728

Khunchai S, Junking M, Suttitheptumrong A, Kooptiwut S, Haegeman G, Limjindaporn T et al. NF-κB is required for dengue virus NS5-induced RANTES expression. *Virus Research* 2015; 197: 92–100.

Killen H. & O’Sullivan MA. Detection of dengue virus by in situ hybridization. *J. Virol. Methods* 1993; 41:135–146.

King CA, Marshall JS, Alshufara H, Anderson R. Release of vasoactive cytokines by antibody enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J. Virol* 2000; 74: 7156 – 7160.

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

Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL 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. *The J of Inf Dis* 2015; 212 (5): 702–710.

Knight KL & Stone A. A catalog of the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae). *Foundation TTS* 1977; 6: 611.

Koraka P, Benton S, van Amerongen, G, Stittelaar KJ, Osterhaus AD. Efficacy of a live attenuated tetravalent candidate dengue vaccine in naive and previously infected cynomolgus macaques. *Vaccine* 2007; 25: 5409–5416.

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 AS, 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 & Publ Hlth* 2005; 36: 686-692.

Kularatne SAM, Imbulpitiya IVB, Abeysekera RA, Waduge RN, Rajapakse RPVJ, Weerakoon KGA. Extensive haemorrhagic necrosis of liver is an unpredictable fatal complication in dengue infection: a postmortem study. *BMC Infec Dis* 2014; 14: 14.

Kumar N, Gadpayle AK, Trisal D. Atypical Respiratory complications of dengue fever. *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6:839–840

Kumarasena RS, Niriella MA, Ranawaka CK, Miththinda JKND, De Silva AP, Dassanayaka AS, et al.. Predicting acute liver failure in dengue infection. *Ceylon Medical Journal*. 2016;61(1):35–6.

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

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

Laoprasopwattana K, Pruekprasert P, Dissaneewate P, Geater A, Vachvanichsanong P. Outcome of dengue hemorrhagic fever-caused acute kidney injury in Thai children. *J Pediatr* 2010; 57: 303–9.

Larreal Y, Valero N, Estévez J, Reyes I, Maldonad M, Espina LM, Arias J, Meleán E, Añez G, Atencio R. Hepatic alterations in patients with dengue. *Invest Clin* 2005; 46(2):169-78.

Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in immunology* 2018; 9.

Lee CH, Teo C Low AF. Fulminant dengue myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2009; 136(3): 69-71.

Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol* 2008; 82: 6470–6480.

Legrand N, Ploss A, Balling R, Becker PD, Borsotti C, Brezillon N et al. Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe* 2009; 6(1): 5-9.

Leong ASY, Wong KT, Leong TYM, Tan PH, Wannakrairot P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Seminars in Diagnostic Pathology* 2007; 24(4): 227–236.

Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenate G et al. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *J Biol Chem* 2001; 276 (49): 45762–45771.

Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The Serine Protease and RNA- Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids. *J Virol* 1999; 73(4): 3108–3116.

Ligon BL. Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever: A Review of the History, Transmission, Treatment, and Prevention. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005;16(1):60-5.

Lima EQ, Nogueira ML. Viral hemorrhagic fever-induced acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2008; 28: 409–415.

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

Lima MRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(7): e738.

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): 689-94.

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

Lindenbach BD & Rice CM. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 991–1041. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001.

Lindenbach BD & Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 1999; 73 (6): 4611-21.

Lindenbach BD et al. Flaviviridae. In: Knipe, D. M. e Howley, P. M. (Ed.). *Fields virology*. Sixth. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.One, 2013. cap. 25, p.712-746.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D. M. e Howley, P. M. (Ed.). *Fields Virology*. 5th. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers 2007; cap. 33, p.1101-1133.

Liu Y, Liu J, Cheng G. Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. *Emerging Microbes & Infections* 2016; 5(7): e77.

Lizarraga, K., Nayer, A. Dengue-associated kidney disease. *Journal of Nephropathology* 2014; 3(2), 57–62.

Lo YL, Liou GG, Lyu JH, Hsiao M, Hsu TL, Wong CH. Dengue virus infection is through a cooperative interaction between a mannose receptor and CLEC5A on macrophage as a multivalent hetero-complex. *PLoS ONE* 2016; 1:e0166474.

Lombardi R, Yu L, Younes-Ibrahim M, Schor N, Burdmann EA. Epidemiology of acute kidney injury in Latin America. *Semin Nephrol* 2008; 28: 320–329.

Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *Biol. Chem* 2005; 280:23698–23708.

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

Ma X, Zhen W, Yang P, Sun X, Nie W, Zhang L, Xu H, Hu K. First confirmation of imported dengue virus serotype 2 complete genome in urine from a Chinese traveler returning from India. *Viol J*. 2014;11:56.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal* 2004; 80(948): 588–601.

Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL et al. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J Virol* 1998; 72 (3): 2132-40.

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

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

Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews* 2009, 22(4): 564-81.

Mathew A & Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews* 2008; 225(1):300-13.

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

McArthur MA, Sztein MB, Edelman R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. *Expert Rev of Vaccines* 2013; 12(8): 933–953.

Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R et al. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(6):765-73.

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

Miller S, Romero-Brey I, Bartenschlager R. The Dengue Virus Replication Complex. In: Hanley KA. & Weaver SC. (Ed.). *Frontiers in Dengue Virus Research*. 1st: Caister Academic Press 2010; cap. 3, p.35-53.

Milligan GN, Sarathy VV, Infante E, Li L, Campbell GA, Beatty PR et al. Dengue Virus Type 4 Model of Disseminated Lethal Infection in AG129 Mice. *PLoS ONE* 2015; 10(5), e0125476.

Milligan GN, Sarathy VV, White MM, Greenberg MB, Campbell GA, Pyles RB et al. A lethal model of disseminated dengue virus type 1 infection in AG129 mice. *The Journal of general virology* 2017; 98(10): 2507-2519.

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.

Mishra A, Singh VK, Nanda S. Rhabdomyolysis and acute kidney injury in dengue fever. *BMJ case reports* 2015; 04:14.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. *Methods in Mammalian Autophagy Research*. Cell 2010; Feb 5;140(3):313-26.

Mohan B, Patwari AK, Anand VK. Hepatic dysfunction in childhood dengue infection. *J Trop Pediatr* 2000; 46: 40-43.

Mohsin N, Mohamed E, Gaber M, Obaidani I, Budruddin M, Al Busaidy S. Acute tubular necrosis associated with non-hemorrhagic Dengue fever: a case report. *Renal Failure* 2009, v. 31, n. 8, p. 736–739.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine* 2003; 9(7):921-7.

Morrison J & García-Sastre A. STAT2 signaling and dengue virus infection. *Jak-Stat* 2014, 3(1): e27715.

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

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

Muller DA & Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* 2013, 98 (2): 192-208.

Munoz-Jordan GG, Sanchez-Burgos M, Laurent-Rolle A, Garcia-Sastre J. Inhibition of interferon signaling by denguevirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (24): 14333–14338.

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

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

Mutebi JP, Rijnbrand RC, Wang H, Ryman KD, Wang E, Fulop LD. Genetic relationships and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the *Flavivirus* genus based on the 3' noncoding region. *J Virol* 2004; 78(18): 9652-65.

Mv Rashmi. Haematological and biochemical markers as predictors of dengue infection. *Malaysian Journal of Pathology* 2015; 37.3.

Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis* 2006;194:600–7.

Na W, Yeom M, Choi IK, Yook H, Song D. Animal models for dengue vaccine development and testing. *Clinical and experimental vaccine research* 2017; 6(2), 104- 110.

Namvongsa V, Sirivichayakul C, Songsithichok S, Chanthavanich P, Chokejindachai W, Sitcharungsi R. Differences in clinical features between children and adults with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2013; 44(5):772-9.

Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl. Trop. Dis* 2011; 5, e1397.

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

Nayak V, Dessau M, Kucera K, Anthony K, Ledizet M, Modis Y. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *J Virol* 2009; 83 (9): 4338-44.

Neeraja M, Teja VD, Lavanya Neeraja M, Teja VD, Lavanya V, Priyanka EN, Subhada K, Parida MM, Priyanka EM, SubhadaK, Parida MM et al. Unusual and rare manifestations of dengue during a dengue outbreak in a tertiary care hospital in South India. *Archives of Virology* 2014; 159(7):1567-73.

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

Niedrig M, Patel P, El Wahed AA, Schädler R, Yactayo S. Find the right sample: A study on the versatility of saliva and urine samples for the diagnosis of emerging viruses. *BMC infectious diseases* 2018; 18(1): 707.

Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisyakorn U, Scott RM et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68(2):191-202.

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

Nogueira RM & 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.

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

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

Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araújo ES et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(3):297-304.

Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 2002; 11(9): 1376-81.

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

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, De Filippis AMB, Dos Santos FB, Da Cunha, RV, Coelho JO et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging infectious diseases*, 2005, 11(9): 1376.

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MDFD, Farias Filho JDC. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1988; 83(2): 219-225.

Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Publ Hlth* 2009; 40(2): 253-62

Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Clark KB, Villinger F, Ansari AA et al. Infection of bone marrow cells by dengue virus in vivo. *Experimental hematology* 2011; 40(3), 250-259.e4.

Normile D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science* 2013; 342:415.

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

Oliveira JFP & Burdmann EA. Dengue-associated acute kidney injury. *Clinical kidney journal*, 2015, 8(6), 681-685.

Olkowski S, Forshey BM, Morrison AC, et al. Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. *J Infect Dis* 2013; 208: 1026–33.

Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S et al. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viraemia and demonstration of protective immunity. *J. Gen. Virol* 2011; 92: 2272–2280.

Omatsu T, Moi ML, Takasaki T, Nakamura S, Katakai Y, Tajima S et al. Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *J. Med. Primatol* 2012; 41: 289–296.

Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA et al. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood* 2010; 115: 1823–1834.

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

Osorio JE, Partidos CD, Wallace D, Stinchcomb DT. Development of a recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate. *Vaccine* 2015; 33 (50): 7112–7120.

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008; 245(3): 194-205.

Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest* 2009; 89(10): 1140-51.

Paes MV, Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology* 2005; 338(2): 236-46.

Pagliari C, Quaresma JAS, Kanashiro-Galo L, de Carvalho LV, Vitoria WO, da Silva WLF et al. Human kidney damage in fatal dengue hemorrhagic fever results of glomeruli injury mainly induced by IL17. *Journal of Clinical Virology* 2016; 75 (16).

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock 108 syndrome (DHF/DSS). *Immun Cell Biol* 2007; 85(1):43-5.

Papa A, Testa T, Papadopoulou E. Detection of West Nile virus lineage 2 in the urine of acute human infections. *J Med Virol* 2014.

Passos MNP, Santos LMJ, Pereira MRR, Casali CG, Fortes BPMD, Valencia LIO et al. Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002 occurred in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 293-295.

Passos MNP, Santos LMJ, Pereira MRR, Casali CG, Fortes BPMD, Valencia LIO, et al. Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002 occurred in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 293-295

Pelupessy JM, Allo ER, Jota S. Pericardial effusion in dengue haemorrhagic fever. *Paediatrica indonesiana* 1989; 29:72-5.

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

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

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. *Virology* 2010; 7:22.

Pontes RJS & Ruffino-Netto A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev Saude Publ* 1994; 28(3), 218-227.

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

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

Póvoa TF, Oliveira ER, Basílio-de-Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Salomão NG. et al. Peripheral Organs of Dengue Fatal Cases Present Strong Pro-Inflammatory Response with Participation of IFN-Gamma-, TNF-Alpha- and RANTES-Producing Cells. *PLoS One* 2016; 11 (12): e0168973.

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

Price WH, Casals J, O'Leary W. Studies on the sequential immunization against group B arboviruses in squirrel monkeys, cynomolgus monkeys, rhesus monkeys and chimpanzees. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1974; 23: 118–130.

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

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

Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology* 1990; 174 (2): 450-8.

Rasinha A, Silva M, Caldas GC, Jácome F C, Leonardo R, Santos F, Nunes P et al. First detection of dengue virus in the saliva of immunocompetent murine model. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2018; 113(4): e170208.

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

Rasinha AC. Estudo do Tropismo do vírus dengue tipo 4 em modelo BALB/c: infecção experimental, análises morfológicas e de viremia. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2017.

Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J* 2016; 13: 131.

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

Reed LJ & Muench H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-497.

Repizo LP, Malheiros DM, Yu L, Barros RT, Burdmann EA. Biopsy proven acute tubular necrosis due to rhabdomyolysis in a dengue fever patient: a case report and review of literature. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56 (1): 85–88.

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

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17:208-12.

Riaz MM, Mumtaz K, Khan MS, Patel J, Tariq M, Hilal H et al. Outbreak of dengue fever in Karachi 2006: a clinical perspective. *Journal of the Pakistan Medical Association* 2009; 59(6): 339.

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

Rivera J, Neira M, Parra, E., Méndez, J., Sarmiento L, Caldas ML. Detección de antígenos del virus del dengue en tejidos post Mórtem. *Biomédica*, 2014, 34(4).

Rodenhuis-Zybert IA, Wilchut J, Smith JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:2773–2786.

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.

Rodrigues RS, Brum ALG, Paes MV, Basilio-de-Oliveira CA, Marchiori E, Borghi DP et al. Lung in dengue: computed tomography findings. *PLoS ONE* 2014; 9:e96313.

Rodriguez-Roche R & Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 690835.

Romanos MTV. Febre amarela e dengue. In: *Introdução à Virologia Humana*. Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. 2. Ed. (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), pp.399-408. 2015.

Rosen L, Khin MM, Tin U. Recovery of virus from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever. *Res. Virol* 1989; 140: 351–360.

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

Rothwell C, Lebreton A, Young Ng C, Lim JYH, Liu W, et al. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Clin Infect Dis* 2009; 389: 8–19.

Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1999; 54(5): 503-510.

Sabchareon A, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V et al. Dengue Infection in Children in Ratchaburi, Thailand: A Cohort Study. I. Epidemiology of Symptomatic Acute Dengue Infection in Children, 2006–2009. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(7): e1732

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

Sahaphong S, Riengrojpitak S, Bhamarapavati N, Chirachariyavej T.. Electron microscopic study of the vascular endothelial cell in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1980; 11(2):194-204.

Sakinah S, Priya SP, Kumari S, Amira F, Poorani K, Alsaedy H et al. Impact of dengue virus (serotype DENV-2) infection on liver of BALB/c mice: A histopathological analysis. *Tissue and Cell* 2017; 49(1): 86-94.

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.

Samanta J & Sharma V. Dengue and its effects on liver. *World journal of clinical cases* 2015; 3(2): 125-31.

Sangle SA, Dasgupta A, Ratnalikar SD, Kulkarni RV. Dengue myositis and myocarditis. *Neurol India* 2010; 58: 598-599.

Sanguanserm Sri T, Poneprasert B, Phornphutkul B, Kulapongs P, Tantachamrun T. Acute encephalopathy associated with dengue infection. *Bangkok: SEAMEO TROP MED* 1976; 10-1.

Sarathy VV, Milligan G N, Bourne N, Barrett AD. Mouse models of dengue virus infection for vaccine testing. *Vaccine* 2015; 33(50): 7051-60.

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

Schatzmayr HG & Cabral MC. *A virologia no Estado do Rio de Janeiro: uma visão global*. 2a Edição. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2012. 176.

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):245-6.

Schlesinger RW. *Dengue Viruses*. Virology Monographs, Vol. 16 (Gard S & Hallauer C, Editors). IV + 132 S., 34 Abb., 26 Tab Wien-New York Springer-Verlag 1977.

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

Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, Hombach J. Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. *Vaccine* 2011, 29 (42): 7276–7284.

Scott LJ. Tetravalent Dengue Vaccine: A Review in the Prevention of Dengue Disease. *Drugs* 2016, 76(13):1301-12.

Seet RCS, Lee CYJ, Lim ECH, Quek AML, Yeo LLL, et al. Oxidative damage in dengue fever. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 375–380.

Seneviratne SL, Malavige GN, De Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans of the Royal Soc of Trop Med Hyg* 2006; 100(7): 608–614.

Setlik RF, Ouellette D, Morgan J, McAllister CK, Dorsey D, Agan BK. Pulmonary hemorrhage syndrome associated with an autochthonous case of dengue hemorrhagic fever. *Southern Medical Journal* 2004; 97: 688–691.

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.

Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2011; 84: 200–207.

Shepard DS, Halasa YA, Undurraga EA. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* 2nd ed (eds Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J). CAB International 2014; 50–77.

Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Stanaway JD. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect. Dis* 2016; 16: 935–941.

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

Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *Journal of Virology*. 2006; 80:10208–17.

Shurtleff AC, Beasley DW, Chen JJ, Ni H, Suderman MT, Wang H et al. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology* 2001; 281 (1): 75-87.

Silva JR J. *Dengue: Situação e perspectivas*. Brasília, 2013.

Simmons CP, McPherson K, Chau NVV, Tam DH, Young P, Mackenzie J et al. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. *Vaccine* 2015; 7061–7068.

Siqueira Jr JB, Martelli CMT, Coelho GE, da Rocha Simplício AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. *Emerging infectious diseases* 2005; 11(1): 48.

Siqueira Jr JB, Vinhal LC, Said RDC, Hoffmann JL, Martins J, Barbiratto SB et al. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010 In: (Ed.). *Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde* Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2011; cap. 7, p.157-171.

Songco RS, Hayes CG, Leus CD, Manaloto CO. Dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Filipino children: clinical experience during the 1983-1984 epidemic. *Southeast Asian J of Trop Med & Pub Hlth* 1987; 18: 284-290.

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

Souza LJD, Nogueira RMR, Soares LC, Soares CEC, Ribas BF, Alves FP et al. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2007; 11(4): 407-410.

Sridharan A, Chen Q, Tang KF, Ooi EE, Hibberd ML, Chen J. Inhibition of megakaryocyte development in the bone marrow underlies dengue virus-induced thrombocytopenia in humanized mice. *J Virol.* 2013;87:11648–58.

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

Sumarmo HW, Wulur H, Jahja E, Gubler DJ, Suharyono W, Sorensen K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. *Bull WHO* 1983; 61(4): 693–701.

Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, et al. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost.* 2007;5:2291–99.

Suvarna JC & Rane PP. Serum lipid profile: a predictor of clinical outcome in dengue infection. *Trop Med Int Health* 2009; 14: 576–585.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico - Volume 45 - nº 17 - 2014 - Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 29 de 2014. Brasília: Ministério da Saúde 2014.

SVS. Secretaria de Vigilância em 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. Brasília : Ministério da Saúde 2015.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 20 - 2016 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 16, 2016. Brasília : Ministério da Saúde 2016.

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

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007. Brasília : Ministério da Saúde 2007.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Volume 50. Brasília : Ministério da Saúde 2019.

Swaminathan S, Khanna N. Dengue Vaccine Development: Global and Indian Scenarios. *International Journal of Infectious Diseases* 2019.

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

Tan GK, Ng JKW, Trasti SL, Schul W, Yip G, Alonso AS. Non Mouse-Adapted Dengue Virus Strain as a New Model of Severe Dengue Infection in AG129 Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(4): e672.

Teixeira MDG, Costa MDCN, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cadernos de Saúde Pública* 2005; 21: 307-1315.

Teixeira MG, Costa MDCN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 2009; 25 (1): S7-18.

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

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; 56 (5): 566–572.

Torrentes-Carvalho A, Marinho CF, de Oliveira-Pinto LM, de Oliveira DB, Damasco PV, Cunha RV, et al. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cell activation during the acute phase of dengue. *Immunobiology.* 2014;219:329–40.

Torres AF, Braga DN, Muniz F, Mendonca C, Oliveira DN, de Souza ET, Burke A, Tavora F. Lymphocytic myocarditis at autopsy in patients with dengue fever. *Brazil J Inf Dis* 2013; 17: 619-621

Torresi J, Ebert G, Pellegrini M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Human vaccines & Immunotherapeutics* 2017; 13(5): 1059-1072.

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.

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

Upadhaya BK, Sharma A, Khaira A, Dinda AK, Agarwal SK, Tiwari SC. Transient IgA nephropathy with acute kidney injury in a patient with dengue fever. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation: An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 2010; 21 (3): 521–525.

Van Gorp ECM, Suharti C, Mairuhu AT a, Dolmans WM V, van Der Ven J, et al. Changes in the plasma lipid profile as a potential predictor of clinical outcome in dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1150–1153.

Van Hoof, V. O., & De Broe, M. E. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 1994; 31(3): 197-293.

Vannice KS, Durbin A, Hombach J. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine* 2016; 34 (26): 2934-2938.

Vannice KS, Roehrig JT, Hombach J. Next generation dengue vaccines: A review of the preclinical development pipeline. *Vaccine* 2015; 34 (50): 7091-7099.

Vasilaki N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology* 2011; 9(7): 532–541.

Vasilakis N & Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 2008; 72: 1-76.

Vasilakis N, Durbin AP, Da Rosa APT, Munoz-Jordan JL, Tesh RB, Weaver SC. Antigenic relationships between sylvatic and endemic dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 2008, 79 (1): 128-32.

Vasilakis V. The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia. 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Bangkok, Thailand 2013.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000; 181(1): 2-9.

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

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.

Verma R, Sahu R, Holla V. Neurological manifestations of dengue infection: a review. *J Neurol Sci* 2014; 346(1-2):26-34

Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *NEJM* 2015; 372 (2): 113–123.

Villar-Centeno LA, Díaz-Quijano FA, Martínez-Vega RA. Biochemical alterations as markers of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 370–374.

von Ranke FM, Zanetti G, Hochegger B, Marchiori E. Infectious diseases causing diffuse alveolar hemorrhage in immunocompetent patients: a state-of-the-art review. *Lung* 2013; 191:9–18.

Walid SF, Sanusi S, Zawawi MM, Ali RA. A comparison of the pattern of liver involvement in dengue hemorrhagic fever with classic dengue fever. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 2000; 31:259-63.

Wang CC, Liu SF, Liao SC, Lee K, Liu JW, Lin A et al. Acute respiratory failure in adult patients with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 77 (1): 151–158.

Wang CC, Wu CC, Liu JW, Lin AS, Liu SF, Chung YH, et al. Chest radiographic presentation in patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 291–296.

Wang XJ, Wei HX, Jiang SC, He C, Xu XJ, Peng HJ. Evaluation of aminotransferase abnormality in dengue patients: A meta analysis. *Acta tropica* 2016; 156, 130-136.

Weaver SC & Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution* 2009; 9 (4): 523-540.

Weerakoon KGAD, Kularatne SAM, Edussuriya DH, Kodikara SKA Gunatilake LPG, Pinto VG et al. Histopathological diagnosis of myocarditis in a dengue outbreak in Sri Lanka, *BMC Research Notes* 2011; 4: 268.

Weigert C. Über eine Methode zur Färbung elastischer Fasern. *Zentralbl Allg Pathol Anat* 1898; 9: 289-292.

Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 2009; 5 (4): 365-75.

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

Wengler G, Nowak T, Wahn K. Analysis of the influence of proteolytic cleavage on the structural organization of the surface of the West Nile flavivirus leads to the isolation of a protease-resistant E protein oligomer from the viral surface. *Virology* 1987; 160:210- 219.

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L et al. *Flaviviridae*. *Intervirology* 1985; 24 (4): 183-92.

WHO. World Health Organization. Dengue and severe dengue. ANO. Disponível em: www.who.int/news-room/factsheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 15 jul. 2018.

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

WHO. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland 1997. Disponível em: www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Dengue>. Acesso em 04/012/2018.

WHO. World Health Organization. Global Alert and Response 2014. Disponível em: www.who.int/csr/disease/dengue/en/>. Acesso em 04/12/2018.

WHO. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva 2013. 140.

Wiersinga WJ, Scheepstra CG, Kasanardjo JS, de Vries PJ, Zaaijer H, Geerlings SE. Dengue fever-induced hemolytic uremic syndrome. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006; 43 (6): 800–801.

Wills BA, Oragui EE, Dung NM, Loan HT, Chau NV, et al. Size and charge characteristics of the protein leak in dengue shock syndrome. *J Infect Dis* 2004; 190: 810–818.

Wilson ME & Chen LH. Dengue: update on epidemiology. *Curr Infect Dis Rep* 2015; 17(1): 457.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 2000; 6(7): 816- 20.

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, Screaton G. Recent advances in understanding dengue. *F1000Research* 2016; v. 5.

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

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

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

Yuvarajan S, Durga K, Rakesh J. Importance of pulmonary complications in dengue. *Int J Bas App Med Sc* 2015; 5: 322-327.

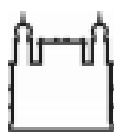
Zakaria Z, Zainordin NA, Sim BL, Zaid M, Haridan US, Aziz AT et al. An evaluation of the World Health Organization's 1997 and 2009 dengue classifications in hospitalized dengue patients in Malaysia. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8: 869–875.

Zellweger RM, Prestwood TR, Shresta S. Antibodies enhance infection of LSECs in a model of ADE-induced severe dengue disease. *Cell Host Microbe* 2010; 7(2): 128–39.

Zompi S & Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses* 2012; 4(1): 6282.

Zubair M, Ashraf M, Ahsan A, Nazir NU, Hanif H, Khan HA. Dengue viral infections in Pakistan and other Asian countries: a comprehensive review. *JPMA* 2016; 66 (7): 884–888.

Anexo I – Licenças CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-50/11

Certificamos que o protocolo (P-39/11-3), intitulado "
Análises histopatológicas e ultra-estruturais de tecidos de modelo animal em quadro de
infecção primária e secundária pelos vírus dengue sorotipos 1, 2 e 3.
", sob a responsabilidade de DEBORA FERREIRA BARRETO VIEIRA, atende ao disposto na Lei
11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da
Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não
exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 12/12/2015 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 366 Machos de BALB/c An, Idade: 2 Mes(es), Peso: 25,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2011

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC

LICENÇA

L-023/2018

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-015/2018), intitulado “**Infecção experimental de modelo murinho imunocompetente com os vírus dengue**”, sob a responsabilidade de **Débora Ferreira Barreto Vieira** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 11/07/2022 e inclui o uso total de:

Camundongo, linhagem:

BALB/c An – 400 animais machos de 2 meses de idade.

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2018.

Tânia Zaverucha do Valle
Coordenadora Adjunta da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056