

GABRIELA CARDOSO CALDAS

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE
TECIDOS DE MODELO MURINO INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DENGUE
SOROTIPO 3



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2016

CIP - Catalogação na Publicação

C145e Caldas, Gabriela Cardoso
Estudos morfológicos e moleculares de tecidos de modelo murino infectados experimentalmente com o vírus dengue sorotipo 3 / Gabriela Cardoso Caldas. -- Rio de Janeiro, 2016.
110 f.

Orientadora: Debora Ferreira Barreto Vieira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. Dengue. 2. Virus da dengue. 3. Microscopia eletrônica. 4. Biologia molecular. 5. Camundongos anatomia e histologia. I. Vieira, Debora Ferreira Barreto , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELA CARDOSO CALDAS

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE TECIDOS DE MODELO MURINO
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2016

(José Nelson dos Santos Silva Couceiro, Dr. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ
)

(Jorlan Fernandes de Jesus, Msc. Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

(Bárbara Vieira do Lago, PhD. Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz)

(Maria Tereza Villela Romanos, Dra. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ)

Dedico este trabalho à minha amada mãe, Rosana; ao meu querido amigo, Marcos e ao meu grande amor, Victor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por sempre dar forças para que eu possa seguir meu sonho.

Ao CNPq, por acreditar na importância deste trabalho e pela bolsa de estudo concedida.

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

À minha orientadora e amiga, Dra. Debora Ferreira Barreto Vieira, por acreditar em mim quando eu mesma não acreditei. Obrigada pelo apoio contínuo, pelo carinho, pelas conversas, pelo exemplo da profissional ética e competente, e por tudo o que representa em minha vida.

À Dra Ortrud Monika Barth, por ser um exemplo de grande cientista apesar de toda adversidade do mundo institucional, por me incentivar e encorajar, pelos conselhos e ensinamentos tão valiosos e por me acolher tão bem no laboratório.

À equipe do laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral: Arthur Rasinhas, Raphael Leonardo, Ana Luisa e Maria Odete, pela amizade, pelas conversas, momentos divertidos e infinita paciência. Em especial, agradeço ao meu grande amigo Marcos Alexandre, por me incentivar a ser sempre a melhor versão de mim mesma e por tudo o que sempre fez e faz por mim e à querida Fernanda Cunha Jácome, por constantemente me auxiliar, me acalmar e ser minha inspiração de ser humano e profissional.

Às doutorandas Priscila Conrado Guerra Nunes e Nieli Farias e a toda equipe da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth, pela imensa ajuda na realização dos experimentos. Ao Dr. Marcelo Pelajo, pela experiência e ensinamentos compartilhados.

À minha mãe, Rosana, por ser a pessoa mais importante da minha vida, por me amar, me apoiar incondicionalmente e por ser o meu exemplo de ser humano. 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.

Ao meu amado padrinho, Evaldo, por nunca medir esforços para me fazer feliz e por todo o carinho, cuidado e amor depositados em mim, desde o meu nascimento.

Aos meus avós, Ednea e David (*in memoriam*), por serem os meus exemplos de pessoas fortes e de valores.

Às minhas primas, Denise e Lilian, por acreditarem nos meus sonhos de menina apaixonada por vírus e estarem sempre ao meu lado, sendo minhas maiores referências.

Ao meu companheiro de vida e grande amor, Victor, que de forma especial e carinhosa me faz enxergar a ciência por outras perspectivas e que com tanta paciência me deu força e coragem, sendo meu porto seguro em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos, Amanda Ambrósio, Caroline Esther, Caroline Monteiro, Celina Guedes, Luana Mafra, Felipe Miceli, Lukas Bolini e Karinne Motta, por darem um sentido mais acolhedor à graduação, pela força e por me auxiliarem nos momentos mais difíceis dessa jornada.

A Helver Gonçalves Dias, pelo grande parceiro que se tornou, por dividir comigo seus anseios, projetos e inspirações, por acreditar no poder emancipador da ciência e por me ensinar que juntos, somos mais fortes.

Ao Dr. José Nelson, à Dra. Barbara Vieira e ao Msc. Jorlan Fernandes, por aceitarem avaliar este trabalho e por todas as sugestões, críticas e comentários, que certamente servirão para dar maior alinhamento a este estudo.

“Não explicar ciência me parece perverso. Quando alguém está apaixonado, quer contar a todo mundo”.

Carl Segan

RESUMO

GABRIELA CARDOSO CALDAS

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE TECIDOS DE MODELO MURINO INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3

Orientador: Dra Debora Ferreira Barreto Vieira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A circulação do vírus dengue sorotipo 3 (DENV-3) foi identificada em 2000, no estado do Rio de Janeiro. Em 2002, esse sorotipo foi responsável pela maior e mais grave epidemia no país, com 771.551 casos registrados correspondendo a 80% dos casos ocorridos nas Américas. Diversos estudos epidemiológicos 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 morfológicas e moleculares possíveis alterações teciduais, assim como a presença do genoma do DENV em diferentes órgãos 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, 72 horas pós-infecção eutanasiados e cerebelo, coração, rim, pulmão, fígado e baço foram coletados. Parte dos tecidos foi fixada e processada por técnicas padrão para análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão, microscopia fotônica e outra parte foi macerada em meio Leibovitz (L-15) objetivando detecção e quantificação do RNA do DENV pela técnica de RT-PCR em tempo real. Análises morfológicas a partir de amostras de todos os órgãos estudados revelaram alterações semelhantes às observadas em casos humanos de DEN e partículas semelhantes aos DENV foram detectadas em célula intersticial renal. O genoma viral foi detectado no pulmão, fígado, cerebelo, rim e baço e o maior título recuperado foi observado no baço. Estes resultados demonstram a suscetibilidade do camundongo BALB/c à infecção pelo DENV-3.

Palavras-chave: Dengue; Virus da dengue; Microscopia eletrônica; Biologia molecular; Camundongos anatomia e histologia.

ABSTRACT

GABRIELA CARDOSO CALDAS

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE TECIDOS DE MODELO MURINO INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3

Orientador: Dra Debora Ferreira Barreto Vieira

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The circulation of dengue virus serotype 3 (DENV-3) was identified in 2000, in the state of Rio de Janeiro. In 2002, this serotype was responsible for the largest and most severe epidemic in the country: 771,551 registered cases corresponding to 80% of the cases occurred in the Americas. 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 morphological and molecular analyzes, as well as the presence of the DENV genome in different organs of BALB / c mice experimentally infected with epidemic and non-neuroadapted DENV-3. Male BALB / c mice, 2 months old, were intravenously infected with DENV-3. After 72 hours of infection, the mice were anesthetized, euthanized and cerebellum, heart, kidney, lung, liver and spleen were collected. Part of the tissues was fixed and processed by standard techniques for morphological analysis in transmission electron microscopy, photonic microscopy and another part was macerated in Leibovitz medium (L-15) aiming at the detection and quantification of DENV RNA by real time RT-PCR technique. Morphological analysis from samples of all organs studied revealed alterations similar to those observed in human cases of DEN and DENV- like particles were seen in kidney interstitial cell. The viral genome was detected in lung, liver, cerebellum, kidney and spleen. The highest titer recovered was observed in the spleen. These results demonstrate the susceptibility of BALB / c mice to DENV-3 infection.

Key words: Dengue; Dengue virus; Electron microscopy; Molecular biology; Mice anatomy and histology.

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

ÍNDICE

Agradecimentos	vi
Resumo	ix
Abstract.....	x
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Vírus Dengue.....	1
1.1.1. Classificação, Morfologia e Propriedades Físico-Químicas	1
1.1.2. Estrutura do genoma.....	2
1.1.3. Replicação do DENV	4
1.2. Células alvo na infecção pelos vírus dengue	6
1.3. Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue.....	6
1.3.1. Infecções secundárias e efeitos na progressão da doença.....	7
1.3.2. Revisão da classificação das infecções por dengue.....	8
1.4. Patogenia e histopatologia das infecções por dengue	9
1.5. Modelos experimentais para o estudo de infecção pelos vírus dengue	11
1.5.1. Primatas não humanos (PNH)	12
1.5.2. Modelos murinos	12
1.5.2.1. Camundongos humanizados	12
1.5.2.2. Camundongos imunodeficientes/interferon-deficientes.....	13
1.5.2.3. Camundongos imunocompetentes	14
1.5.3.4. Camundongos BALB/c	14
1.6. Vacinas.....	15
1.7. Epidemiologia	18
1.7.1. Dengue no mundo.....	18
1.7.2. Dengue no Brasil	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS.	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.1. Objetivos Específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Considerações Éticas	26
4.2. Vírus dengue sorotipo 3	26

4.3. Camundongos BALB/c.....	26
4.4. Experimentação Animal	28
4.4.1. Infecção	28
4.4.2. Verificação da temperatura corporal e sinais clínicos associados à infecção.....	28
4.4.3. Eutanásia.....	28
4.5. Processamento de amostras para análises em microscopia fotônica	29
4.6. Processamento de amostras para análises em microscopia eletrônica de transmissão.30	
4.6.1. Ultramicrotomia.....	30
4.7. Extração de Ácido Nucleico	31
4.8. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Análise histopatológica de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV-	
3	33
5.2. Análise ultraestrutural de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV-	
3	35
5.3. Análise histopatológica de coração de camundongos BALB/c infectados com DENV-	
3	38
5.4. Análise ultraestrutural de coração de camundongos BALB/c infectados com DENV-	
3	40
5.5. Análise histopatológica de fígado de camundongos BALB/c infectados com DENV-3.	
.....	44
5.6. Análise ultraestrutural de fígado de camundongos BALB/c infectados com DENV-3.	
.....	52
5.7. Análise histopatológica de cerebelo de camundongos BALB/c infectados com DENV-	
3	52
5.8. Análise ultraestrutural de cerebelo de camundongos BALB/c infectados com DENV-	
3	56
5.9. Análise histopatológica de rim de camundongos BALB/c infectados com DENV-3	
.....	60
5.10. Análise ultraestrutural de rim de camundongos BALB/c infectados com DENV-3 ...	
.....	64

5.11. Análises moleculares	69
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÃO.....	79
8. PERSPECTIVAS.....	80
9. REFERÊNCIAS	81

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 e Harris, 2015).

Estimativas recentes sugerem que cerca de 390 milhões de pessoas são infectadas por ano (Bhatt *et al.*, 2013), com 500 mil episódios de dengue grave (DG) e mais de 20 mil mortes relacionadas à doença (Murray, Quam e Wilder-Smith, 2013). Atualmente, aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2013; Guzman e Harris, 2015).

1.1. Vírus dengue

1.1.1. Classificação, Morfologia e Propriedades Físico-Químicas

Os vírus dengue (DENVs) são arbovírus pertencentes à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*. Apresentam quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Calisher, 1989). São mantidos na natureza por um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o homem, o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (Gubler, 2002). 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). Estudos filogenéticos e de neutralização indicam a existência do novo sorotipo e, esta nova descoberta, poderá implicar no controle da doença e no desenvolvimento de vacinas (Mustafa *et al.*, 2015). A infecção por um dos sorotipos garante imunidade duradoura a este sorotipo e imunidade transiente aos outros sorotipos (Sabin, 1952).

O gênero *Flavivirus* possui mais de 70 vírus divididos em oito grupos sorologicamente relacionados, sendo 40 desses patogênicos para o homem (Bollati *et al.*, 2010). Nesse contexto, os DENVs são considerados responsáveis pelas maiores taxas de doença e mortalidade dentre todos os membros desse gênero (Mukhopadhyay, Kuhn e Rossmann, 2005).

Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* possuem densidade de flutuação de 1,22-1,24 g/cm em cloreto de céσιο e 1,18-1,20 g/cm em sacarose. Os DENVs possuem 175-218S de coeficiente de sedimentação em sacarose e são inativados a 50°C, com a infecciosidade da

partícula decrescendo 50% a cada 10 minutos. São sensíveis à inativação por raios ultravioletas, detergentes iônicos e não iônicos e digestão por tripsina. A partícula do DENV apresenta maior estabilidade em pH entre 7 a 9, mantendo-se por 5 anos a -70°C ou liofilizado e conservado a 4°C (Brinton, 1986).

Os DENV são vírus envelopados, esféricos, possuem nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e medem cerca de 50 nanômetros de diâmetro (Figura 1). Seu é genoma é de RNA de fita simples de polaridade positiva (ssRNA) com aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Wengler e 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 e Rice, 2001).

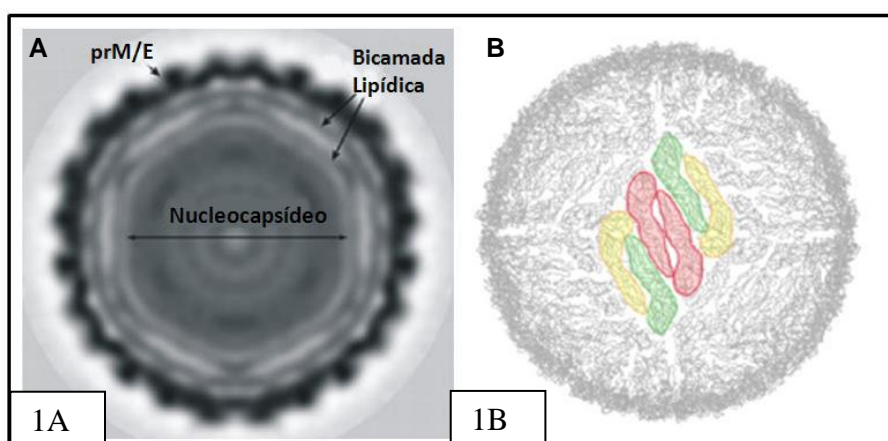


Figura 1: Micrografia eletrônica [A] e Esquema 3D da partícula dos DENVs [B]. (adaptado de Yu *et al.*, 2008).

1.1.2. Estrutura do genoma

O genoma dos DENVs compreende duas regiões não codificantes de 96 e 450 nucleotídeos nas extremidades 5' e 3' (5'UTR e 3'UTR) e uma única região aberta de leitura (ORF) de RNA. 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 (Bollati *et al.*, 2010; Vasilaskis *et al.*, 2011) (Figura 2).

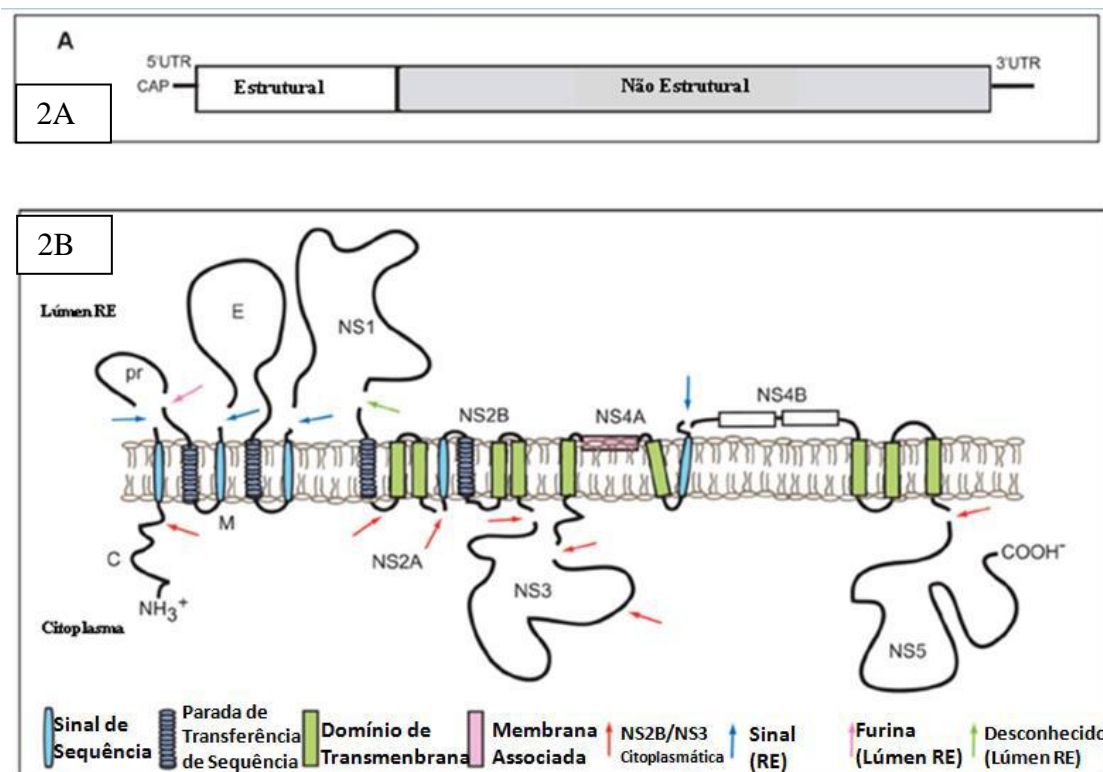


Figura 2. Diagrama esquemático do genoma [A] e da poliproteína dos DENV [B]. (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

A proteína C possui 11 kilodaltons (kDa) com 100 aminoácidos, que encapsula o RNA, formando o nucleocapsídeo que por sua vez, é envolto por lípidos derivados da célula hospedeira, ao qual estão ancoradas as proteínas M e E. A proteína M, com aproximadamente 8kDa e 75 aminoácidos, é um fragmento obtido da proteólise da proteína pré membrana (prM). Já a proteína E, além de ser a mais abundante, com 53kDa e 595 aminoácidos, possui 3 domínios estruturais que são responsáveis pela neutralização, fusão e interação com receptores da célula hospedeira (Ligon, 2005; Rodenhuis-Zybert, Wilschut e Smith, 2010). Além disso, essa proteína desempenha um importante papel na virulência viral (Wengler, Nowak e Wann, 1987) e é o alvo dominante das respostas humorais contra os DENV (Clyde, Kyle e Harris, 2006).

Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 é altamente conservada e apresenta peso molecular entre 46-55 kDa, dependendo do grau de glicosilação (Rastogi, Sharma e 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 é intracelular e 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 e Singh, 2016). A forma

intracelular desempenha um papel crucial na replicação viral e as formas extracelular e ligada à membrana celular tem sido relatadas na evasão imune e patogênese, através da ativação da cascata do sistema complemento (Muller e 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 (Lima *et al.*, 2010, Weaver e Vasilakis, 2009).

A NS2A é uma proteína de 22kDa envolvida na replicação e empacotamento do RNA (Khromykh *et al.*, 2001) e, possivelmente, antagonista de interferon (Jones, Patkar e Kuhn, 2005). NS2B, proteína de membrana, associa-se à proteína NS3 formando um complexo que atua como um co-fator na maturação da partícula viral. (Erbel *et al.*, 2006, Leung *et al.*, 2001).

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

A região genômica de NS4 codifica duas proteínas hidrofóbicas: NS4A (16kDa) e NS4B (27kDa). Esta última atua como um inibidor de sinalização de interferon (Munoz-Jordan *et al.*, 2003; Jones, Patkar e Kuhn, 2005). 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.*, 2007).

A NS5 é altamente conservada entre os *Flavivirus* e multifuncional, com atividades de metiltransferase e de RNA polimerase dependente de RNA (Lindenbach e Rice, 2001).

1.1.3. Replicação dos vírus dengue

A infecção pelo DENV tem início quando o mosquito vetor faz o seu repasto sanguíneo e o vírus é inoculado no hospedeiro. A partícula viral infecta uma célula permissiva através da ligação da proteína E à receptores celulares. Dentre os vários receptores já identificados, destacam-se o sulfato de heparina (Chen *et al.*, 1997), *heat shock protein* (Hsp) 70, Hsp 90 (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005), GRP78/Bip, 37-kDa/67-kDa (Jindadamrongwech, Theparit e Smith, 2004) e DC-SIGN (Lozach *et al.*, 2005). Após a adsorção, a partícula é endocitada em vesículas recobertas por clatrininas 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 e Harris, 2006; Perera e Kuhn, 2008; Santos, Romanos e Wigg, 2008) (Figura 3).

A replicação do genoma viral ocorre principalmente no citoplasma das células infectadas. Inicialmente, o RNA viral (vRNA) atua como RNA mensageiro (mRNA) para a síntese da poliproteína que é direcionada para o retículo endoplasmático (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, que se resume na síntese de uma fita negativa de RNA que vai servir de molde para a produção do genoma viral (Clyde, Kyle e Harris, 2006; Perera e Kuhn, 2008; Potisopon *et al.*, 2014) (Figura 3). O domínio NS5-Pol da proteína NS5 é responsável pela replicação e tradução do genoma viral.

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, furina, cliva a proteína prM para gerar partículas virais maduras onde a proteína E forma homodímeros. O produto da clivagem da prM pela furina fica associado aos vírions até que estes sejam liberados para o meio extracelular através do processo de exocitose (Perera e Kuhn, 2008; Yu *et al.*, 2008) (Figura 3).

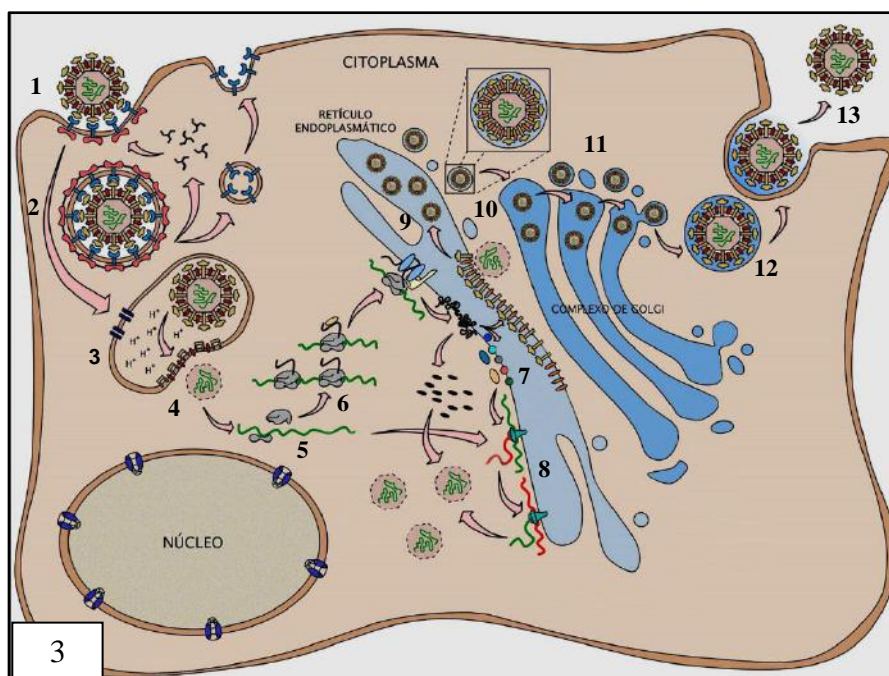


Figura 3: Esquema de replicação dos DENV. **1.** Adsorção da partícula viral à membrana celular; **2.** Internalização da partícula com formação de vesícula endocítica; **3.** Formação e acidificação do endossoma e fusão das membranas vesicular e viral; reciclagem dos receptores celulares; **4.** Liberação 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. Fonte: Oliveira, 2004 (adaptado).

1.2. Células alvo das infecções pelos vírus dengue

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 após um período de latência de 12 a 16 horas, no local da inoculação, provavelmente nas células retículo-endoteliais, células de Langerhans ou nos fibroblastos que se encarregam de levar o vírus até os linfonodos regionais, favorecendo sua disseminação no sangue, preferencialmente nos monócitos (Rothman e Ennis, 1999).

Estudos realizados em autópsias e biópsias de pacientes demonstraram presença de RNA e antígeno viral em monócitos e linfócitos circulantes, macrófagos do baço, assim como no fígado, pulmão, baço, cérebro, rim, medula óssea e coração (Jessie *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011). Ensaios de imunomarcacão e hibridização *in situ* identificaram o antígeno viral ou a fita positiva do RNA em células endoteliais no fígado, pulmão e baço (Jessie *et al.*, 2004; Balsitis *et al.*, 2009; Póvoa *et al.*, 2014).

Em amostras de sangue periférico de pacientes na fase aguda da infecção, o vírus não só pode ser recuperado 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).

1.3. Manifestações clínicas e classificação dos casos de dengue

A DEN é uma doença febril aguda, causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais (Edelman e Hombach, 2008), que podem causar manifestações clínicas semelhantes (Rothman e Ennis, 1999), variando de intensidade 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; Santos, Romanos e Wigg, 2008).

A maioria dos pacientes é assintomática ou apresentam 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 maculopapular (Souza *et al.*, 2008; Dalrymple e Mackow, 2012). A mialgia e a artralgia são fatores característicos da doença, e são raros os sintomas respiratórios, tais como tosse e rinite (Santos, Romanos e Wigg, 2008).

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

As manifestações mais graves da DEN, segundo a classificação utilizada pela OMS (1997), são 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 acompanham os sintomas de DC. Sinais de hipotensão, choque e insuficiência circulatória indicam progressão para SCD e caso um tratamento adequado não seja iniciado, o paciente pode vir a óbito em um período de 8 a 24 horas. (WHO, 1997; Santos, Romanos e Wigg, 2008; Zompi e Harris, 2012). FHD/SCD possui 4 graus de gravidade e ocorre com maior frequência nas infecções secundárias. Os Graus I e II são considerados os mais brandos da FHD, enquanto os Graus III e IV representam a evolução da doença para o estágio de choque. Esta é uma classificação dinâmica e pode mudar rapidamente, de acordo com a evolução e o estágio em que o paciente se encontra (Tristão-Sá e Zagne, 2008).

1.3.1. Infecção secundária e efeitos na progressão da doença

Os sintomas clínicos decorrentes de uma infecção primária com um sorotipo de DENV incluem uma doença febril aguda autolimitada, mialgia e erupção maculopapular. A recuperação é acompanhada pelo desenvolvimento de uma imunidade homotípica a longo prazo. 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).

Apesar da progressão do quadro clínico para FHD e SCD não ser totalmente compreendida, duas principais teorias são propostas para explicar o aumento das chances de desenvolvimento de FHD e SCD em infecções secundárias: a resposta imune 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 a 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 (Guzman, 1990; Halstead, 2003; Mathew e 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 DENV, em virtude do aumento das células infectadas e, conseqüentemente, da carga viral. Além disso, a infecção celular acarreta na liberação de mediadores vasoativos na corrente sanguínea, causando o aumento da permeabilidade vascular, ativação do sistema complemento e da tromboplastina tissular (Halstead, 2003).

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 tem baixa afinidade pelos epítopos do sorotipo infectante e por isso são menos eficientes em responder ao segundo desafio (Alexander-Miller, Leggatt e 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, Cardosa e Guzman, 2007).

1.3.2. Revisão da classificação das infecções por dengue

A OMS propôs uma nova classificação dos casos de DEN, a partir da iniciativa intitulada *Dengue Control* (DENCO), que possui o objetivo de orientar médicos na identificação precoce de casos graves (WHO, 2009). Observações preliminares do DENCO confirmaram que utilizando um conjunto de parâmetros clínicos e/ou laboratoriais, é possível

a distinção entre pacientes apresentando DEN com ou sem sinais de alerta e DG (WHO, 2009) (Figura 4).

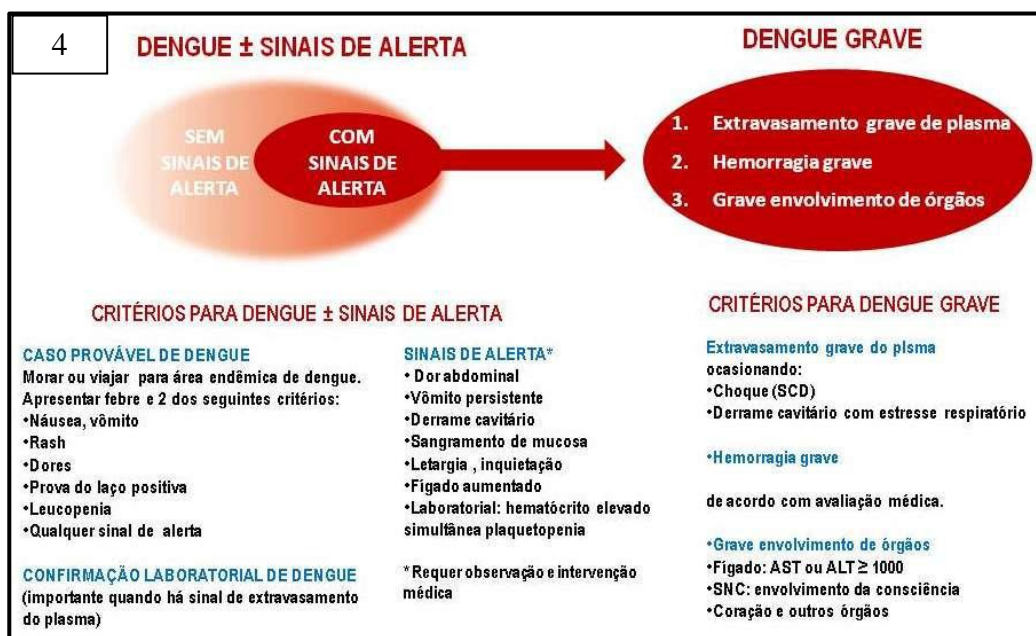


Figura 4. Nova classificação dos casos de DEN de acordo com a OMS. Fonte: OMS, 2009.

Desde a revisão do esquema de classificação, que atualmente consiste de DEN com ou sem sinais de alerta e DG, tem sido possível identificar a gravidade dos casos em tempo real para tomada de decisões, medir e comparar a mortalidade e morbidade por países e globalmente, bem como para disparar planos de contingência precocemente (Horstick *et al.*, 2015). Contudo, apesar dessa nova classificação ser útil para o manejo de casos potencialmente graves, a definição ampla do conceito de DG complica os estudos de patogênese da doença (Zompi e Harris, 2012).

1.4. Patogenia e histopatologia das infecções por dengue

As alterações teciduais pela 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 (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Trung *et al.*, 2010). Análises histopatológicas de tecido hepático de pacientes revelaram necrose de hepatócitos, focos de hemorragia e edema, infiltrado mononuclear no espaço periportal e vacuolização do citoplasma. 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). Partículas semelhantes aos DENV (PSD) foram observadas no citoplasma de hepatócitos (Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014). A elevação dos níveis das transaminases - glutâmico pirúvica (TGP) e glutâmico oxalacética (TGO)- 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 das demais enzimas hepáticas, como bilirrubina, fosfatase alcalina e gama glutamil transpeptidase também foram observadas (Kuo *et al.*, 1992).

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 e 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 e Hermon, 1973; Lee, Teo e Low, 2009; Salgado *et al.*, 2010). Análises histopatológicas de amostras de coração provenientes de casos fatais revelaram edema intersticial com infiltrado inflamatório (miocardite) difuso formado principalmente por células mononucleadas e fibroblastos. Processo apoptótico em fibras cardíacas, evidenciado por degradação nuclear e alterações mitocondriais também já foi reportado (Lee, Teo e Low, 2009; Weerakoon *et al.*, 2011; Póvoa *et al.*, 2014). 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).

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

Manifestações neurológicas associadas à infecção pelos DENV possuem um espectro que varia desde sinais e sintomas não específicos a convulsões, meningite e, mais raramente, a síndrome de Guillian-Barré (Lum *et al.*, 1996; Salomon *et al.*, 2000; Cam *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2014). Alterações teciduais, como edema, lesões focais espalhadas, hematoma subdural, cerebelar e hemorragia intracraniana já foram observados em exames de tomografia computadorizada e ressonância magnética (Solomon *et al.*, 2000; Cam *et al.*, 2001; Bhoi *et al.*, 2014). Pleiocitose também já foi observada no líquido cefalorraquidiano (Misra, 2006; Bhoi *et al.*, 2014). Estudos ultraestruturais revelaram PSD no RE de neuroglias e no espaço intersticial entre dois neurônios (Limonta *et al.*, 2012).

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, focos de hemorragia, edema e trombos nos capilares glomerulares. 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 e monócitos circulantes (Jessie *et al.*, 2004; Basílio- de-Oliveira *et al.*, 2005; Póvoa *et al.*, 2014).

Acerca do baço, estudos histopatológicos mostraram disfunções parenquimais proeminentes, com atrofia de folículos linfóides, alteração do padrão estrutural e destruição dos centros germinativos. Sinais de congestão vascular e edema, principalmente na polpa vermelha, também foram observados. Análises por MET revelaram áreas de vacuolização do citoplasma de células intersticiais e danos no endotélio de capilares sinusóides (Limonta *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014). Antígenos virais já foram detectados em macrófagos em circulação na polpa vermelha. Em adição, a detecção da proteína NS3, bem como o RNA viral nessas células são indícios de ocorrência da replicação viral (Balsitis *et al.*, 2009; Jessie *et al.*, 2004; Póvoa *et al.*, 2014).

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

O maior desafio no entendimento da patogênese dos DENV em humanos e no desenvolvimento de uma candidata à vacina e drogas antivirais é a ausência de um modelo

animal experimental adequado, que desenvolva a doença com aspectos semelhantes aos da FHD e SCD, quando inoculados com amostras selvagens isoladas a partir de pacientes com DEN (Bhamarapravati, 1993; Gubler, 2002). Entretanto, 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, produzindo baixa viremia e anticorpos neutralizantes (AN) (Gubler, 1998). Apesar de tal modelo não apresentar sinais clínicos, esse tem sido utilizado para a investigação da resposta imunológica e para testes de imunogenicidade e eficácia de vacinas candidatas antes da fase de testes clínicos (Zompi e Harris, 2012; Sariol e White, 2014; Zellweger, Prestwood e Shresta, 2010).

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 (Zompi e Harris, 2012; Zellweger, Prestwood e Shresta, 2010). A maioria dos modelos propostos utilizam camundongos humanizados ou imunodeficientes, e vias altamente invasivas de inoculação (Faugout *et al.*, 1990; Raut *et al.*, 1996) ou amostras de vírus adaptados (Johnson *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2012), resultando em doença neurológica e paralisia (Costa *et al.*, 2006).

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).

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 e 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 e 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).

1.5.2.2. Camundongos imunodeficientes/interferon-deficientes

Estudos utilizando camundongos interferon deficientes - que não apresentam receptores para IFN α e β e IFN γ (AG129) - observaram que há robusta replicação do DENV nesses animais. Esses modelos, uma vez infectados com vírus neuroadaptados, apresentam sinais neurológicos como paralisia, cegueira, permeabilidade vascular aumentada, níveis significantes de TNF α no soro e morte (Johnson e Roehrig, 1999; Shresta *et al.*, 2006; Prestwood *et al.*, 2008; Milligan *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 a hemorragia, comprometimento de órgãos, hipercitocinemia e morte durante o pico da viremia (Tan *et al.*, 2010; Milligan *et al.*, 2015); 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 apresenta sinais de DG, tais como permeabilidade vascular, elevados níveis de citocinas no soro, trombocitopenia, hematócrito elevado e hemorragia gastrointestinal. O antígeno ou genoma viral pode ser detectado em diferentes órgãos, como

fígado, intestinos delgado e grosso, estômago, rim e cérebro (Balsitis *et al.*, 2010; Zellweger, Prestwood e Shresta, 2010).

1.5.2.3. Camundongos imunocompetentes

Camundongos imunocompetentes infectados com DENV são capazes de produzir viremia (Paes *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006; Yamanaka e Konishi, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012), embora a replicação viral seja menos eficiente em comparação à observada em humanos (Ashour *et al.*, 2010; Morrison e 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 (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).

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

1.5.2.4. 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 se acredite que estes são pouco susceptíveis a infecção pelos DENV (Ashour *et al.*, 2010; Morrison e 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 dia. 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). 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). 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 (Rasinha, 2013; Jácome *et al.*, 2015a,b). Além disso, PSD 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 segura e eficaz tornou-se uma das grandes prioridades da OMS. Apesar dos esforços, o desenvolvimento de uma vacina tetravalente, que garanta uma imunidade protetora de longa duração ainda permanece um desafio, por conta da epidemiologia dos quatro sorotipos do DENV, das complexas e incompreendidas respostas imunoprotetoras e da falta de um modelo animal válido. Apesar dos vários obstáculos, existem atualmente várias vacinas promissoras em fase pré-clínica e clínica de desenvolvimento (Del Angel e Reyes-del Valle, 2013; McArthur, Sztein e Edelman, 2013).

Recentemente, a primeira vacina contra a DEN, Dengvaxia® (tetravalente, atenuada), foi avaliada na fase 3 de ensaios clínicos e aprovada pela OMS para uso em quatro países onde a doença é endêmica (México, Filipinas, Brasil e El Salvador). Desenvolvida pelo laboratório Sanofi Pasteur, esta vacina é baseada no vírus atenuado da vacina contra a febre amarela (cepa vacinal 17D). Genes M e E dos quatro sorotipos de DENV são substituídos no genoma do vetor atenuado (Vannice, Roehrig e Hombach, 2015; Scott, 2016; Vannice, Durbin, Hombach, 2016). Resultados das primeiras fases de testes clínicos foram promissores (Sabchareon, 2012). Embora a vacina reduza a incidência da doença, a eficácia da mesma variou conforme a idade dos participantes, status sorológico, gravidade da DEN e sorotipo infectante, mostrando-se 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). Até o momento, a vacina Dengvaxia® representa o maior avanço na prevenção da DEN em regiões endêmicas (Scott, 2016).

Além desta, outras candidatas à vacina estão sob avaliação clínica e pré-clínica. Com base em diversas tecnologias e em diferentes fases de desenvolvimento, os resultados alcançados em modelos animais são promissores. A tabela 1 apresenta uma visão geral das candidatas à vacina da DEN, com suas respectivas abordagens tecnológicas e estágios de desenvolvimento (Vannice, Roehrig e Hombach, 2015).

Tabela 1. Estágios de desenvolvimento e abordagem tecnológica das vacinas candidatas atuais (Modificada de Vannice, Durbin, Hombach, 2016).

Nome	Antígeno	Desenvolvedor	Pré-clínico ^a	Fase I	Fase II	Fase III
CYD-TDV (Tetravalente/ Atenuada/ Recombinante)	Quimera (cepa 17D do vírus da febre amarela (YF) + genes E e M dos DENV)	Sanofi Pasteur	X	X	X	X
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	X	X	X	X
DENVax (Tetravalente/ Atenuada/ Recombinante)	Quimera (DENV-1/3/4 não modificados + DENV-2 recombinante + DENV-2)	Takeda	X	X	X	
TDENV PIV (Tetravalente/ Inativada)	DENV purificado e inativado	GSK/US WRAIR/Fiocruz	X	X		
DEN-80E (Tetravalente/ Subunidade)	Subunidade da proteína E	Merck	X	X		
TVDV (Tetravalente/ DNA)	Proteínas prM/E expressas em vetor plasmidial	US NMRC	X	X		
TLAV-TPIV (Tetravalente/ Atenuada+ Inativada/ Recombinante)	Combinação vírus atenuado purificado + vírus inativado purificado	US WRAIR	X	X		
-----	Proteínas de fusão (E e C) expressas em E-coli	IPK/CIGB	X			
-----	Proteínas de fusão (E) expressas em baculovírus/células de inseto	VaxInnate	X			
-----	Consenso do domínio III da proteína E expresso em E. coli	NHRI	X			
-----	Proteínas prM/E expressas em vetor plasmidial	US CDC	X			
-----	EDIII-HBsAg <i>virus like particle</i> expresso em <i>P. pastoris</i>	ICGEB	X			
-----	Consenso do domínio III da proteína E e proteína M DENV-1 expressos em vetor do vírus do sarampo	Themis Bioscience/Instituto Pasteur	X			
-----	E85 expresso em vírus da encefalite equina venezuelana	Global Vaccines	X			
-----	DENV inativado + Psoraleno	US NMRC	X			
-----	DENV purificado e inativado	FIOCRUZ	X			
-----	DENV inativado + vírus da encefalite equina venezuelana como adjuvante	Global Vaccines	X			
-----	Quimera DENV (Atenuada)	Universidade Chiang Mai/Universidade Mahidol/NSTDA/BioNet-Asia	X			
-----	Domínio transmembranar da proteína E mutado	Arbovax	X			
-----	DEN-SA 14 14 2	Instituto Beijing	X			

-----	Mutação DENV (2'-O-metiltransferase)	Instituto Novartis de Doenças Tropicais/ Agência de Ciência, Tecnologia e Pesquisa, Singapura	X			
-----	Proteínas prM/E expressas vetor plasmidial + DENV atenuado (Atenuada, DNA)	NMRC/WRAIR	X			
-----	Quimera DENV prM/E + YF 17D (Atenuada, DNA)	FIOCRUZ	x			

^a: Avaliação em curso ou concluída em PNH.

1.7. 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).

Parâmetros ambientais, como temperatura e índices pluviométricos, afetam a demografia e o comportamento do vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*). 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).

1.7.1. Dengue no mundo

Os primeiros relatos de uma doença semelhante à DEN podem ser encontrados em enciclopédias médicas chinesas datadas da dinastia Chin (265 a 420 a.C) e da dinastia Sung (992 a.C) (Gubler, 2006). Chamada de ‘veneno da água’, acreditava-se na época que a doença correlacionava-se de algum modo com insetos voadores associados à água.

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 apenas circulavam entre populações através de viagens marítimas (Gubler e Clark, 1995).

O termo ‘dengue’ foi introduzido na literatura inglesa entre 1827 e 1828 pela rainha da Espanha durante uma epidemia caracterizada por exantema e artralgia. A palavra dengue vem da expressão “*Ki-Dinga pepo*” que significa uma caimbra repentina causada por um espírito mau. Antes vários nomes lhe foram dados, tal qual “*Knokkelkoorts*” em Jacarta (1779).

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, que logo foi substituído por dengue (Gubler, 1997; Halstead, 1992).

A transmissão do DENV pelo artrópode vetor, o mosquito *Ae. aegypti*, foi descrita pela primeira vez em 1906 (Bancroft, 1906 apud Cao-Lormeau, 2009) e, no mesmo ano, determinada a etiologia viral (Ashburn e Craig, 1906 apud Pontes e Ruffino-Netto, 1994). Em 1926, foi possível estudar a transmissão da doença em voluntários e estabelecer o período de incubação em mosquitos (Siler *et al.*, 1926 e Simmons *et al.*, 1931 apud Schlesinger, 1977).

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) (Gubler e 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 e 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 e 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 e Kouri, 2003).

Nas últimas décadas, a incidência de DEN tem crescido dramaticamente no mundo, com mudanças no perfil epidemiológico (Wilson e 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 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).

A Figura 5 mostra a atual distribuição global do risco de infecção pelos DENV (WHO, 2014).

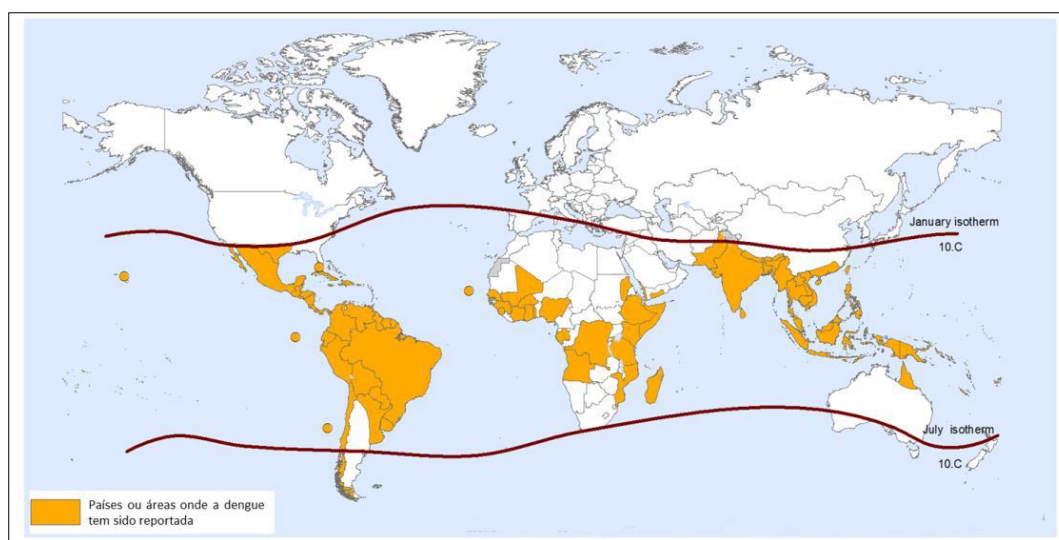


Figura 5. Países ou áreas de risco de infecção por DENV. As linhas da faixa isotermal de janeiro e julho indicam as áreas de risco de infecção por DENV, definidas pelos limites geográficos dos hemisférios norte e sul para a sobrevivência durante todo o ano do mosquito *Aedes aegypti*, o principal vetor da dengue. (Modificado de WHO, 2014).

1.7.2. Dengue no Brasil

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

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

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

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 259.392 casos no estado do RJ (Secretaria de Vigilância Sanitária [SVS], 2009) e um novo perfil epidemiológico, com a ocorrência de casos graves em crianças (Teixeira *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011). Em 2009, o DENV-1 substituiu o DENV-2 como sorotipo predominante no país, ocasionando uma grande epidemia, com mais de 1 milhão de casos no ano de 2010 (SVS, 2010).

Em julho de 2010, o DENV-4 reemergiu no estado de Roraima, cerca de 30 anos após a sua primeira detecção no país (Temporão *et al.*, 2011). Em 2011 e 2012, o DENV-4 se tornou o sorotipo predominante e, em 2013, foram registrados 1.476.917 casos de DEN, 6.566 casos graves e 573 óbitos. Em 2014 foram registrados no país 572.308 casos da doença, 673 casos de DG 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 1.426.065 casos prováveis

de DEN no país até a Semana Epidemiológica 32 (3/1/2016 a 13/08/2016), com 728 casos de DG e 7.105 casos de DEN com sinais de alerta. Foram confirmados 509 óbitos por DEN, o que representa uma redução no país de 37% em comparação com o mesmo período de 2015, quando foram confirmados 814 óbitos. A região com maior número de casos confirmados de DG e de dengue com sinais de alarme é a região Sudeste, com 388 e 3.419 casos, respectivamente. Em relação aos sorotipos circulantes no país nos últimos dois anos, estudos soropidemiológicos apontam a predominância do DENV-1 (90%), seguido do DENV-2 (5,7%), DENV-4 (3,3%) e DENV-3 (1%). (SVS, 2015, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

A circulação do DENV-3 foi identificada em 2000, no estado do Rio de Janeiro. Em 2002, esse sorotipo foi responsável pela maior e mais grave epidemia no país, com 771.551 casos registrados correspondendo a 80% dos casos ocorridos nas Américas (Nogueira *et al.*, 2002).

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, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) demonstram que camundongos BALB/c imunocompetentes, quando infectados experimentalmente com DENV-1 e 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. O antígeno viral foi detectado em amostras de fígado, em células endoteliais e hepatócitos (Barreto *et al.*, 2004, 2007, 2009; Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005, 2009). Ademais, sendo objeto de estudo do Laboratório de Morfologia e Morfogênese 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).

Neste trabalho, realizamos infecções experimentais de camundongos BALB/c com uma cepa de DENV-3 isolada de caso humano durante a epidemia de 2008, no estado do Rio de Janeiro, não neuroadaptada e avaliamos as alterações morfológicas nos tecidos, assim como a quantificação da carga viral nos mesmos. Com este estudo, espera-se colaborar com

informações no sentido de preencher lacunas sobre a patogênese dos DENV, assim como propor um modelo para testes de candidatas a vacinas e fármacos contra os DENV.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar possíveis alterações morfológicas, assim como a presença do RNA do DENV em diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV-3

3.2. Objetivos Específicos

- Observar possíveis alterações morfológicas em fígado, pulmão, coração, cerebelo e rim de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com o DENV-3 pela via intravenosa, buscando semelhanças com casos humanos de DEN.
- Verificar a presença do DENV assim como sua biossíntese em células de diferentes órgãos de camundongos infectados.
- Detectar e quantificar o RNA viral a partir de amostras de macerado de diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV-3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

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 e LW-50/11) (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 Instituto Oswaldo Cruz (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}TCID₅₀/1mL. Após as passagens, o sorotipo infectante foi confirmado pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpo monoclonal específico para DENV-3 (8A1) (Henchal *et al.*, 1982).

4.3. Camundongos BALB/c

Para as infecções experimentais, foram utilizados 60 camundongos BALB/c machos de 2 meses de idade, pesando entre 20 e 25 gramas e obtidos através do Centro de Criação de Animais em Laboratório (CECAL) da Fiocruz. Durante os experimentos, os camundongos foram mantidos no Biotério do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira do IOC, Fiocruz, onde temperatura (~20°C), fotoperíodo (12h/12h), alimentação e hidratação foram rigorosamente controlados. 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 ambientes separados dos infectados.

Segue abaixo o desenho experimental deste estudo (Figura 6).

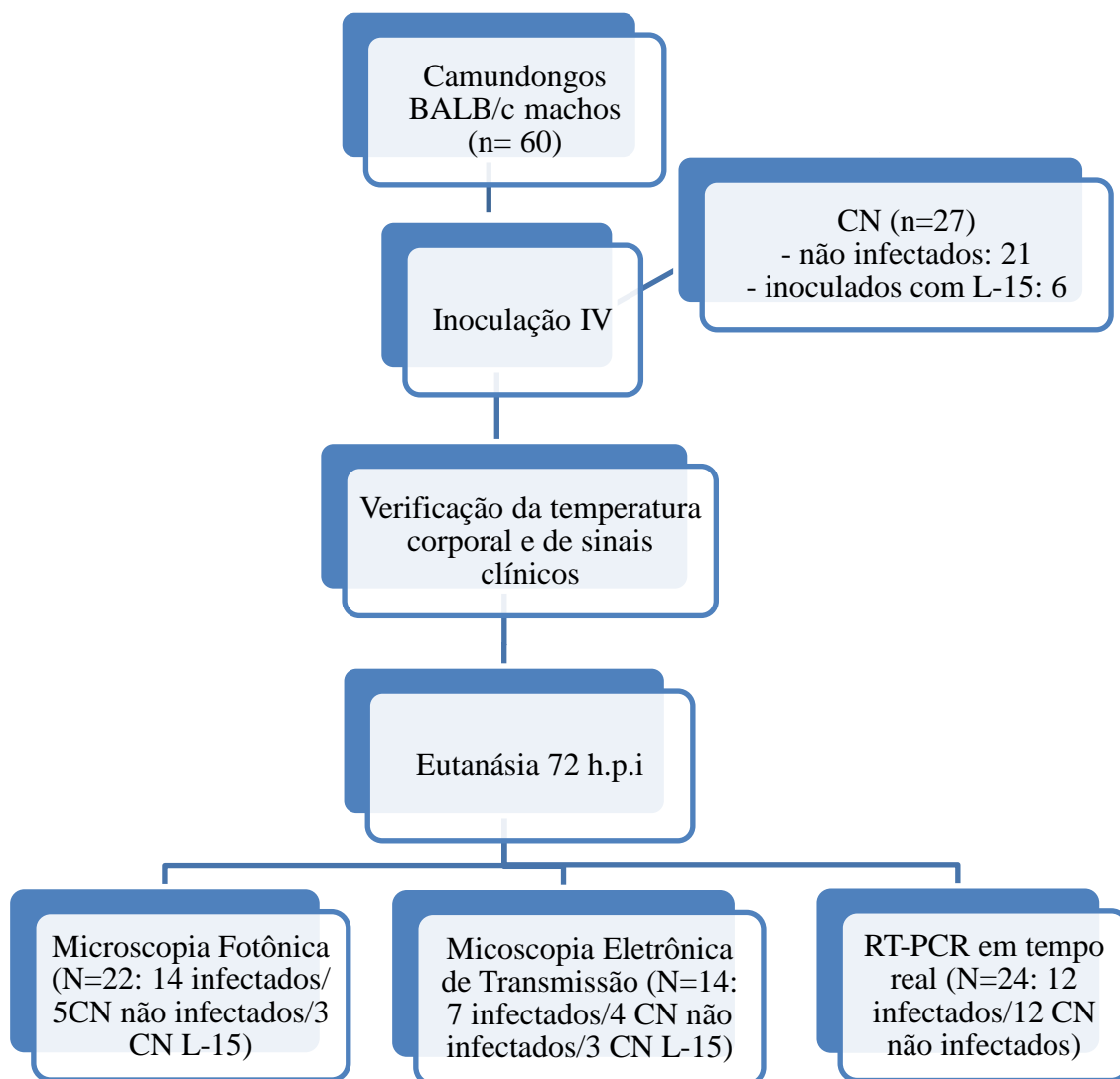


Figura 6: Fluxograma do desenho experimental para as infecções de camundongos BALB/c machos com o DENV-3. IV: intravenosa, CN: controle negativo, h.p.i: horas após infecção. L-15: meio Leibovitz

4.4. 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 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 foi inoculada com 100 µL de meio Leibovitz (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. Verificação de temperatura corporal e sinais clínicos associados à infecção

Os animais foram cuidadosamente contidos e a temperatura corporal foi verificada com auxílio de um termômetro lubrificado com óleo mineral inserido no reto, onde foi mantido por 3 minutos. As temperaturas, tanto dos animais controles quanto dos infectados foram verificadas previamente à inoculação com DENV-3 e 72 horas pós-infecção (p.i).

Os animais infectados foram observados (antes da inoculação e 72 horas p.i.) quanto à presença dos seguintes sinais clínicos: tremores, petéquias, diarreia e óbito. Todos os dados coletados foram registrados em fichas.

4.4.3. Eutanásia

Após 72 h.p.i, os animais foram anestesiados com 150µL de Hypnol 3% 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. Com os órgãos já expostos, cada um deles foi coletado e acondicionado de maneira diferente, dependendo do objetivo final, conforme descrito a seguir.

- *Análises em microscopia fotônica* (N=22: 14 infectados/5 CN não infectados/ 3 CN L-15). Amostras de pulmão, fígado, cerebelo, rim e coração foram coletadas após a eutanásia,

clivadas, acondicionadas em tubos falcon de 50 mL estéreis contendo o fixador Millonig pH 7,4 e encaminhadas para o Laboratório de Patologia, IOC, Fiocruz, onde foram estocadas a 4°C até o momento do processamento.

- *Análises em microscopia eletrônica de transmissão* (N=14: 7 infectados/4 CN não infectados/3CN 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 seguirá até a altura do esterno, 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 falcon estéreis devidamente etiquetados e fixados por imersão em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio a 0,2 M, pH 7,2. As amostras foram estocadas a 4°C até o momento do processamento.

- *Análises moleculares por RT-PCR em tempo real* (N=24: 12 infectados/12 CN não infectados). Amostras de pulmão, fígado, cerebelo, rim e coração foram coletadas após a eutanásia, acondicionadas em tubos falcon de 50 mL estéreis e devidamente etiquetados e estocadas em freezer -70°C até o momento da extração do ácido nucleico viral.

Todos os procedimentos foram executados em cabine de segurança 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.

4.5. Processamento de amostras para análise em microscopia fotônica.

Após a coleta, os órgãos fixados por imersão em Formalina Millonig pH 7,4 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 faca de teflon descartável acoplada a um micrótomo (*Leica 2025*), coradas com hematoxilina e eosina e observadas em microscópio fotônico (*Zeiss Axiophot*). Todo o processamento de tecidos objetivando análises por microscopia fotônica foi realizado em colaboração com o Laboratório de Patologia, IOC/Fiocruz.

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

Após o procedimento de fixação por perfusão os órgãos foram cuidadosamente coletados, pós-fixados por imersão em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio a 0,2M pH 7,2 e estocados em geladeira até o momento do processamento.

Clivagem. O material foi clivado 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.

Pós-fixação por Tetróxido de Ósmio. Após a clivagem, os fragmentos de tecidos foram lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,2M em sacarose a 7%, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% e novamente lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,2M em sacarose a 7% e água destilada.

Desidratação e Inclusão. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, de 15%, 30%, 50%, 70% em acetato de uranila a 1%, 90% e 100% em sulfato de cobre (super seca). Uma vez desidratadas, estas foram 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.

4.6.1. Ultramicrotomia

- *Secções semifinas.* As secções semifinas (0,5µm de espessura) foram obtidas utilizando uma faca de diamante (*DiATOME*) adaptada ao ultramicrótomo *Reichert-Jung E Ultracut*. Os cortes foram coletados e acondicionados em lâminas de vidro. As lâminas contendo os cortes foram colocadas sobre a uma chapa de platina aquecida a 60°C, durante dois minutos para que os mesmos se fixassem e logo depois, esses foram corados com solução de 1% de azul de metileno em solução de borato de sódio a 1% e 1% de azur II em água destilada (Richardson *et al.*, 1960 modificado; Humphrey & Pittman, 1974) e analisados em microscópio fotônico (*Zeiss Axiophot*).

- *Secções ultrafinas.* As 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 secos, as secções foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (técnica de contrastação positiva). A técnica consiste na aplicação de sais de metais pesados que reagem com componentes celulares de baixo número atômico, contrastando-os (Reynolds, 1963).

Inicialmente, as alíquotas de acetato de uranila e citrato de chumbo utilizadas, foram centrifugadas por 1 minuto a 3000 rotações por minuto (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 Zeiss EM-900. Todo o procedimento foi executado em capela de exaustão química.

4.7. Extração de Ácido Nucleico

Para a extração de ácidos nucleicos, amostras de fígado, coração, baço, pulmão, rim e cerebelo foram maceradas em 500 μL de meio de cultura L-15 (Sigma, Alemanha) suplementado com penicilina-streptomicina a 2% e fungizona a 1% (Invitrogen, EUA) e centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm, a uma temperatura de 4°C. A extração foi realizada a partir de 140 μL do sobrenadante dos órgãos macerados, utilizando-se o conjunto comercial de diagnóstico *QIAmp Viral RNA minikit* (Qiagen, Alemanha). 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 ($3,9 \times 10^5$ TCID₅₀/0.1mL), gentilmente cedida pelo Laboratório de Referência em Flavivírus. O protocolo empregado segue o recomendado pelas instruções do kit *SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR* (Invitrogen, EUA), 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'-ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG-3' BHQ-1).

Para a reação de amplificação, uma mistura de reação foi preparada utilizando 1 µL de cada iniciador a 50µM; 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 5mM e 0,75 µL da sonda a 9 uM. Numa microplaca óptica (PE Applied Biosystems, Califórnia, EUA), 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* (Invitrogen, EUA) 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* (Bioer, 44 China), para a reação de qRT-PCR, seguindo os parâmetros de ciclagem disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da qRT-PCR, de acordo com as recomendações do fabricante.

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

5. RESULTADOS

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

5.1. Análise histopatológica de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Análises histopatológicas de pulmão de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) demonstraram bronquíolos, alvéolos e septos intralveolares sem quaisquer alterações, bem como a presença de eritrócitos contidos nos capilares sanguíneos (Figura 7).

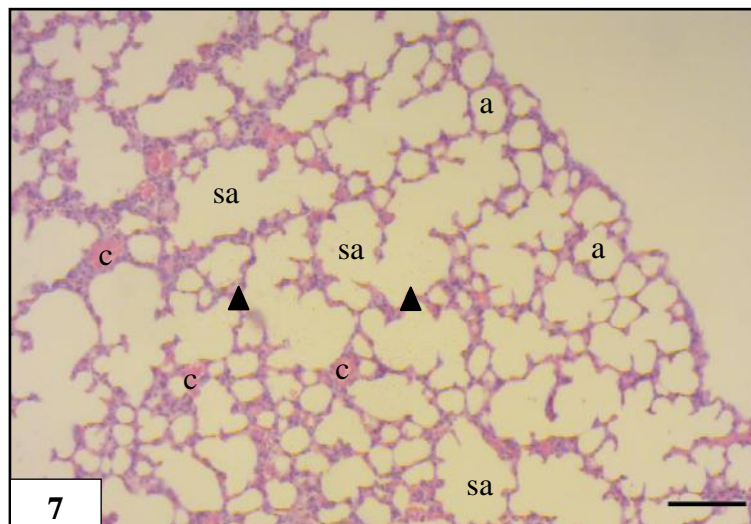
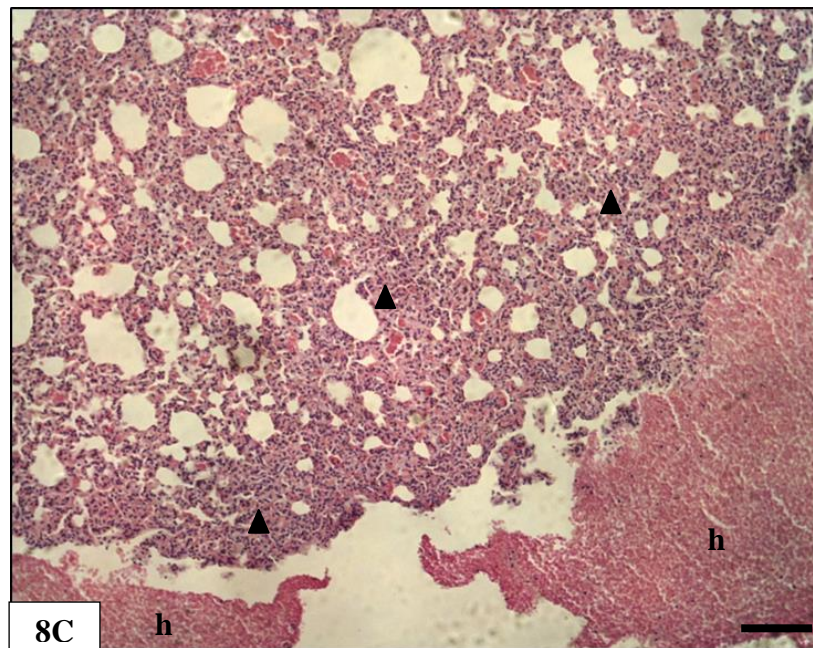
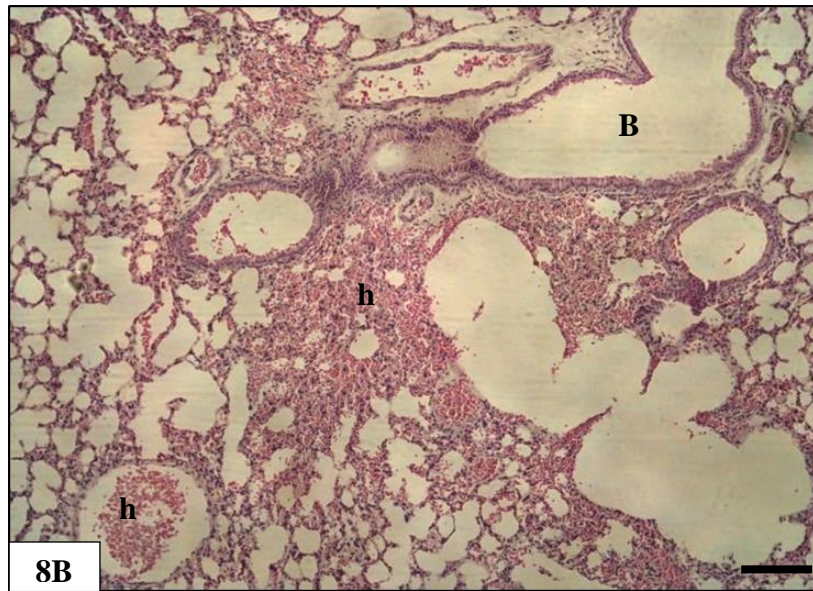
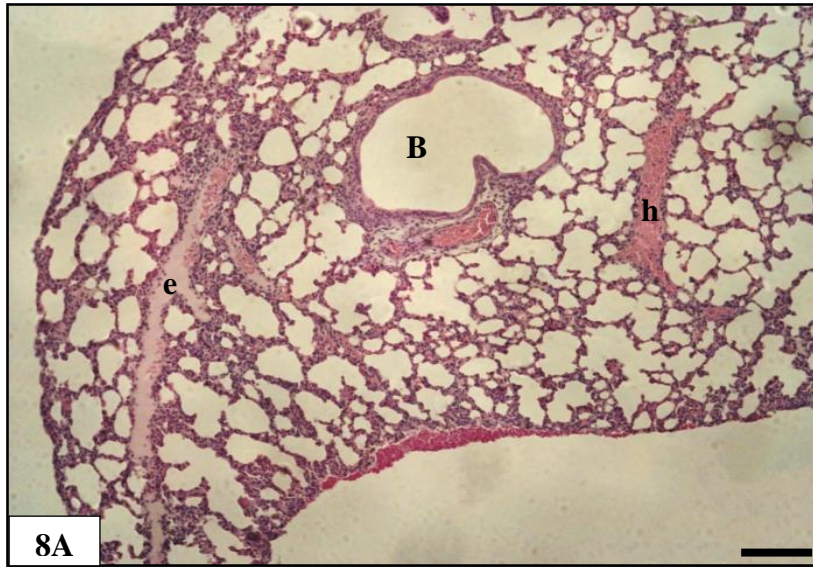


Figura 7: Secção histológica de pulmão de camundongo BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina. Alvéolos (a) e saco alveolares (sa) com ausência de eritrócitos em seu lúmen, septos intralveolares (▲) bem preservados e presença de eritrócitos contidos nos capilares sanguíneos (c). Barra= 100µm

As análises de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i. com DENV-3 revelaram infiltrado inflamatório no espaço peribronquiolar, focos de hemorragia no septo interalveolar e em bronquíolos, espessamento de septos interalveolares com presença de células inflamatórias (pneumonia intersticial) e acúmulo de líquido no bronquíolo respiratório (Figuras 8A-8D).



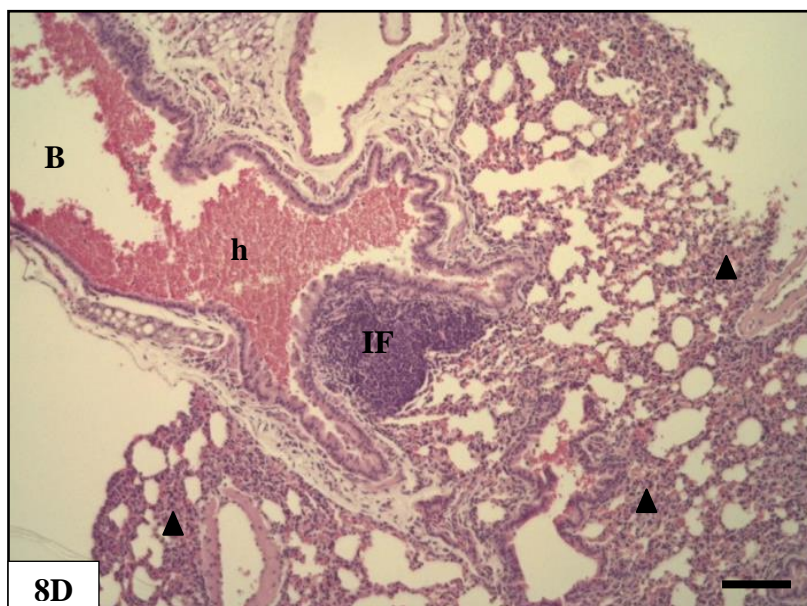


Figura 8A-8D: Secções histológicas de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i por DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Presença de líquido (e) no bronquíolo respiratório [A]. Foco de hemorragia (h) no septo interalveolar [B] e bronquíolo (B) [B,C]. Espessamento de septo interalveolares (▲) [C, D]. Infiltrado inflamatório (IF) no espaço peribronquiolar [D]. Barras (A, B, C, D) = 200 μ m.

5.2. Análise ultraestrutural de pulmão de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Análises ultraestruturais de pulmão de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram alvéolos, células intersticiais e septo interalveolar preservados, bem como a presença de eritrócitos e célula endotelial contidos no capilar sanguíneo (Figura 9).

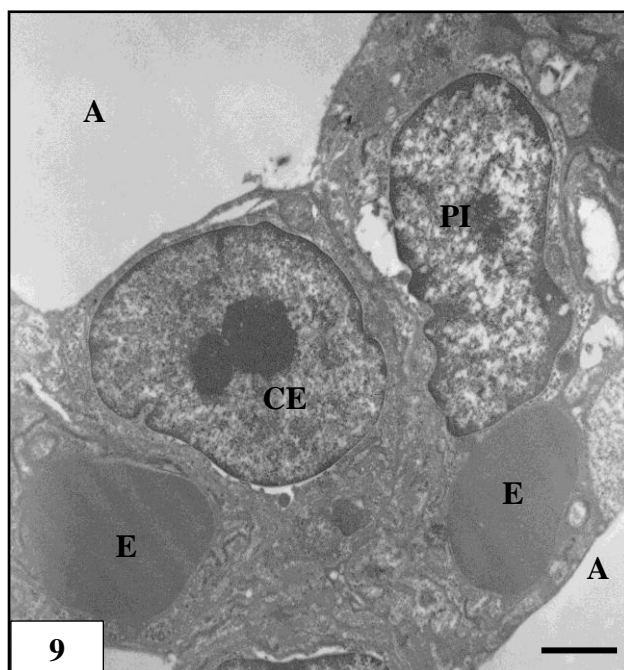
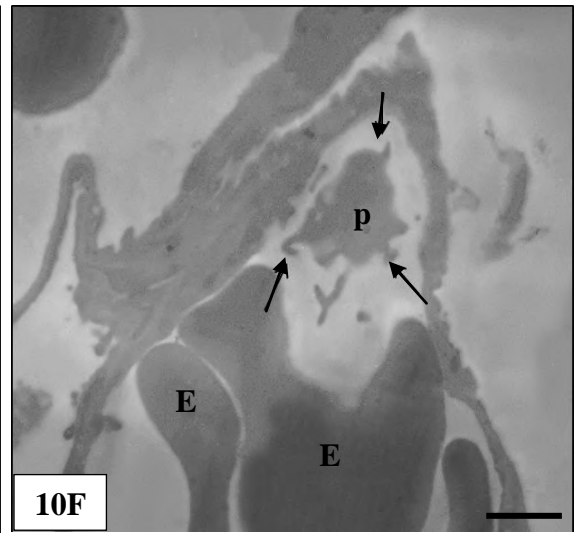
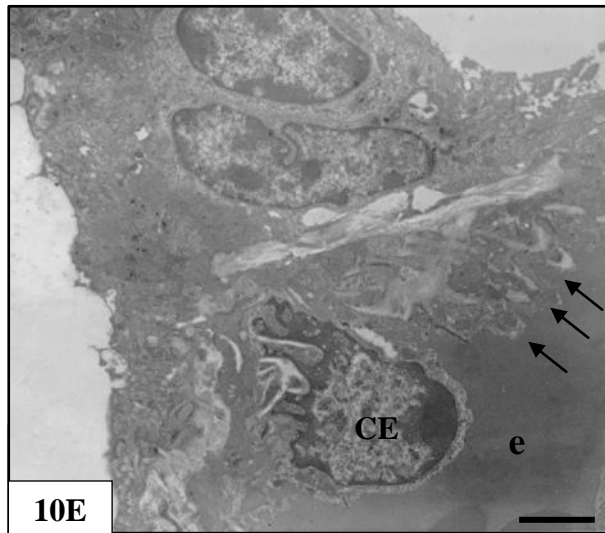
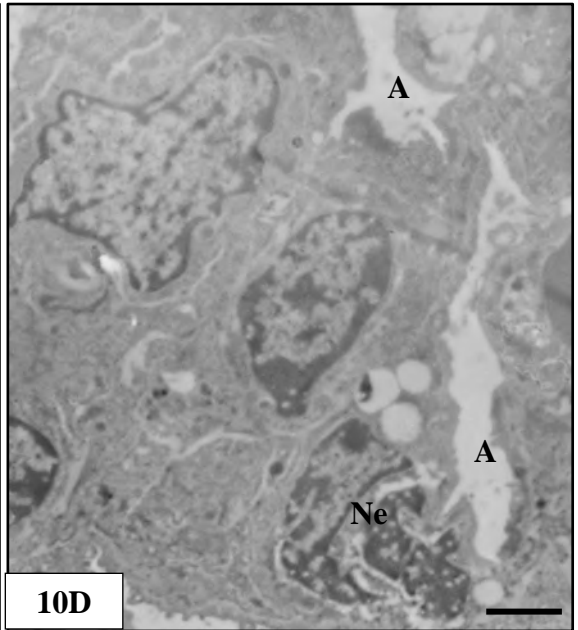
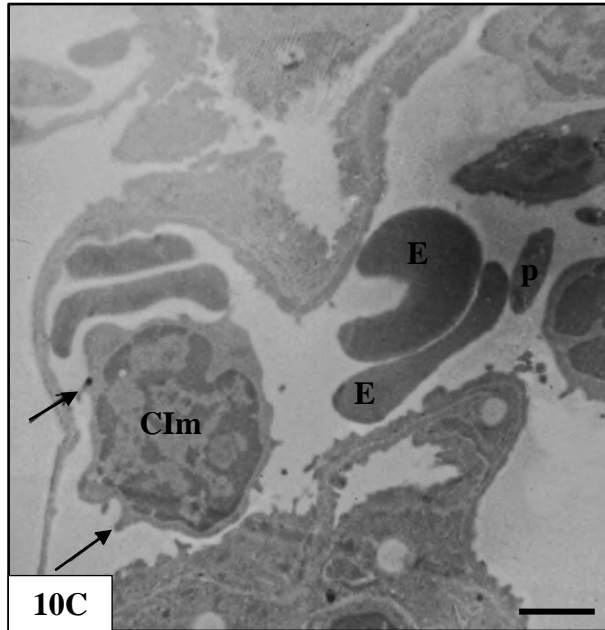
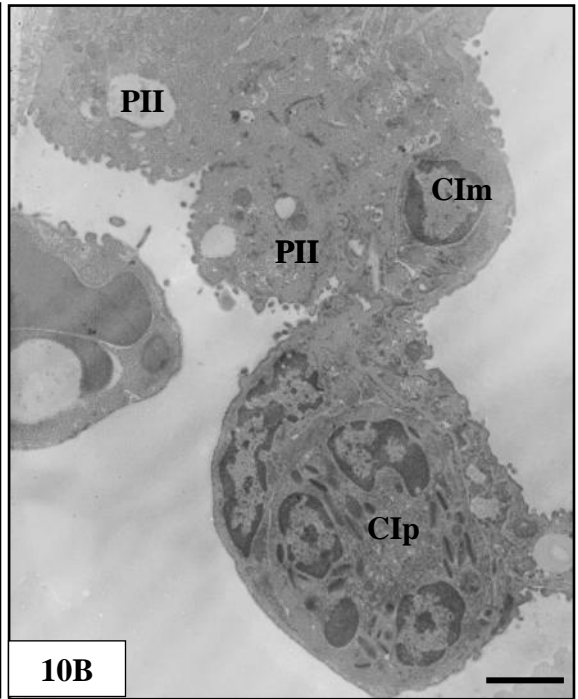
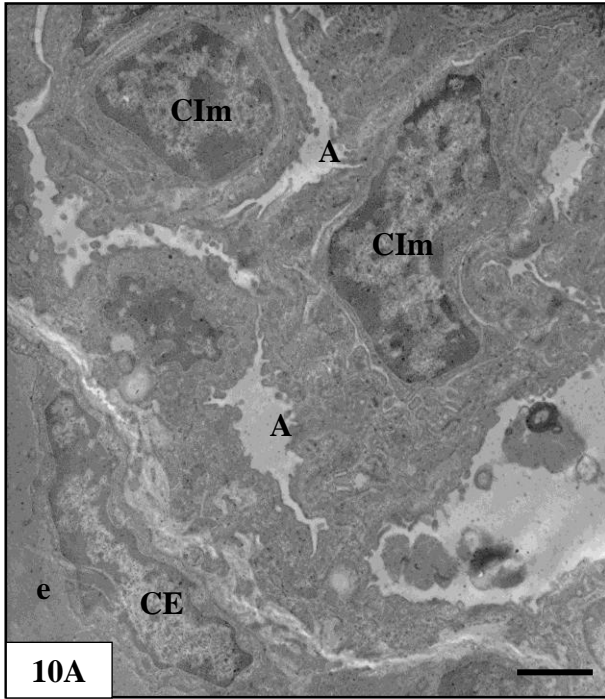
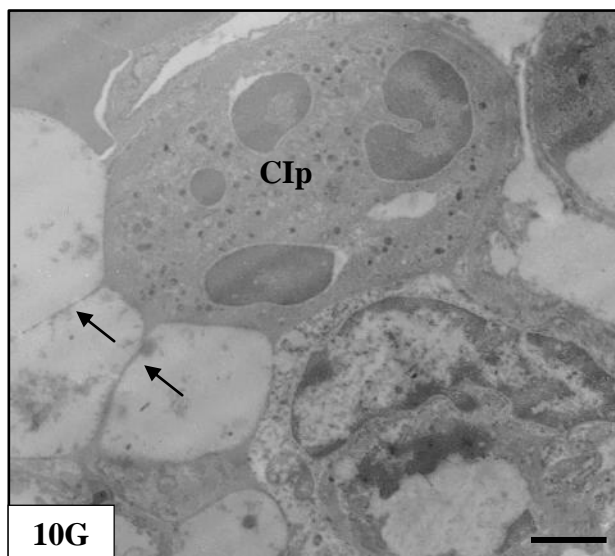


Figura 9: Secção ultrafina de pulmão de camundongo BALB/c não infectado contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Alvéolos (A), septo intralveolar, pneumócito do tipo I (PI). Célula endotelial (CE) e eritrócitos (E) contidos no capilar. Barra= 5 μ m

As análises ultraestruturais de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i. com o DENV-3 revelaram espessamento de septo interalveolar devido à presença de células inflamatórias mononucleadas e polimorfonucleadas (pneumonia intersticial), acúmulo de líquido nos capilares, sinais de necrose de células intersticiais e presença de plaquetas e células inflamatórias mononucleadas circulando nos capilares. Além disso, foi observada a ativação de células endoteliais, plaquetas, célula inflamatória mononucleada e de célula inflamatória polimorfonucleada do tipo neutrófilo, evidenciada pela emissão de prolongamento da membrana citoplasmática (Figuras 10A-10G).





Figuras 10A-10G: Secções ultrafinas de pulmão de camundongos BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Compressão alveolar (A) devido ao espessamento dos septos intralveolares [A, D] pela presença de células inflamatórias mononucleares (CIm). Presença de célula inflamatória polimorfonuclear (Cip) do tipo eosinófilo no interstício [B]. Necrose (Ne) de célula intersticial [D]. Ativação de célula endotelial (CE) [E], célula inflamatória mononuclear [C], plaqueta (p) [F] e célula inflamatória polimorfonuclear do tipo neutrófilo [G] no capilar, caracterizada pela emissão de prolongamentos da membrana citoplasmática (setas). Eritrócitos (E). Pneumócito do tipo II (PII). Barras (A,B,C,D,E) = 5 μ m. (F) = 1,5 μ m. (G)= 3,5 μ m.

5.3. Análise histopatológica de coração de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Análises histopatológicas de coração de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram cardiomiócitos de diâmetro normal, arranjados em feixes paralelos, com ausência de infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo no interstício (Figura 11).

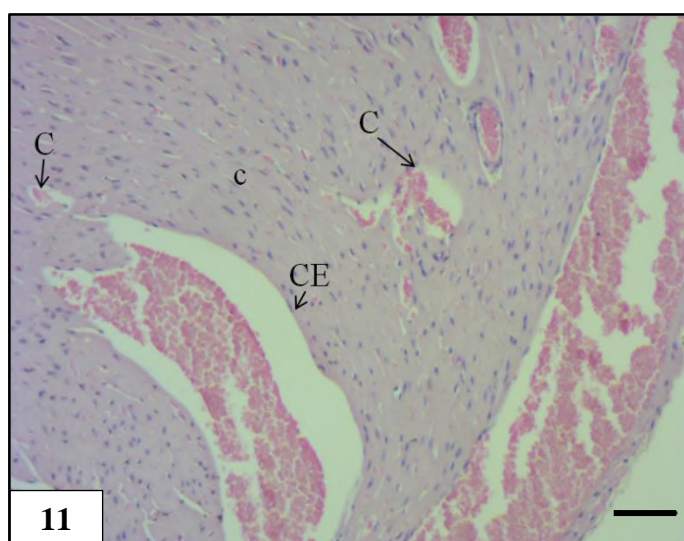
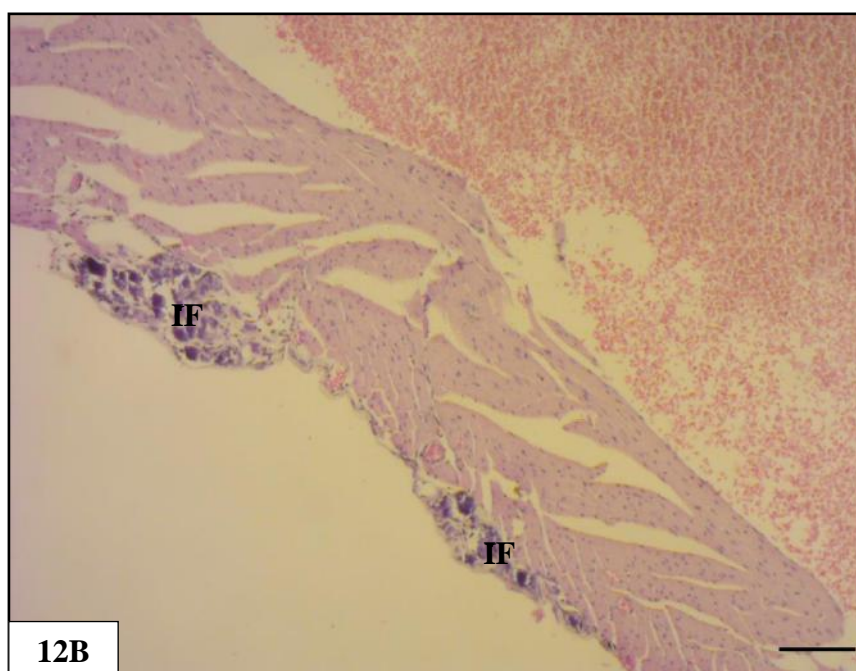
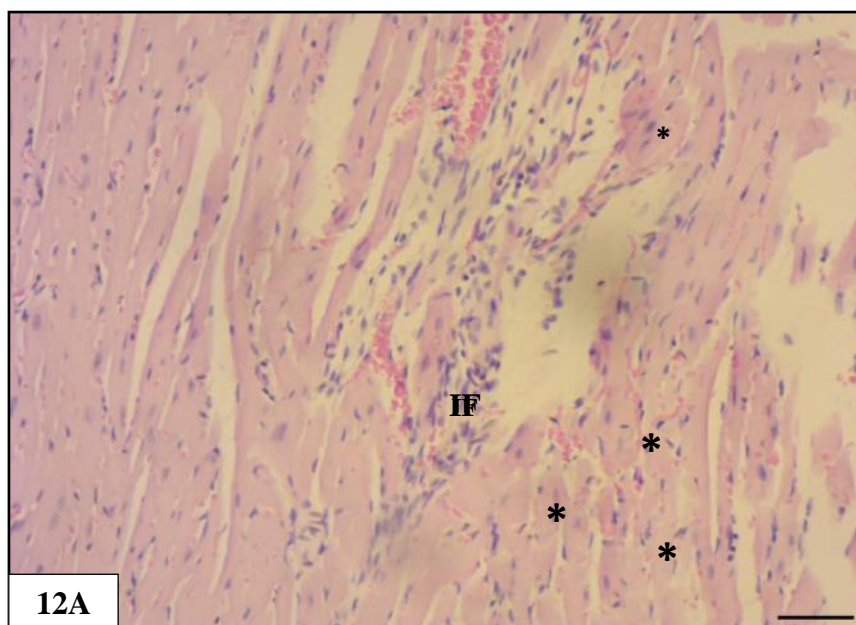
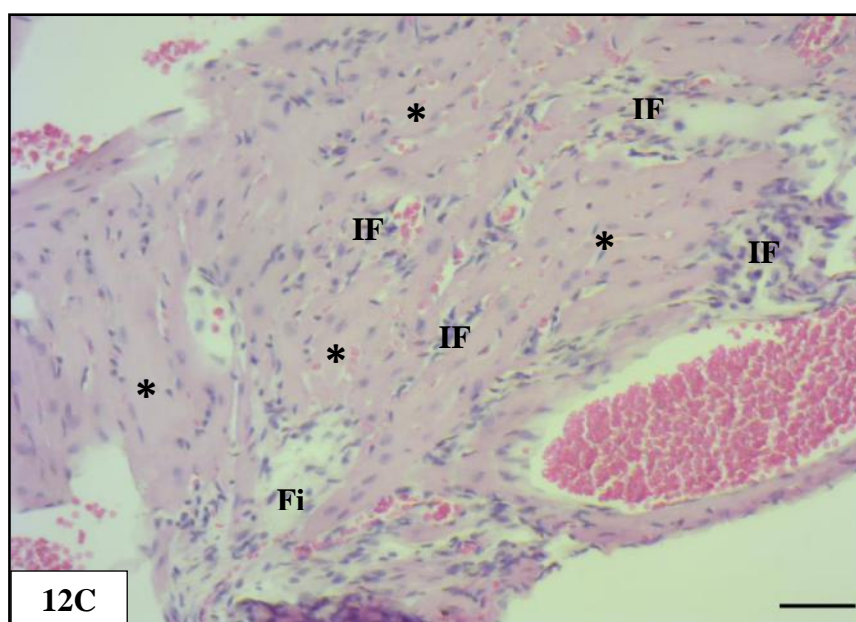


Figura 11: Secção histológica de coração de camundongo BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina. Área tecidual bem preservada, sem alterações histopatológicas. Cardiomiócitos (c), capilar sanguíneo (C), célula endotelial (CE). Barra= 100 μ m.

Análises histopatológicas de coração de camundongos BALB/c 72 h.p.i. com DENV-3 revelaram presença de infiltrado inflamatório no interstício, sinais de hipertrofia, com leve fibrose intersticial e desarranjo da arquitetura das fibras do miocárdio, que se apresentaram dispostas de maneira irregular, em várias direções (Figuras 12A-C).





Figuras 12A-12C: Secções histológicas de coração de camundongos BALB/c 72 h.p.i. com DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Presença de infiltrado inflamatório no interstício (IF) [A,B,C]. Sinais de hipertrofia (*) [A,C] e fibrose intersticial (Fi) [B]. Barras=100 μ m.

5.4. Análise ultraestrutural de coração de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Análises ultraestruturais de coração de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram áreas teciduais totalmente preservadas, com fibras cardíacas e cardiomiócitos sem qualquer alteração (Figura 13).

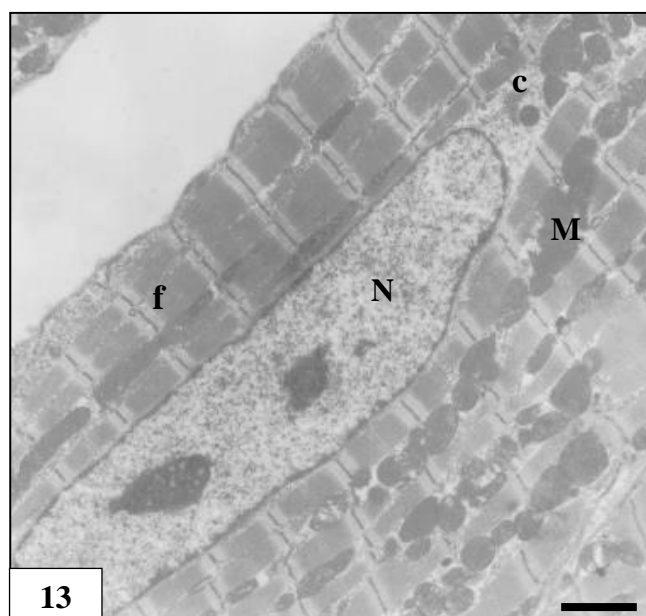
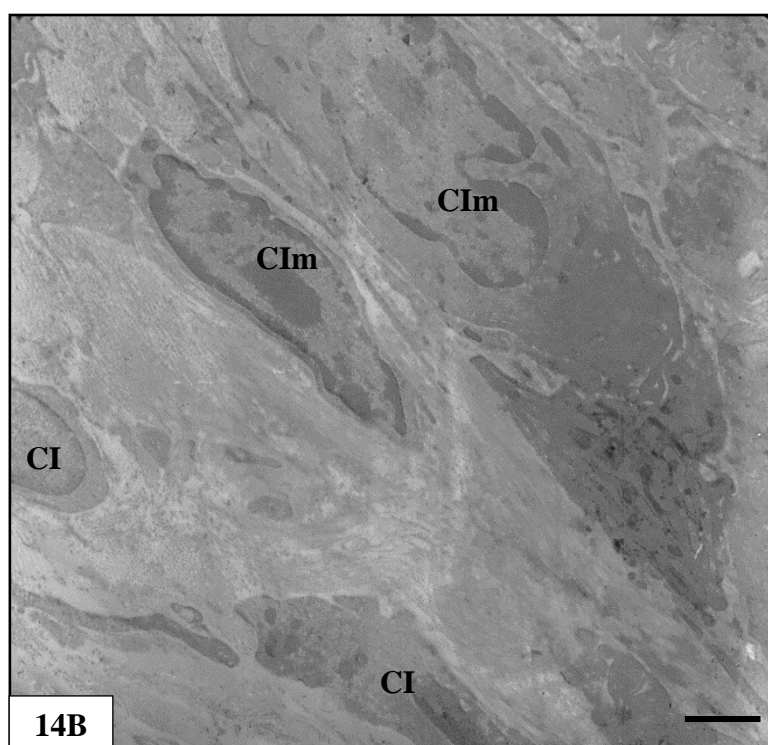
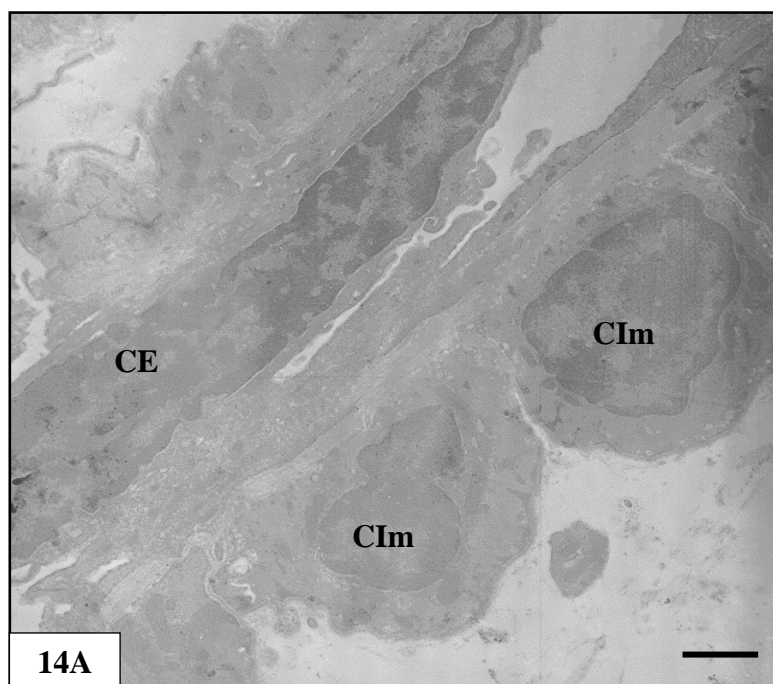
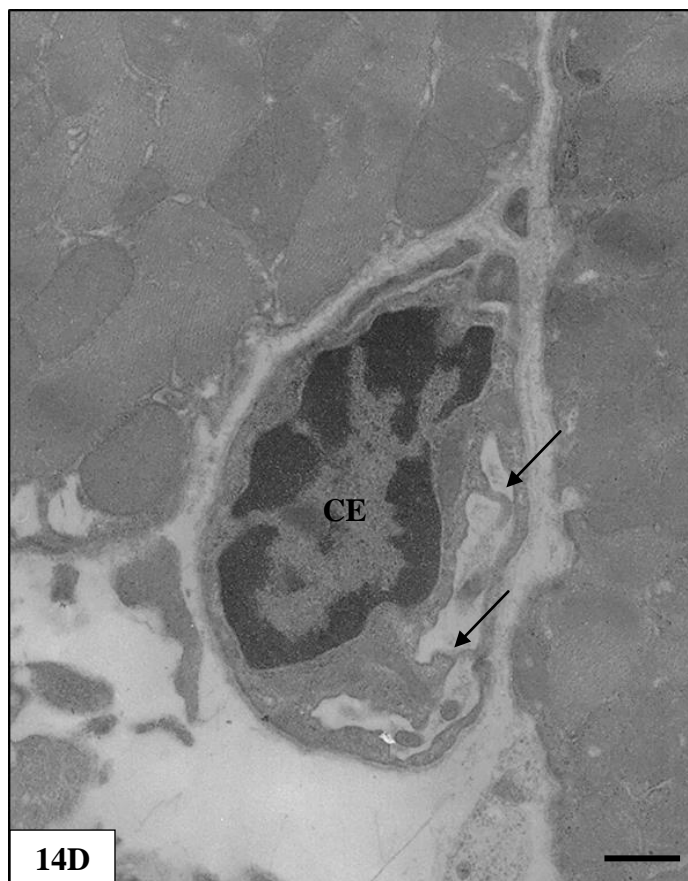
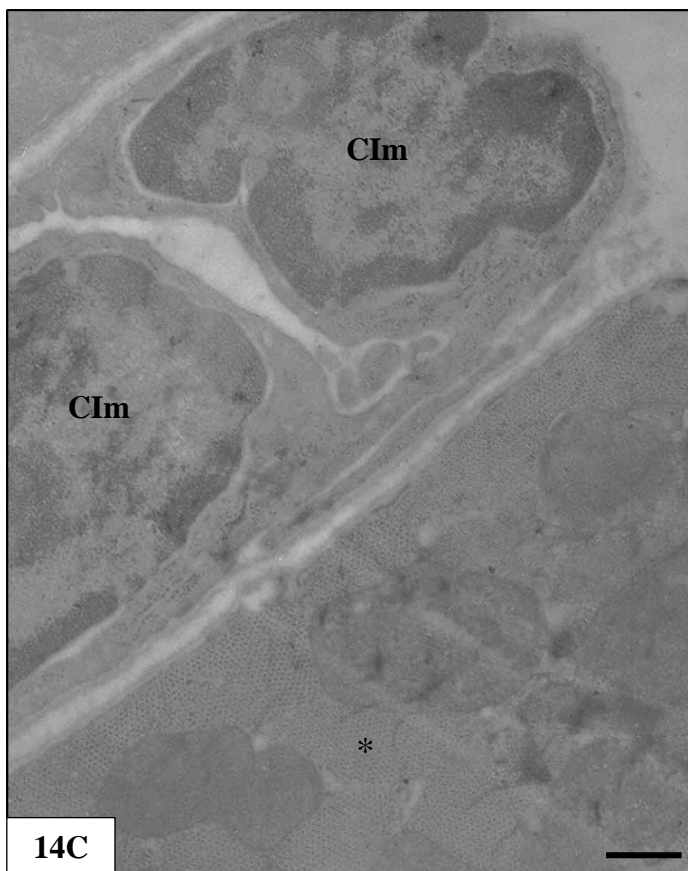
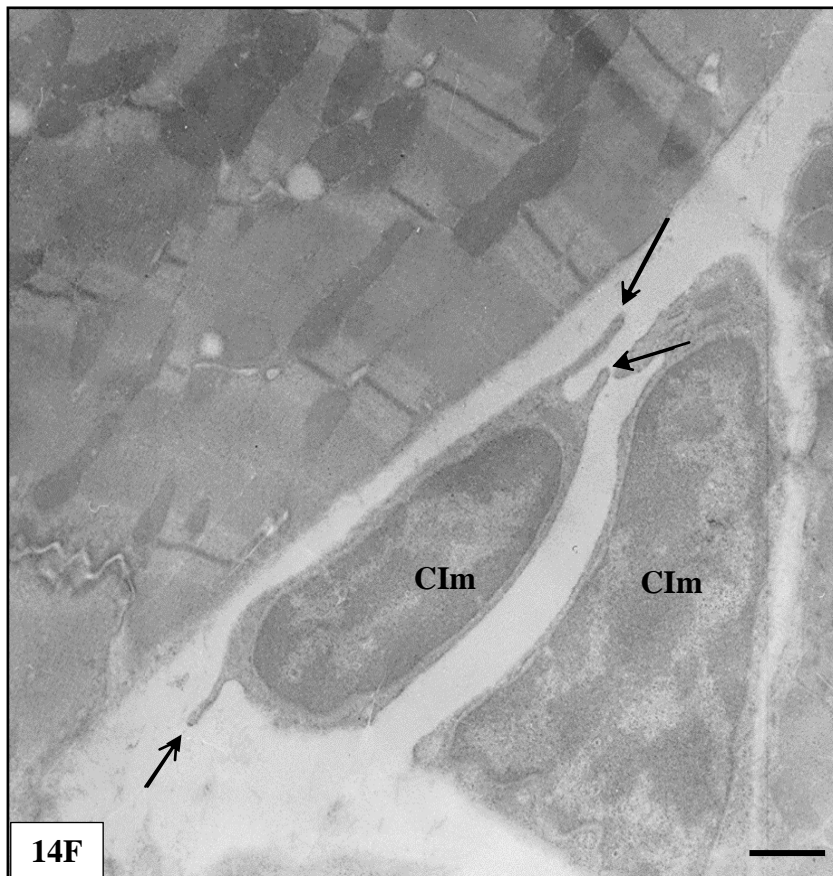
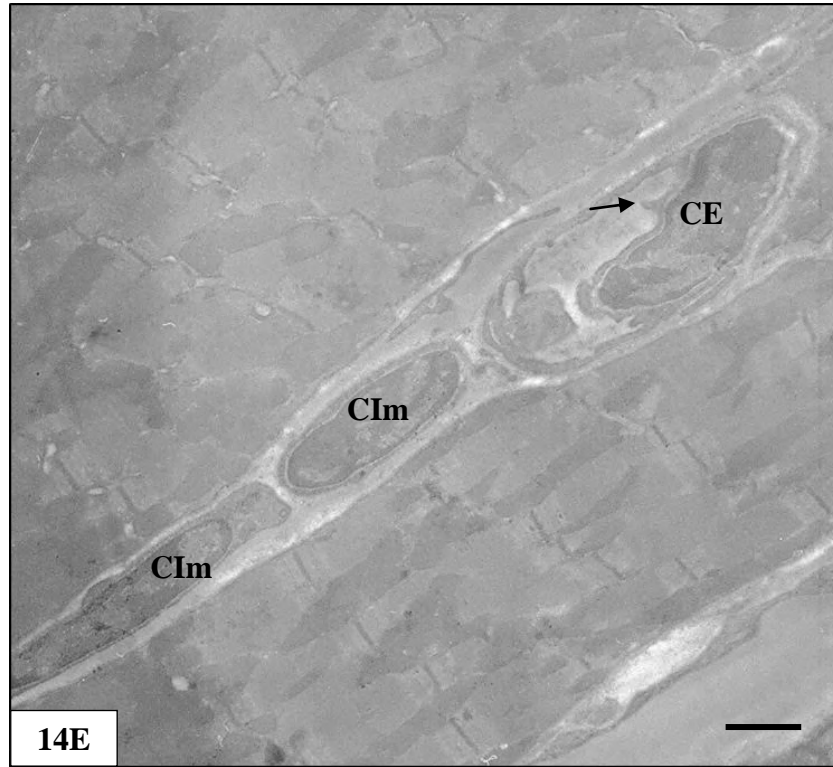


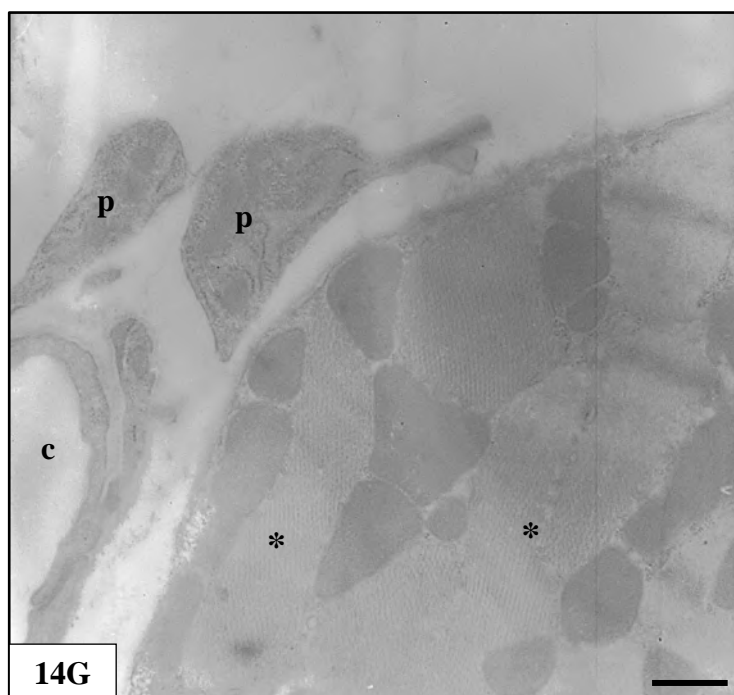
Figura 13: Secção ultrafina de coração de camundongo BALB/c não infectado contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Área bem preservada, sem alteração ultraestrutural. Cardiomiócito (c), núcleo (N), fibras cardíacas (f), mitocôndrias (M). Barra = 5 μ m.

Análises ultraestruturais de coração de camundongos infectados experimentalmente com DENV-3 demonstraram alterações pontuais havendo áreas do tecido preservadas. As principais alterações observadas foram: presença de inúmeras células inflamatórias mononucleadas e plaquetas no interstício, desorganização das fibras cardíacas e sinais de ativação do endotélio e de células inflamatórias mononucleadas, evidenciada pelo espessamento do citoplasma de células endoteliais e emissão de prolongamento da membrana citoplasmática de células endoteliais e células inflamatórias mononucleadas (Figuras 14A-G).





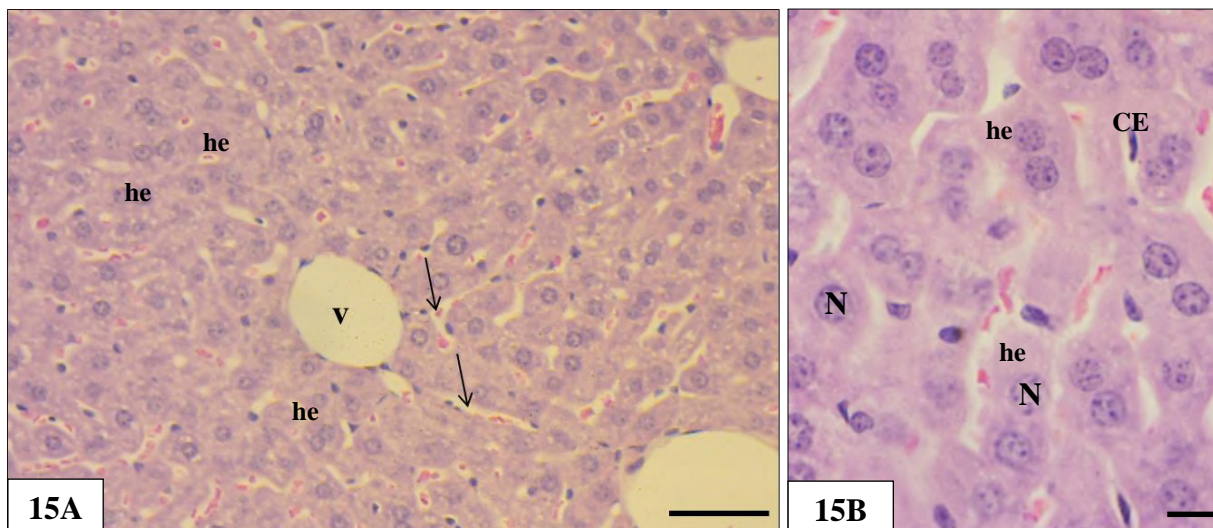




Figuras 14A-14G: Secções ultrafinas de coração de camundongos BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Presença de células inflamatórias (CI) e células inflamatórias mononucleares (CI_m) no interstício [A, B, C, E, F]. Desorganização de fibras cardíacas (*) [C, G]. Ativação de células endoteliais (CE) evidenciada pela emissão de prolongamentos de membrana plasmática (setas) [D, E] e pelo espessamento de citoplasma [D]. Ativação de célula inflamatória mononuclear também foi observada [F]. Plaquetas (p) circulando fora do capilar sanguíneo (c) [G]. Barras (A, B) = 3,5 μ m. (C, D, E, F) = 1,5 μ m. (G) = 2,5 μ m.

5.5. Análise histopatológica de fígado de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Análises histopatológicas de fígado de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) demonstraram ausência de alterações histopatológicas no interstício, com eritrócitos contidos nos vasos e/ou capilares sinusóides, bem como a arquitetura do hepatócito bem preservada (Figuras 15A-15B).

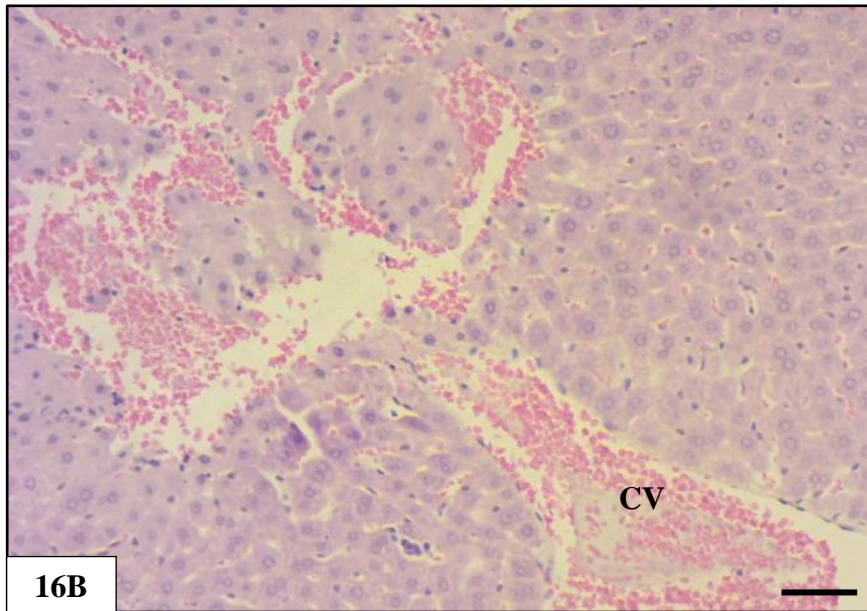
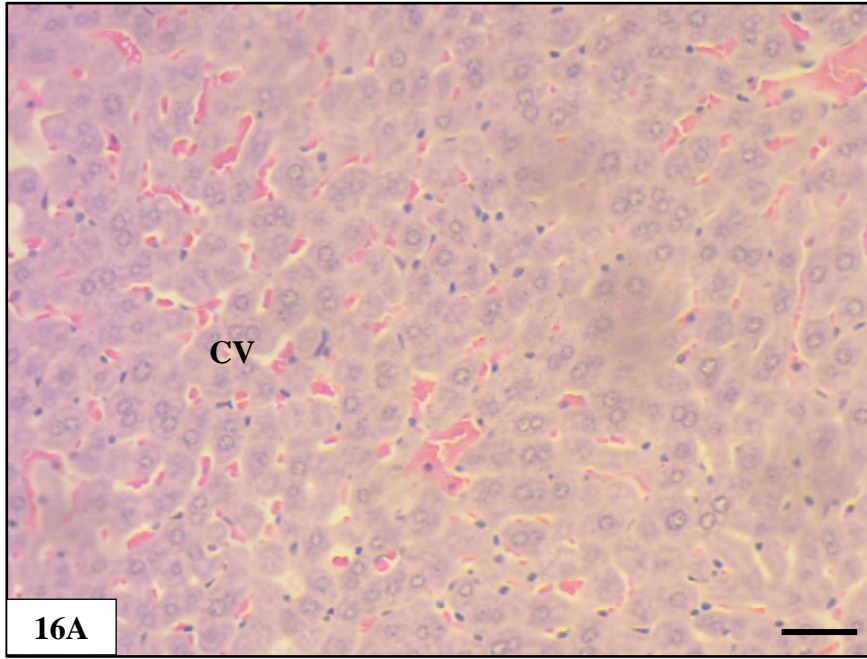


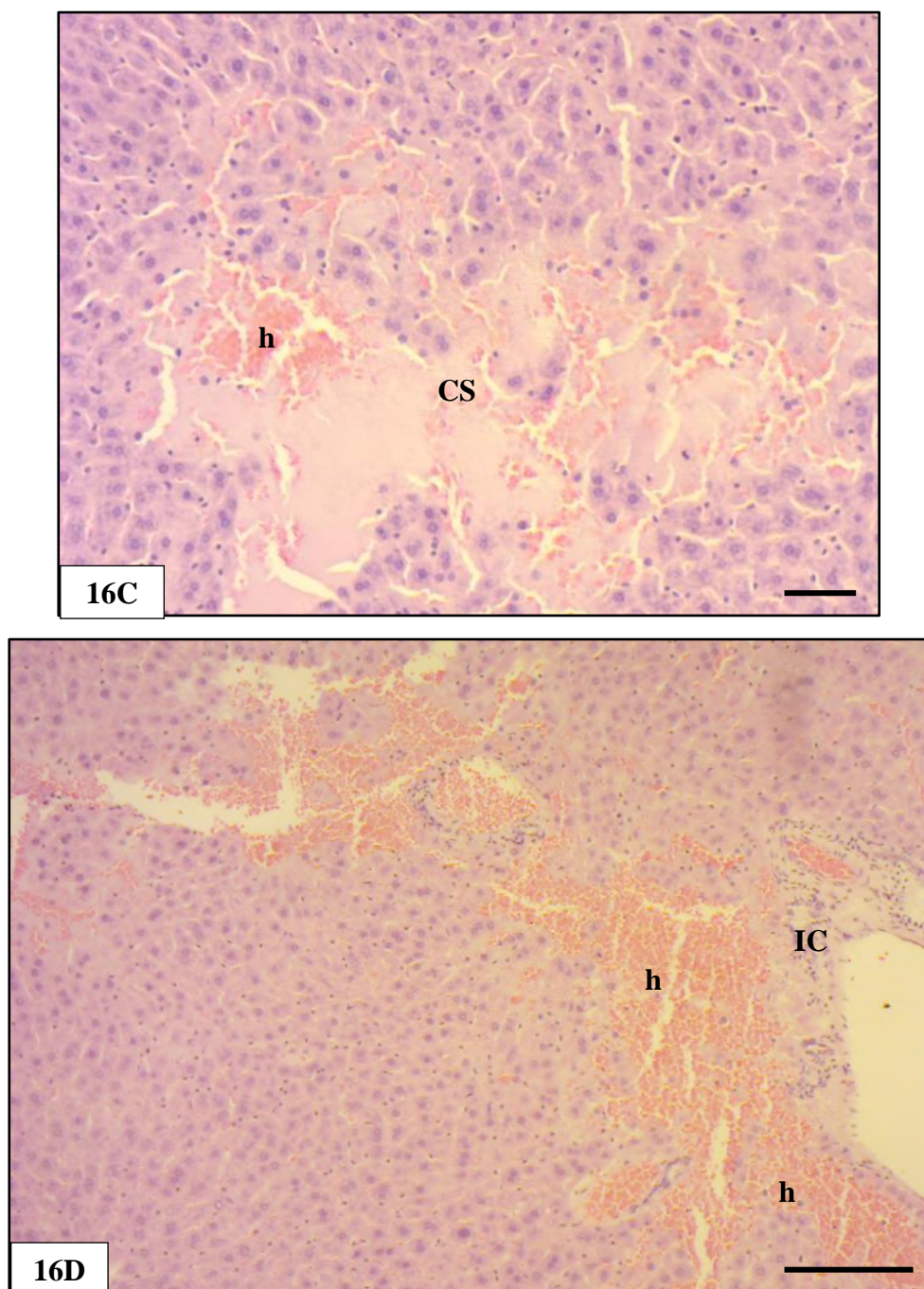
Figuras 15A-15B: Secções histológicas de fígado de camundongo BALB/c não infectado coradas com hematoxilina e eosina. Região central de um lóbulo hepático, composto principalmente por uma veia centrolobular (v) e por cordões de hepatócitos (he) que se distribuem radialmente ao redor da veia. Inúmeros vasos de pequeno calibre (setas), principalmente capilares do tipo sinusóide, compõem o estroma hepático [A]. Hepatócitos com citoplasma bem distribuído e citoplasma finamente granuloso [B]. Núcleo (N), Célula endotelial (CE). Barra (A) = 50 μ m. (B)= 10 μ m.

Análises histopatológicas do parênquima hepático de camundongos BALB/c 72 h.p.i. com DENV-3 revelaram focos de hemorragia, congestão vascular (Figuras 16A-16B), infiltrado celular no espaço periportal e infiltrado inflamatório intersticial (Figuras 17A-17B).

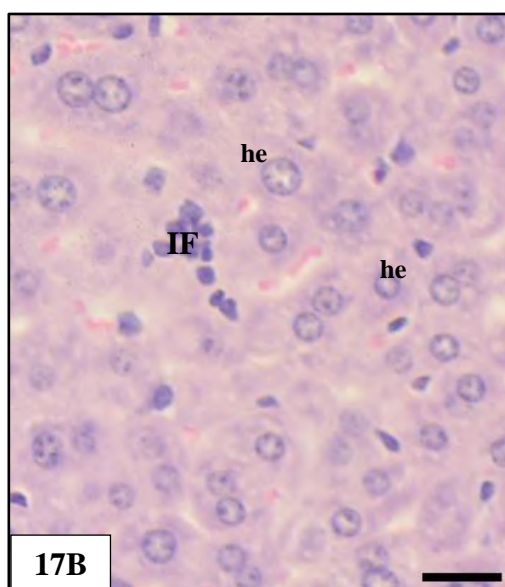
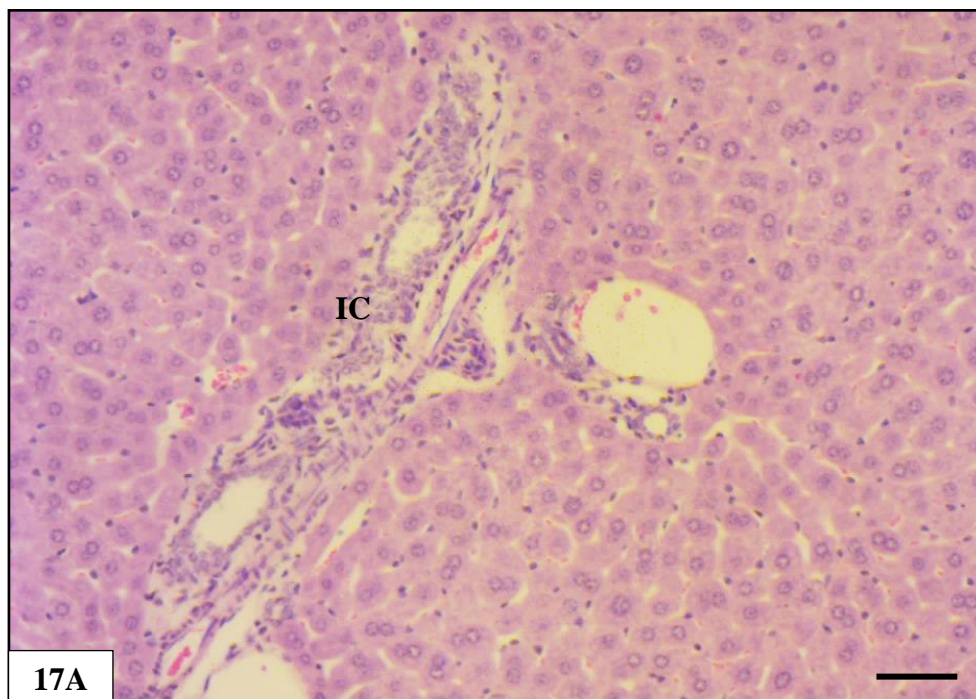
A respeito dos hepatócitos, uma das principais alterações histopatológicas observadas foi a presença de inclusões lipídicas únicas (esteatose macrogoticular) no citoplasma dessas células (Figuras 18A-18E). Na maioria dos casos, a inclusão não provocou o deslocamento do núcleo (não mostrado). Em casos focais, entretanto, observou-se um estágio avançado de degeneração celular, no qual o núcleo do hepatócito foi comprimido ou deslocado para a periferia devido à presença da inclusão lipídica (Figuras 19A-19B). Além disso, pode-se observar uma extensa área de esteatose microgoticular, onde o cordão de hepatócitos apresentava inúmeras inclusões lipídicas no interior celular (Figuras 20A-20B).

Por fim, foram evidenciados sinais de degeneração celular, com inclusões nucleares atípicas e alteração no padrão de distribuição de cromatina (Figuras 21A-21C).

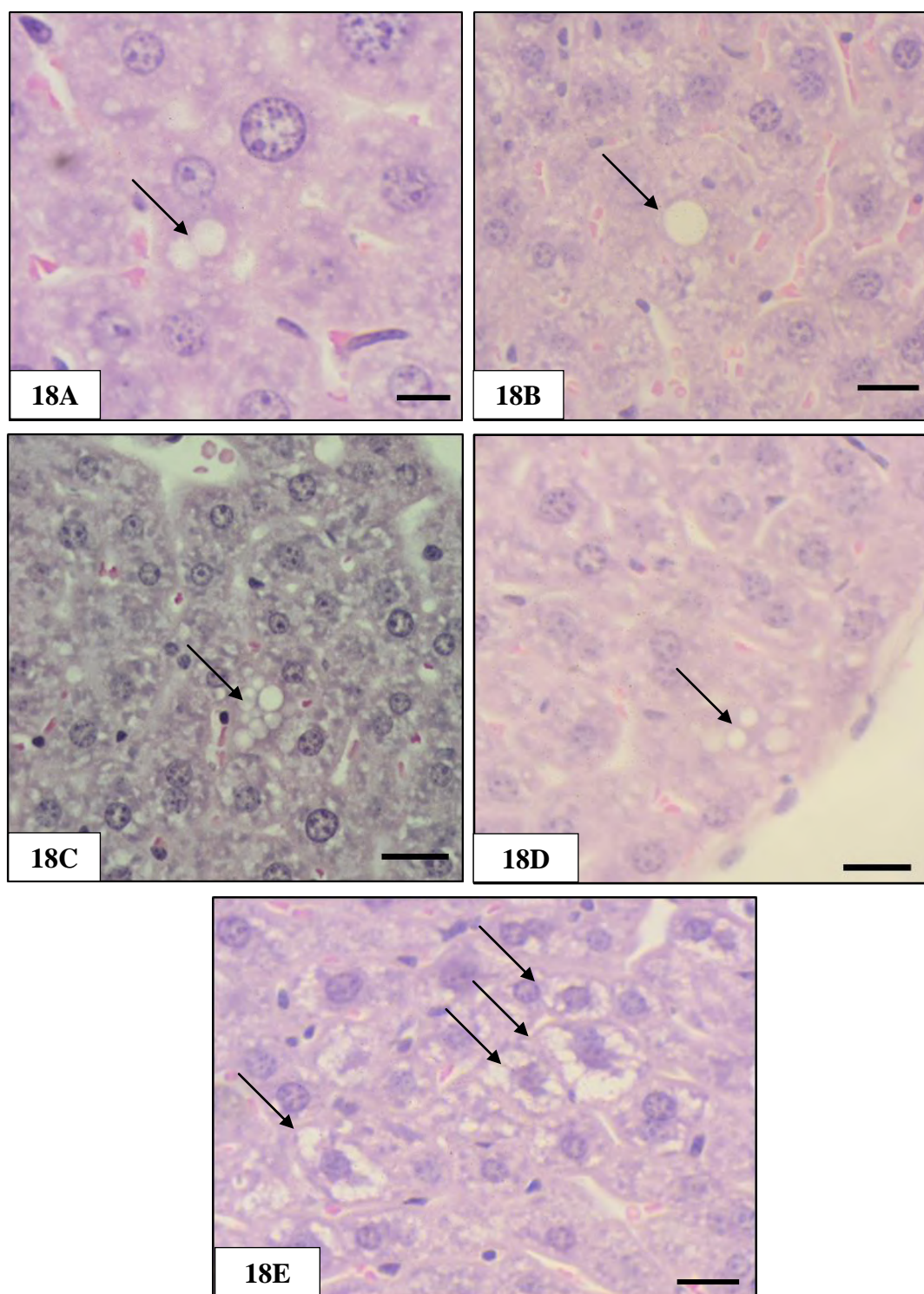




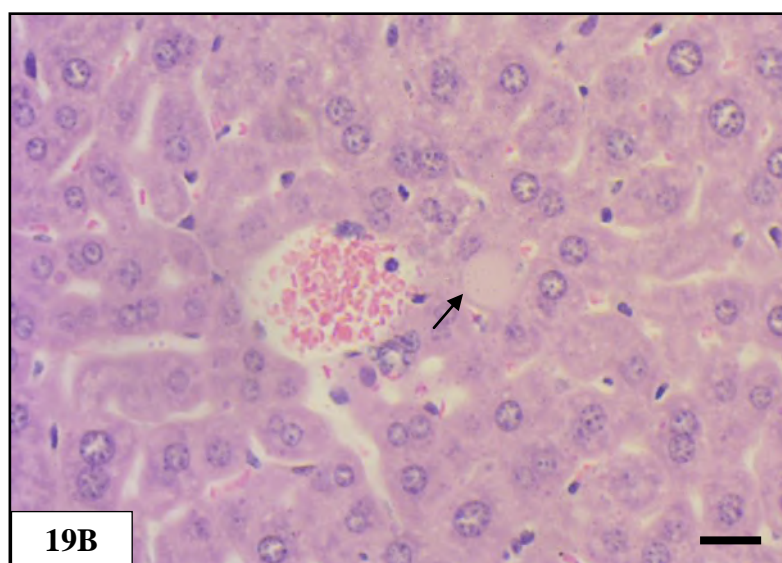
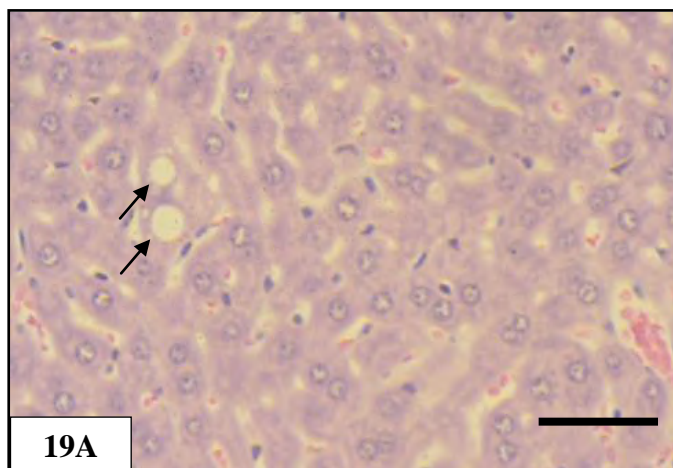
Figuras 16A-16D: Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Focos de congestão vascular (CV) [A, B, C], hemorragia (h) [C, D] e infiltrado celular (IC) no espaço periportal [D]. Barra (A, B, C) = 50 μ m. (D) = 100 μ m.



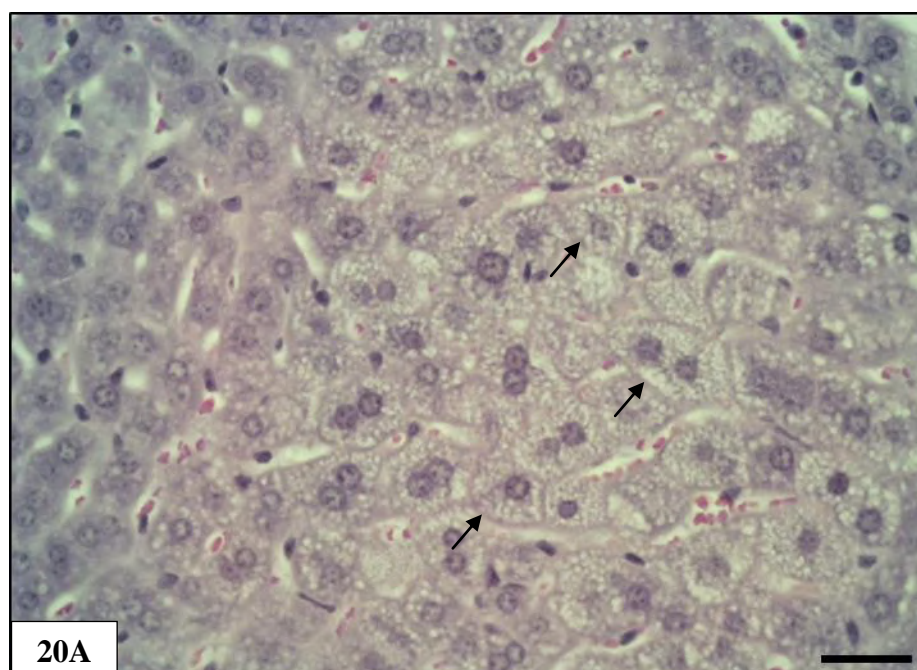
Figuras 17A-17B: Presença de infiltrado celular (IC) no espaço porta [A] e infiltrado inflamatório (IF) no interstício [B]. Hepatócitos (he). Barras (A,B) = 20 μ m.

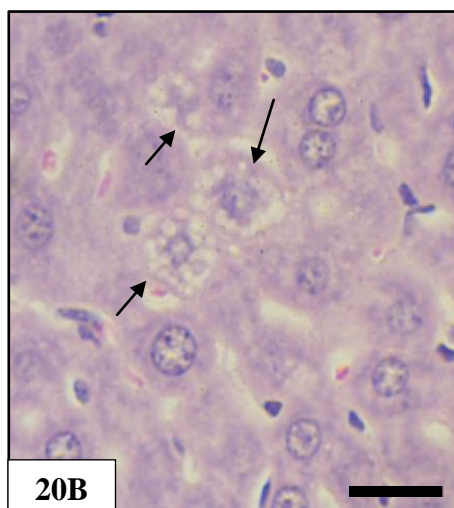


Figuras 18A-18E: Presença de inclusões lipídicas (esteatose macrovesicular) (setas) no interior do citoplasma de hepatócitos (he). Barra (A) = 10 μm. (B, C, D, E) = 20 μm.

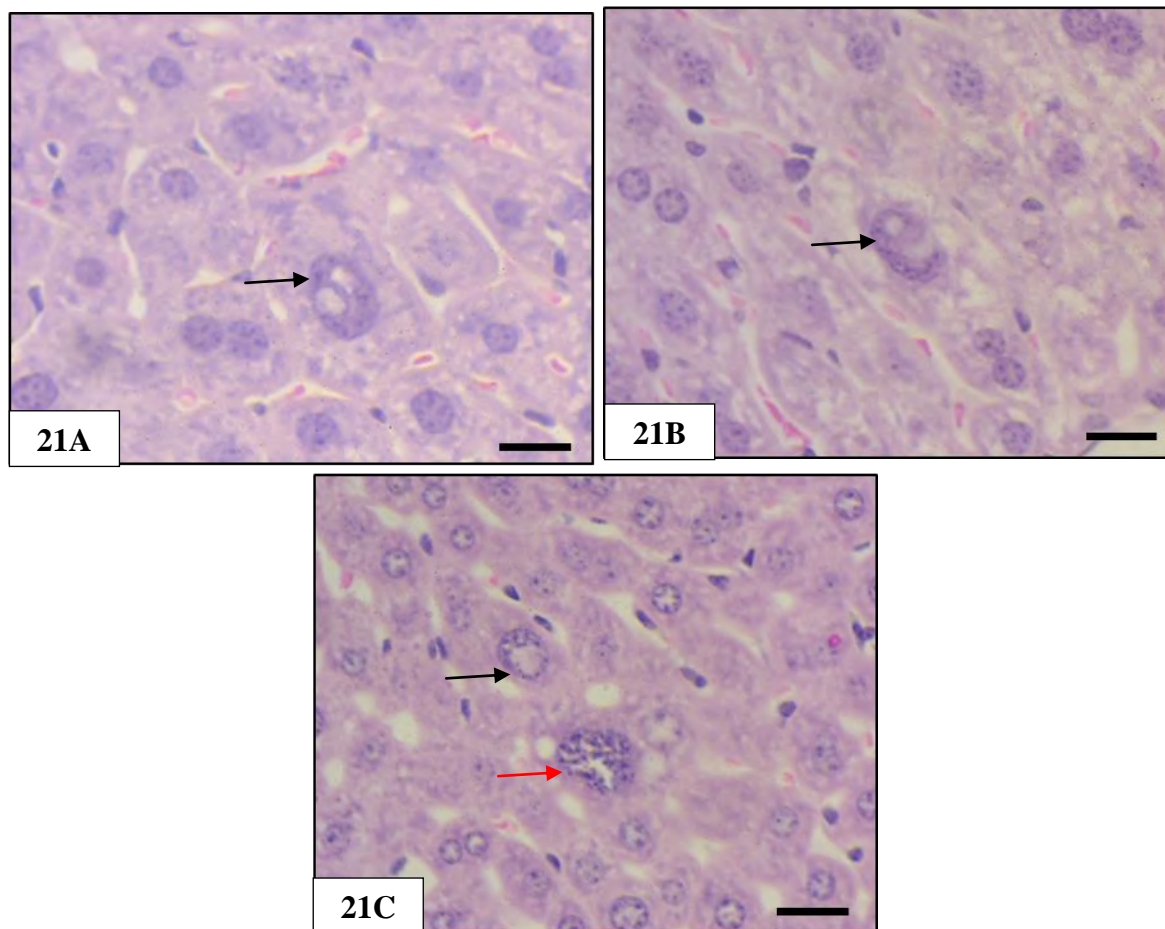


Figuras 19A-19B: Presença inclusões lipídicas (setas) no citoplasma do hepatócito, comprimindo o núcleo celular [A] e/ou deslocando o mesmo para a periferia [B]. Barra (A) = 50 μ m. (B) = 20 μ m.





Figuras 20A-20B: Presença de múltiplas inclusões lipídicas no citoplasma de hepatócitos (setas), caracterizando esteatose microgoticular em uma extensa área do parênquima hepático [A]. Em maior aumento, o aspecto de um hepatócito contendo inúmeras inclusões lipídicas (setas) em seu citoplasma [B]. Barra (A) = 50 μ m. (B) = 20 μ m.



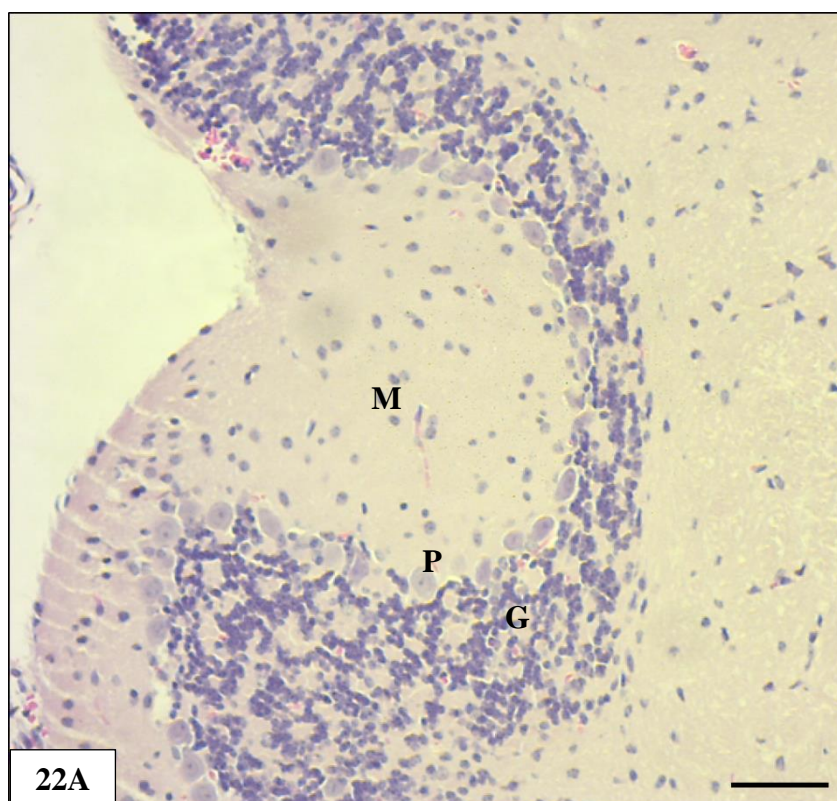
Figuras 21A- 21C: Degeneração de hepatócitos, com presença de inclusões nucleares atípicas (setas pretas) [A, B, C]. A seta vermelha aponta para um núcleo de hepatócito com alteração no padrão de distribuição da cromatina [C]. Barras (A, B, C) = 20 μ m.

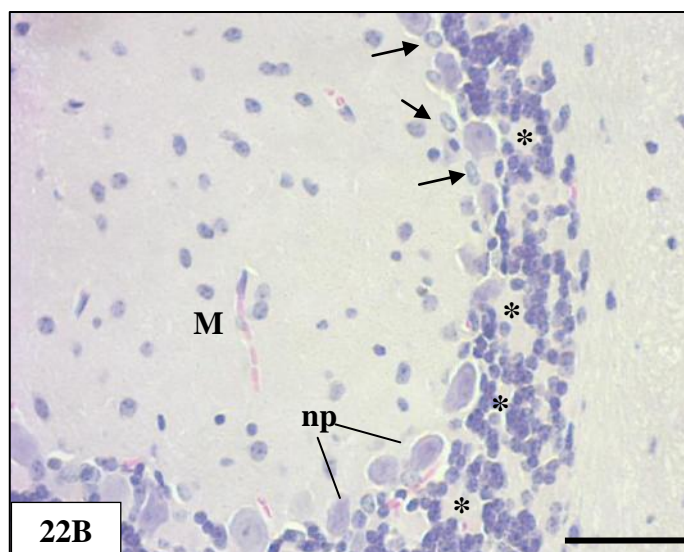
5.6. Análise ultraestrutural de fígado de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Neste estudo, a fixação insatisfatória do órgão inviabilizou a obtenção de secções bem preservadas para esta análise e, por essa razão, os resultados não serão mostrados.

5.7. Análise histopatológica de cerebello de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

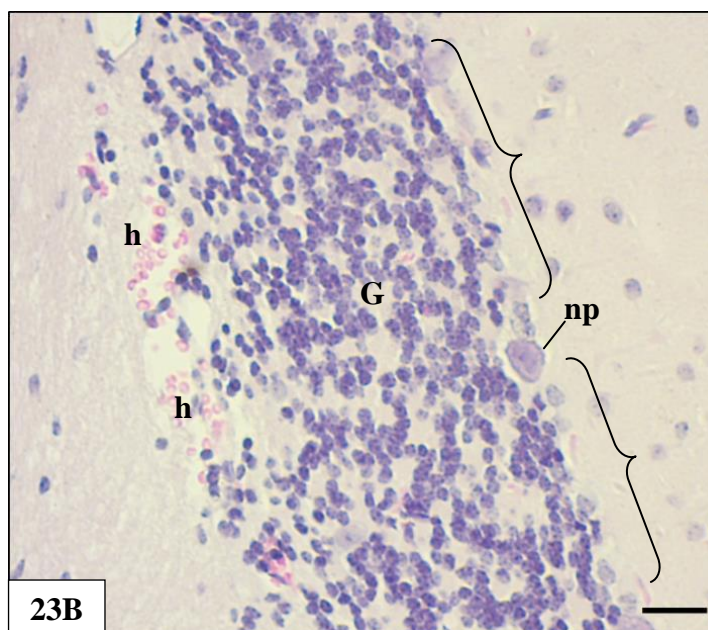
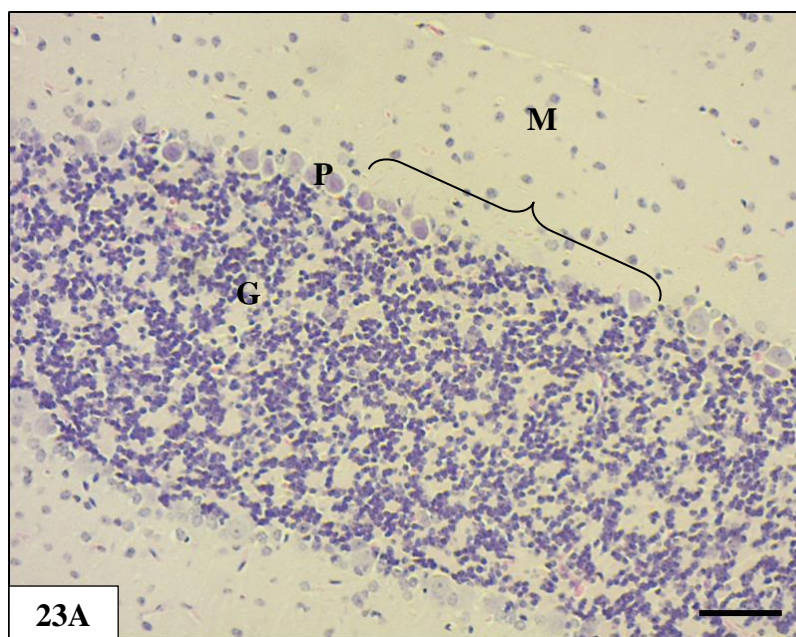
Análises histopatológicas de cerebello de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) demonstraram celularidade regular nas camadas molecular e granulosa, com ausência de alterações morfológicas. Além disso, a camada de Purkinje apresentou-se disposta de forma contínua, com os neurônios de Purkinje e astrócitos de Bergmann sem deformações ou alterações morfológicas (Figuras 22A-22B).



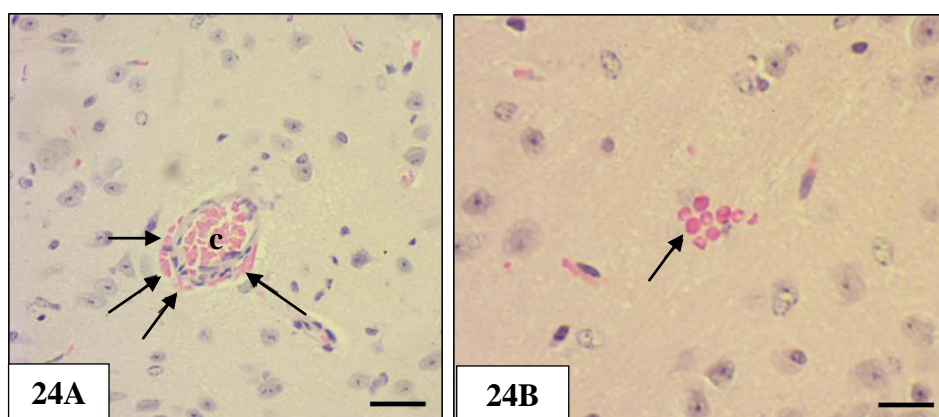


Figuras 22-22B: Secções histológicas de cerebelo de camundongos BALB/c não infectados coradas com hematoxilina e eosina. Disposição, celularidade e morfologia normal das camadas de Purkinje (P), granulosa (G) e molecular (M). [A]. Em maior aumento, as três camadas já citadas com detalhes. Na camada molecular (M) há poucas células, predominando dendritos, axônios e sinapses (não mostrado). Na camada de Purkinje, além dos neurônios de Purkinje (np), estão os núcleos dos astrócitos de Bergmann (setas), que lançam seus dendritos à camada molecular. Na camada granulosa há numerosos núcleos, que pertencem em sua grande maioria aos neurônios pequenos (não mostrado). Os núcleos das células granulosas têm distribuição irregular, com espaços entre eles, que constituem os glomérulos cerebelares, sinapses complexas (*) [B]. Barra (A)=50µm (B) = 20 µm.

Análises histopatológicas de cerebelo de camundongos infectados experimentalmente com DENV-3 demonstraram alterações pontuais havendo áreas teciduais preservadas. Dentre os principais achados histopatológicos estão: distribuição heterogênea da camada de Purkinje, com perda da linearidade da camada de neurônios (Figuras 23A-23B); pequenos focos de hemorragia e eritrócitos não contidos no capilar (Figuras 24A-24B) e celularidade exacerbada na substância branca (Figura 25). Além disso, pode-se observar sinais de degeneração celular, com presença de núcleos picnóticos (Figura 26) na camada molecular.



Figuras 23A-23B: Secções histológicas de cerebelo de camundongos BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Disposição irregular da dos neurônios da camada de Purkinje, com perda da linearidade da camada de neurônios (chaves) [A, B] e foco de hemorragia (h) na camada granulosa (G) [B]. Neurônio de Purkinje (np). Barra (A)= 50µm. (B)= 20 µm.



Figuras 24A-24B: Eritrócitos não contidos (setas) no capilar cerebelar (c) [A,B] e aglomerados no interstício [B]. Barras (A, B) = 20 μ m.

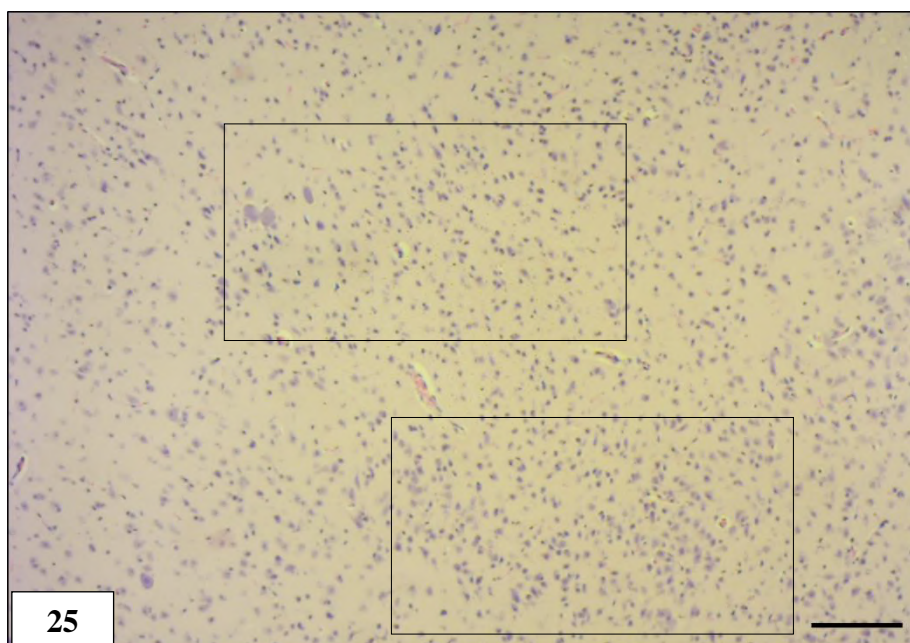


Figura 25: Celularidade anormal (destacada dentro do quadrado), na substância branca. Barra = 50 μ m.

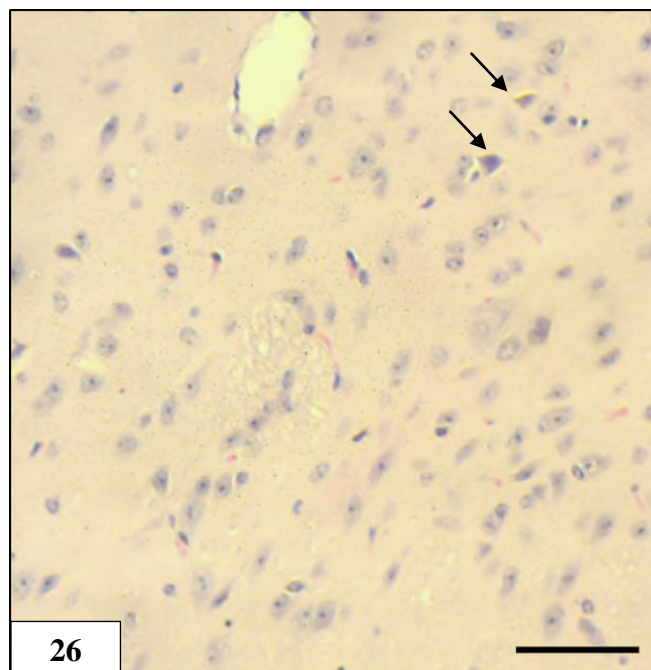


Figura 26: Presença de núcleos picnóticos (setas), indicativo de necrose celular [C]. Barra = 50 μ m.

5.8. Análise ultraestrutural de cerebelo de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Apesar de alguns problemas na fixação do órgão pelo protocolo padrão para a realização da técnica de MET, as análises estruturais de cerebelo de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram que, as áreas e células fixadas não apresentavam qualquer tipo de alteração morfológica. (Figura 27).

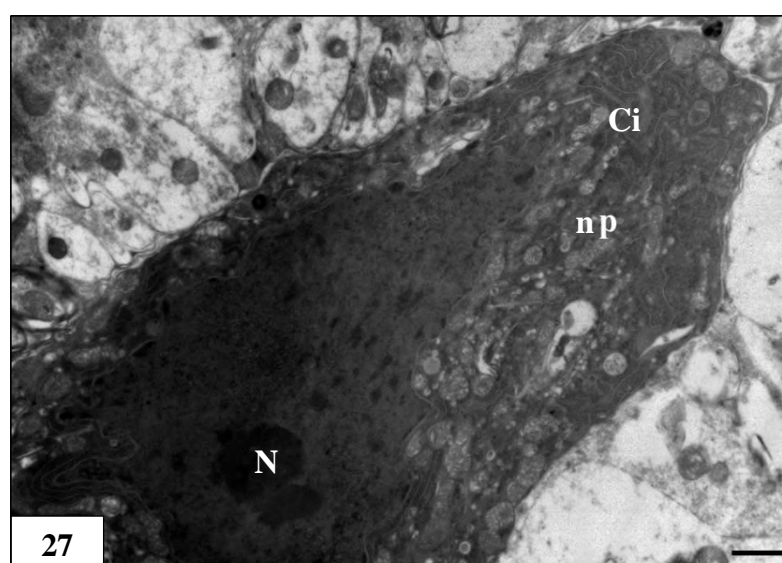


Figura 27: Secção ultrafina de cerebelo de camundongo BALB/c não infectado contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Neurônio de Purkinje bem preservado (np). Núcleo (N), Citoplasma (Ci) Barra = 1 μ m.

Análises ultraestruturais de cerebelo de camundongos infectados experimentalmente com DENV-3 demonstraram alterações pontuais havendo áreas teciduais preservadas. As principais alterações observadas foram a ativação do endotélio, caracterizada pela produção de vesículas de transporte (Figura 28); sinais sutis de necrose de célula endotelial e células do interstício (Figura 29) e intensa atividade proteica em células intersticiais, evidenciada pelo espessamento do retículo endoplasmático rugoso e presença de inúmeros ribossomos eletrondensos (Figuras 30A-30B). Além disso, pode-se observar presença de células inflamatórias mononucleares no interstício (não mostrado) e aderidas ao endotélio ativado (Figura 31).

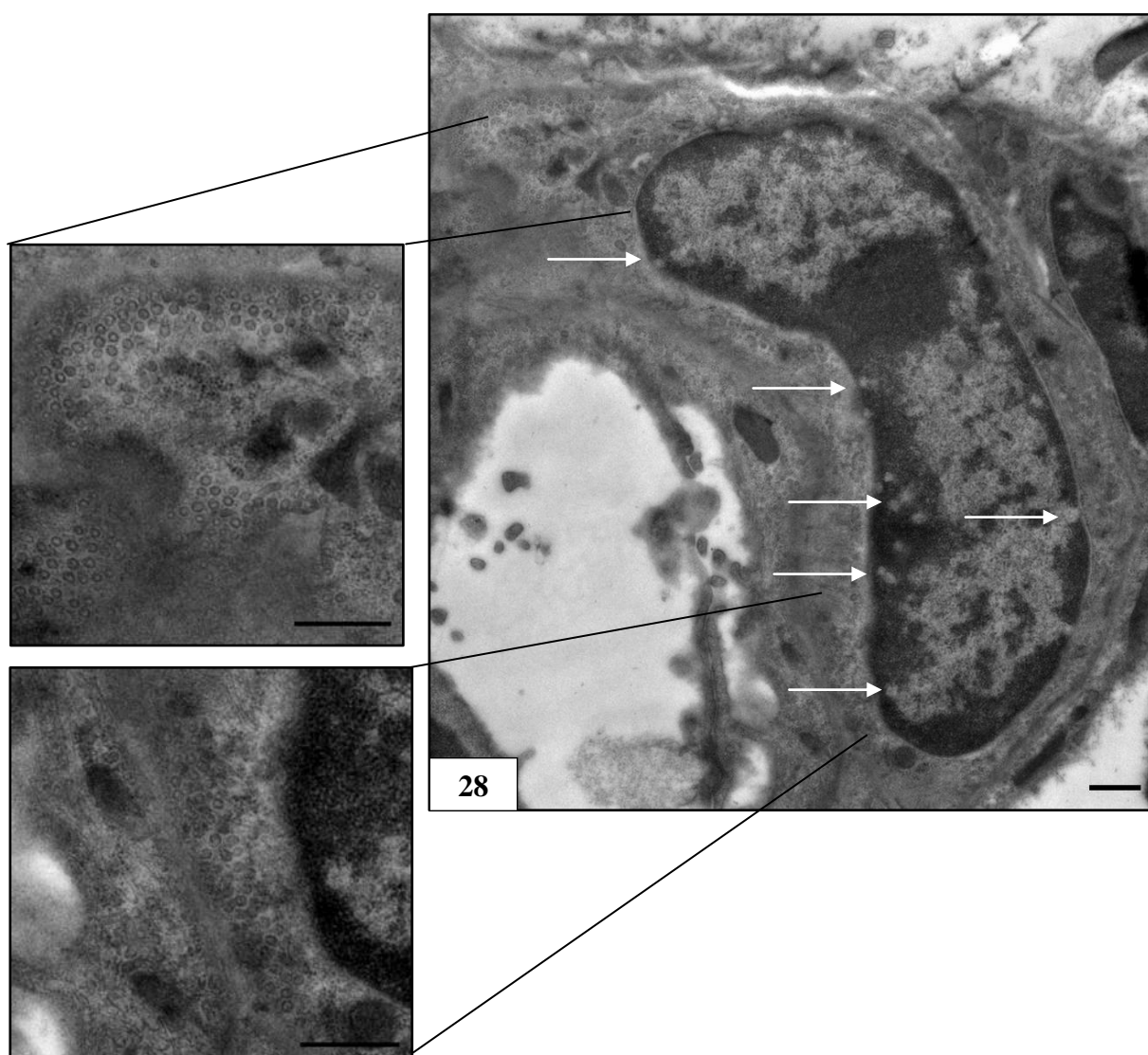


Figura 28: Secção ultrafina de cerebelo BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Ativação de célula endotelial evidenciada pela produção de inúmeras vesículas de transporte (destacadas em maior aumento). Sinais sutis de necrose celular, com degeneração nuclear (setas). Barras = 0,5µm.

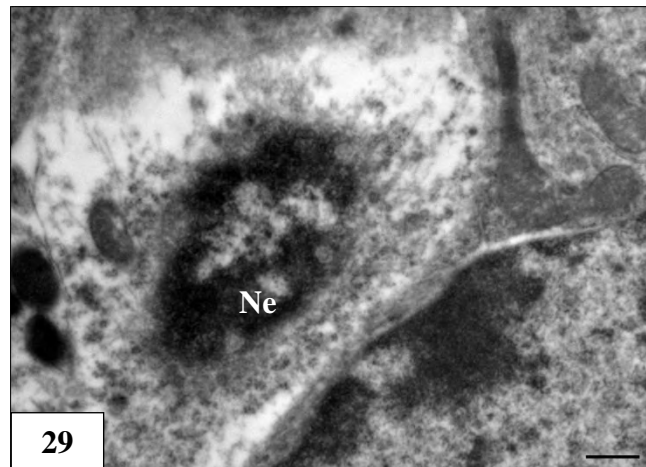
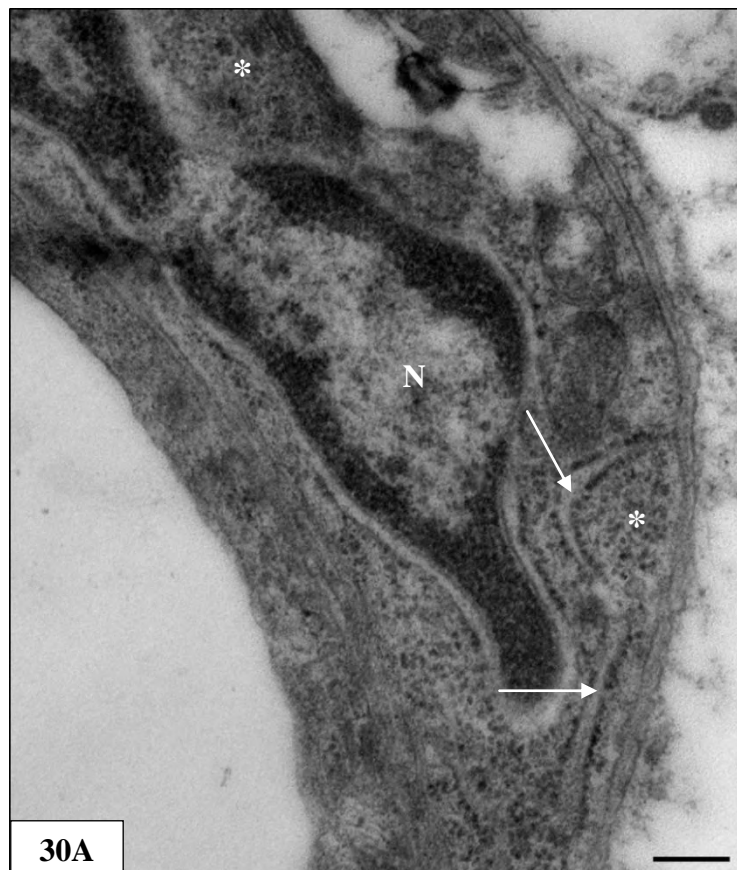
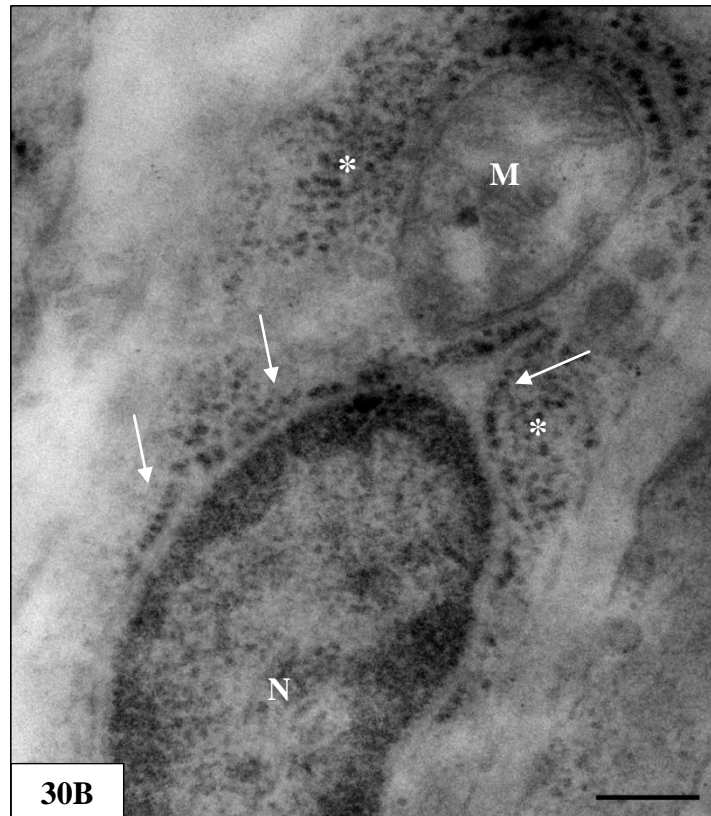


Figura 29: Evidência sutil de necrose (Ne) de célula intersticial, caracterizada pela presença de núcleo picnótico. Barra = 0,5 μ m.





Figuras 30A-30B: Intensa atividade proteica de células intersticiais, evidenciada pelo espessamento de retículo endoplasmático rugoso (setas) e áreas com inúmeros ribossomos eletrondensos (*). Núcleo (N). Mitocôndria (M). Barras (A, B) = 200nm.

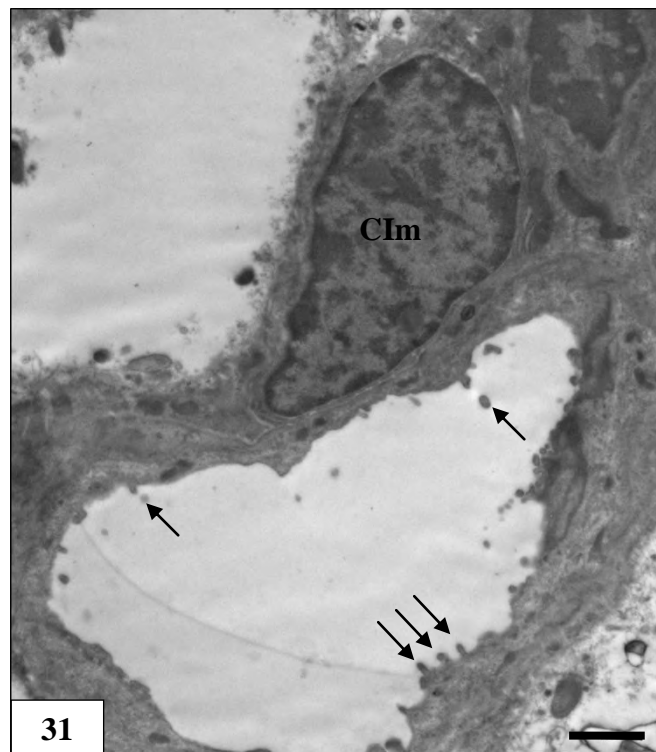


Figura 31: Presença de célula inflamatória mononuclear (Cim) aderida ao endotélio ativado. Emissão de prolongamentos de membrana (setas) pelo endotélio. Barra = 1 μ m.

5.9. Análise histopatológica de rim de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Análises histopatológicas de rim de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) demonstraram corpúsculos de Malpighi, formados pela cápsula de Bowman e glomérulos, bem preservados. Além disso, túbulos contorcidos proximais, túbulos contorcidos distais e túbulos coletores não apresentavam qualquer tipo de alteração (Figura 32).

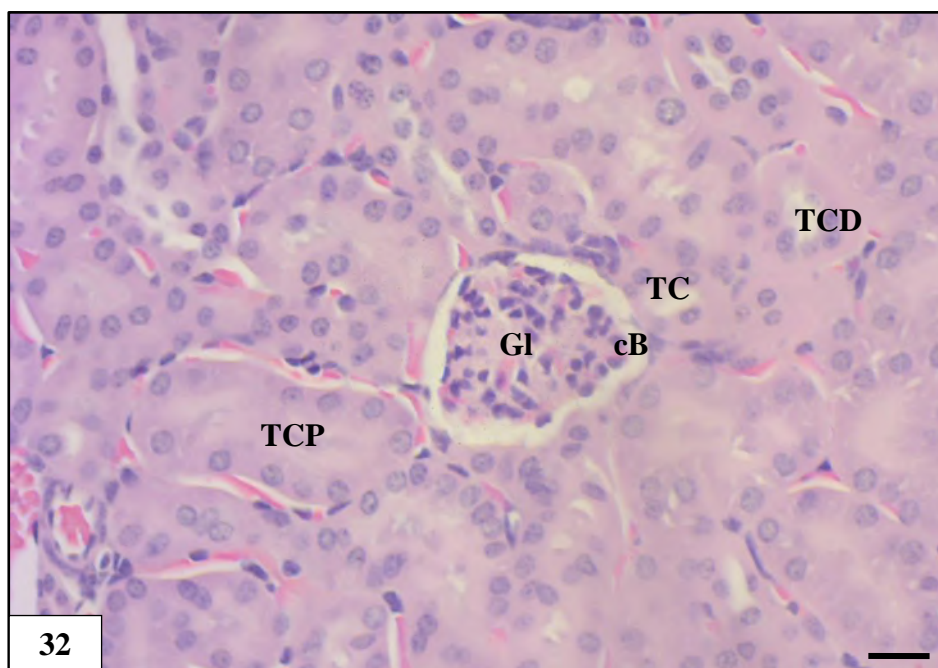
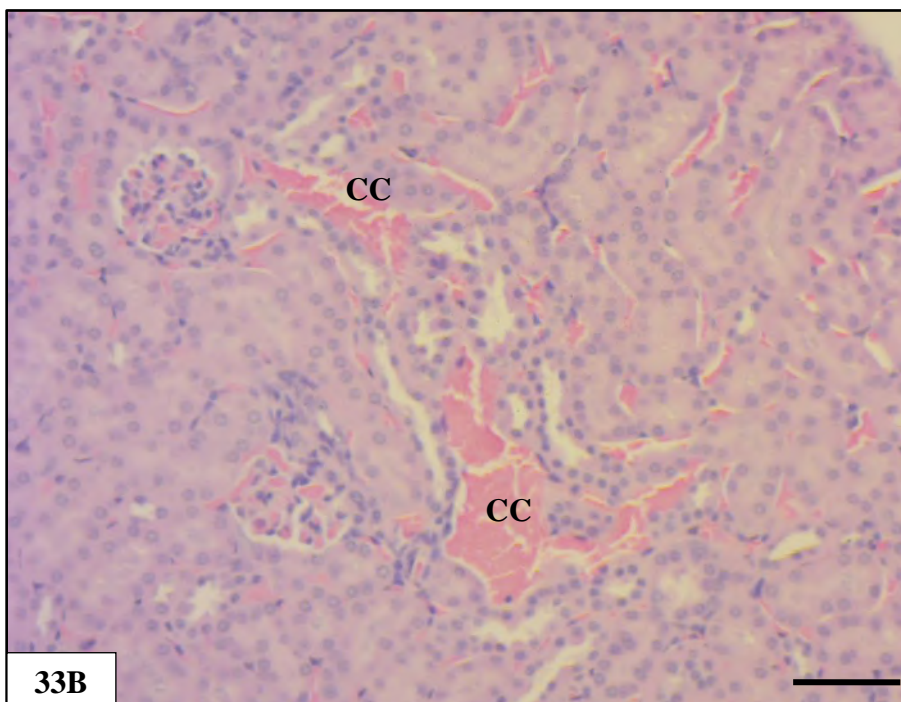
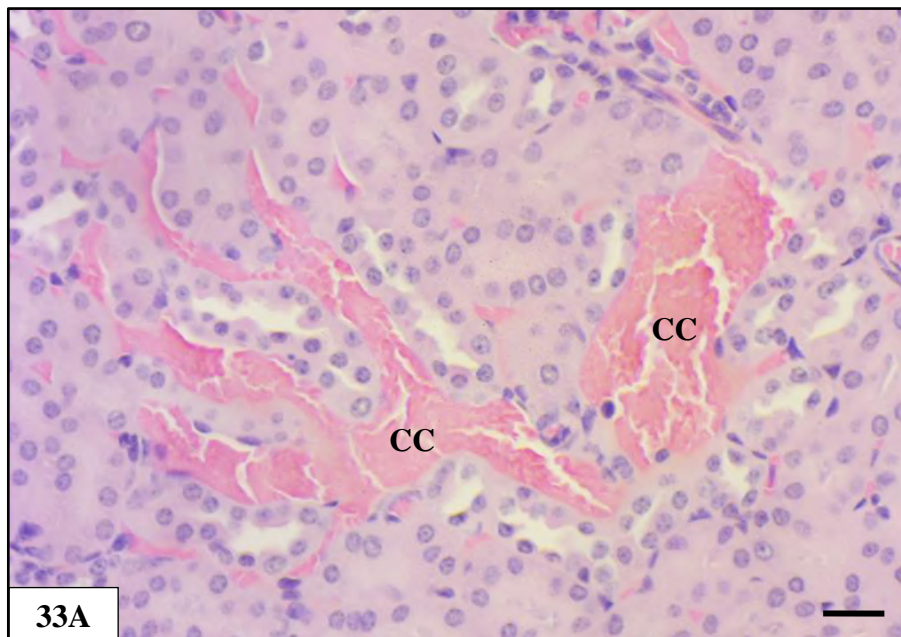
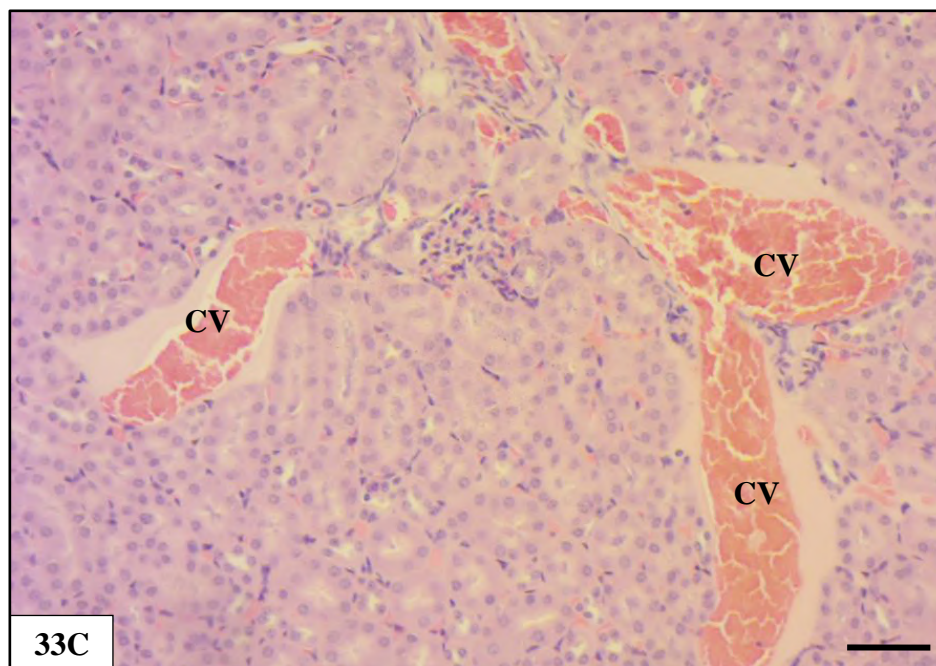


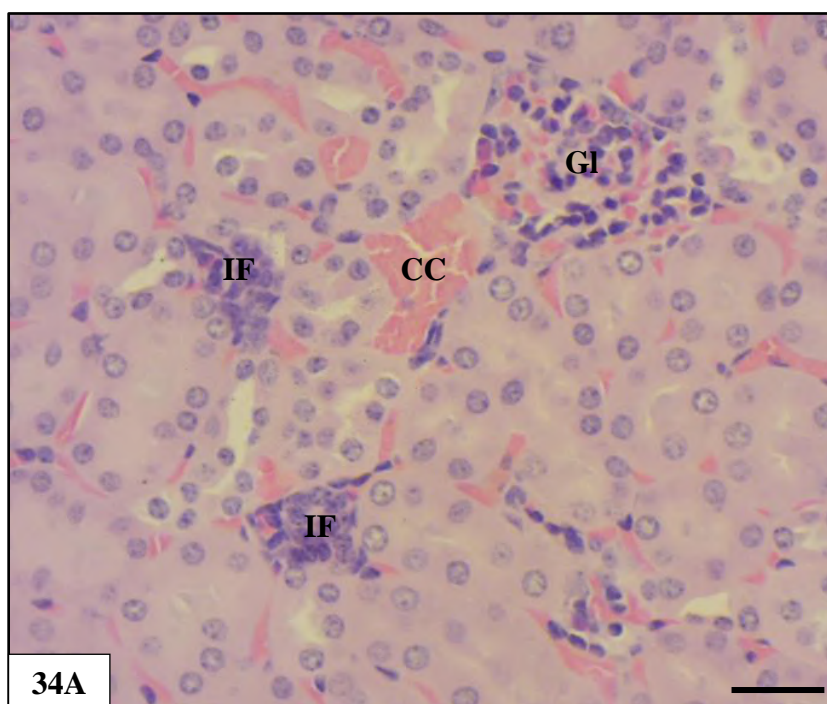
Figura 32: Secção histológica de rim de camundongos BALB/c não infectado corada com hematoxilina e eosina. Parênquima renal bem preservado, com túbulo contorcido distal (TCD), túbulo contorcido proximal (TCP), túbulo coletor (TC) e corpúsculo de Malpighi, formado pela cápsula de Bowman (cB) e glomérulo (Gl) sem qualquer alteração histopatológica. Barra = 20 μ m.

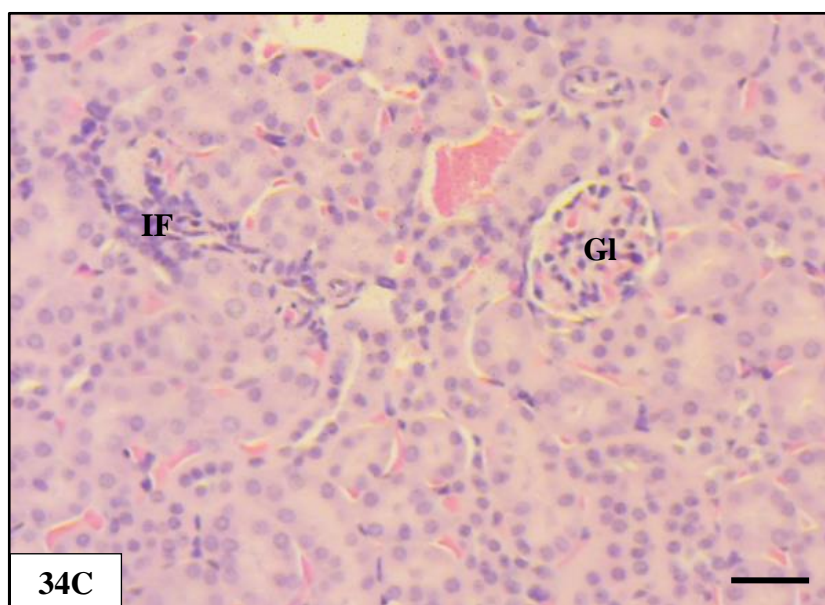
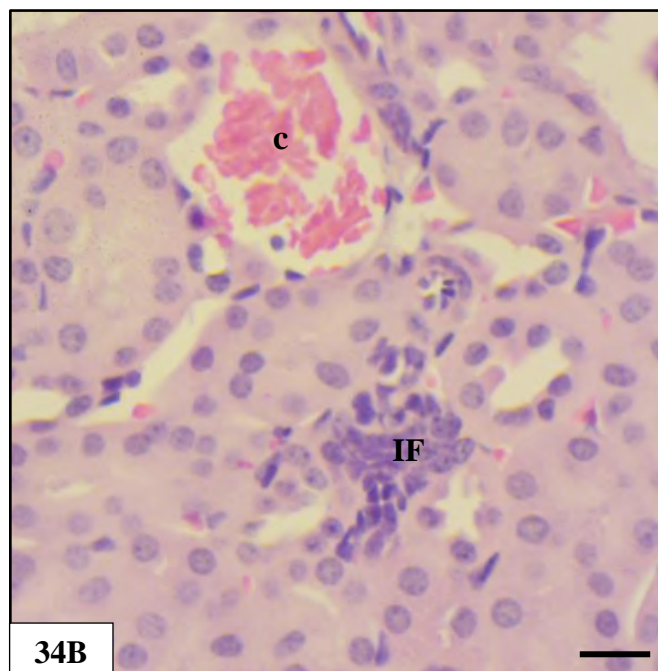
Análises histopatológicas de rim de camundongos infectados experimentalmente com DENV-3 revelaram focos de congestão capilar e congestão vascular difusa (Figuras 33A-33C); infiltrado inflamatório no interstício (Figuras 34A-34C) e presença de inclusões citoplasmáticas semelhantes a lipídios em células epiteliais dos túbulos contorcidos (Figuras 35A-35C).



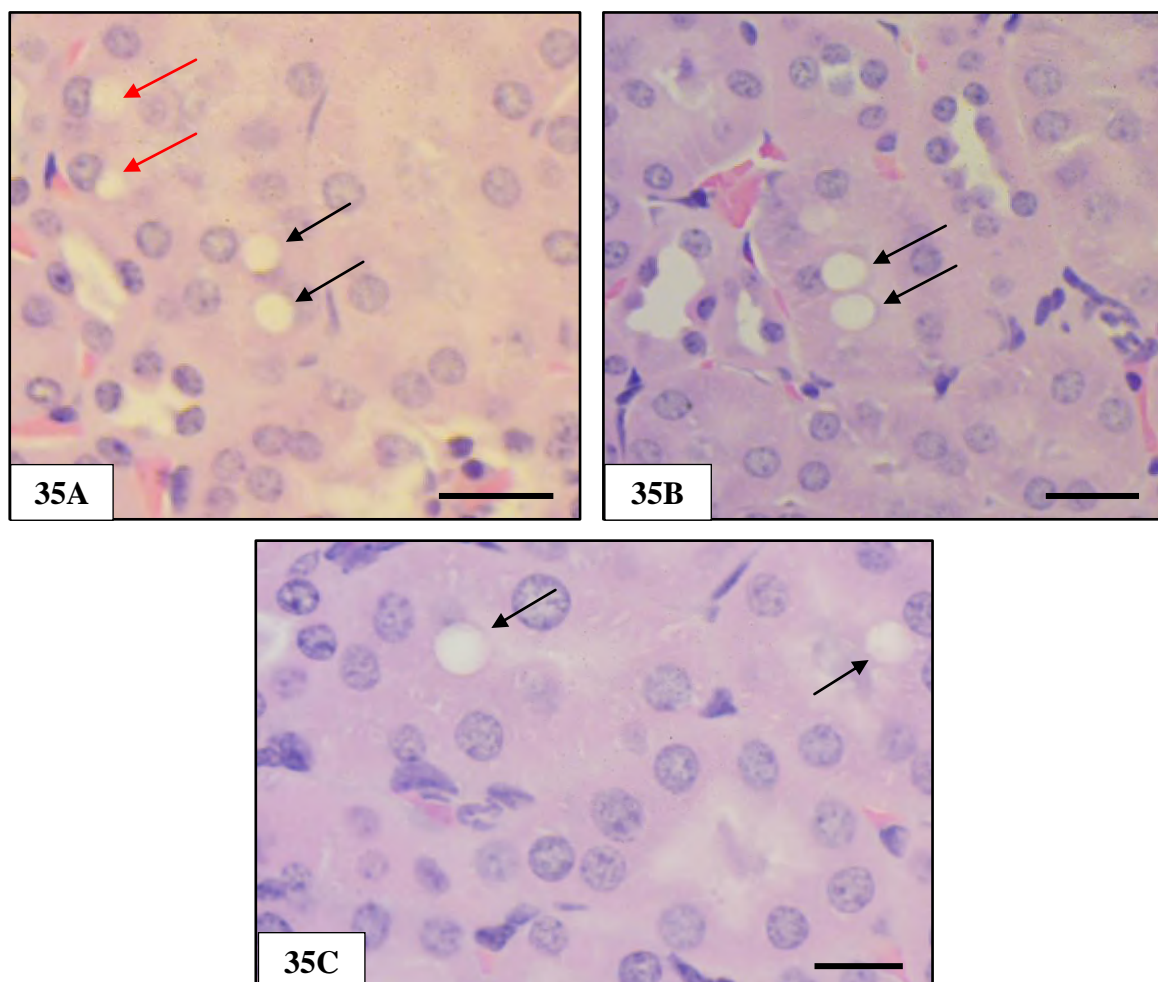


Figuras 33A-33C: Secções histológicas de rim de camundongos BALB/c 72h.p.i. por DENV-3 coradas com hematoxilina e eosina. Foco de congestão capilar (CC) [A, B] e congestão vascular (CV) difusa [C] Barra (A) = 20 μ m. (B, C) = 50 μ m.





Figuras 36A-36C: Presença de infiltrado inflamatório (IF) no interstício. Capilar (c). Glomérulo (Gl). Congestão capilar (CC). Barra (A) = 50 μ m. (B, C) = 20 μ m.



Figuras 35A-35C: Presença de inclusões citoplasmáticas semelhante a lipídios (setas) no citoplasma das células epiteliais tubulares. As setas vermelhas indicam compressão do núcleo celular, devido à presença da inclusão no citoplasma [A]. Barra (A, B) = 20 μ m. (C) = 10 μ m.

5.10. Análise ultraestrutural de rim de camundongos BALB/c infectados com DENV-3

Análises ultraestruturais de rim de camundongos BALB/c não infectados (controles negativos) mostraram parênquima renal totalmente preservado, ausência de células inflamatórias, sinais de congestão ou qualquer outro tipo de alteração (Figura 36).

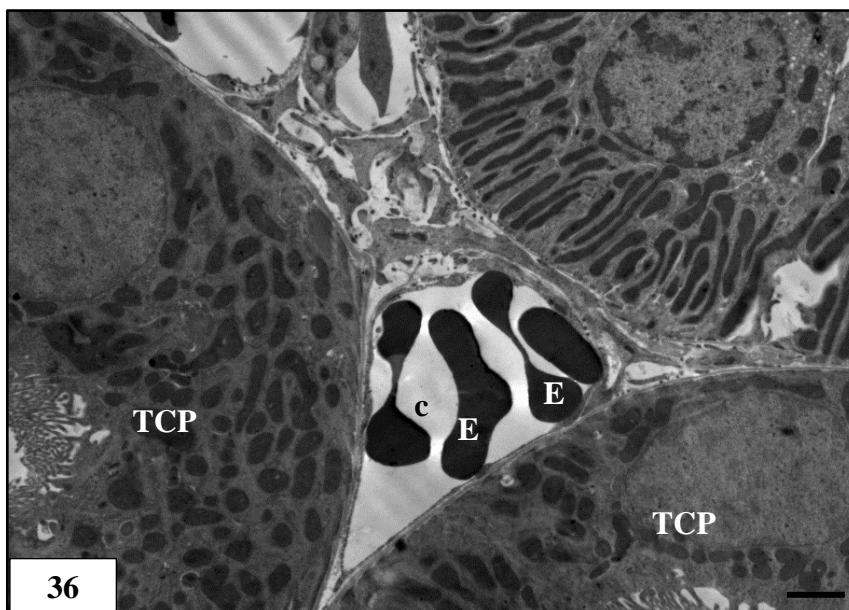
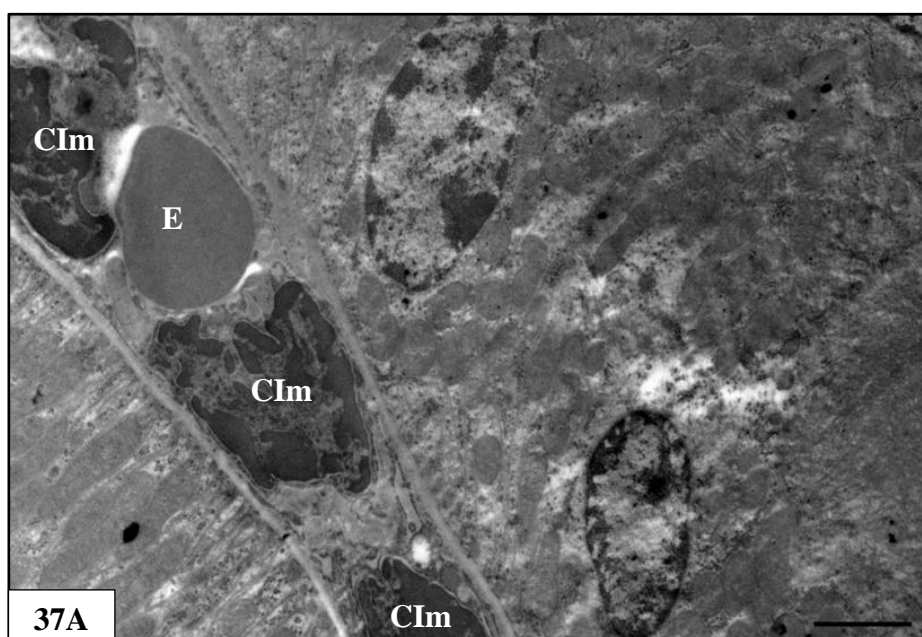
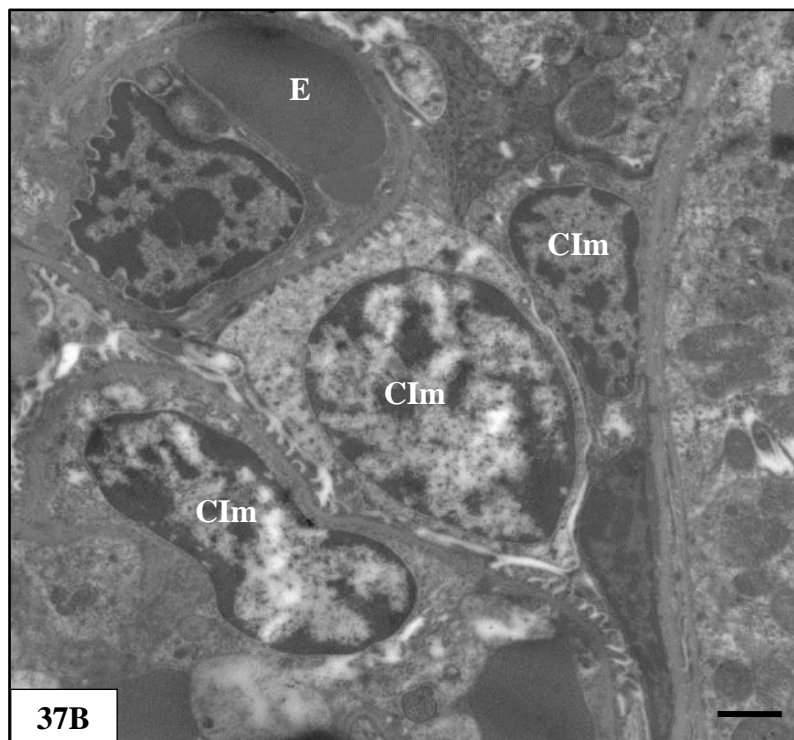


Figura 36: Secção ultrafina de rim de camundongos BALB/c não infectado contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Eritrócitos (E) contidos no capilar (c) e células do túbulo contorcido proximal (TCP) sem qualquer alteração. Barra = 2 μ m.

Análises ultraestruturais de rim de camundongos infectados experimentalmente com DENV-3 revelaram presença de células inflamatórias mononucleares no interstício e no capilar (Figuras 37A-37B), focos de congestão vascular, sinais de degeneração celular, caracterizados pela presença de núcleos picnóticos (Figura 38), degeneração nuclear de células intersticiais (Figura 39) e intensa atividade proteica em célula intersticial, evidenciada pelo espessamento do retículo endoplasmático rugoso e presença de inúmeros ribossomos eletrondensos. Além disso, foi observada presença de partículas semelhantes em morfologia e diâmetro aos DENV (Figura 40).





Figuras 37A-37B: Secção ultrafina de rim de camundongo BALB/c 72 h.p.i. por DENV-3 contrastada com acetato de uranila e citrato de chumbo. Presença de células inflamatórias mononucleares (Cim) no capilar [A] e no interstício [B]. Eritrócito (E). Barra (A) = 2 μ m. (B)= 1 μ m.

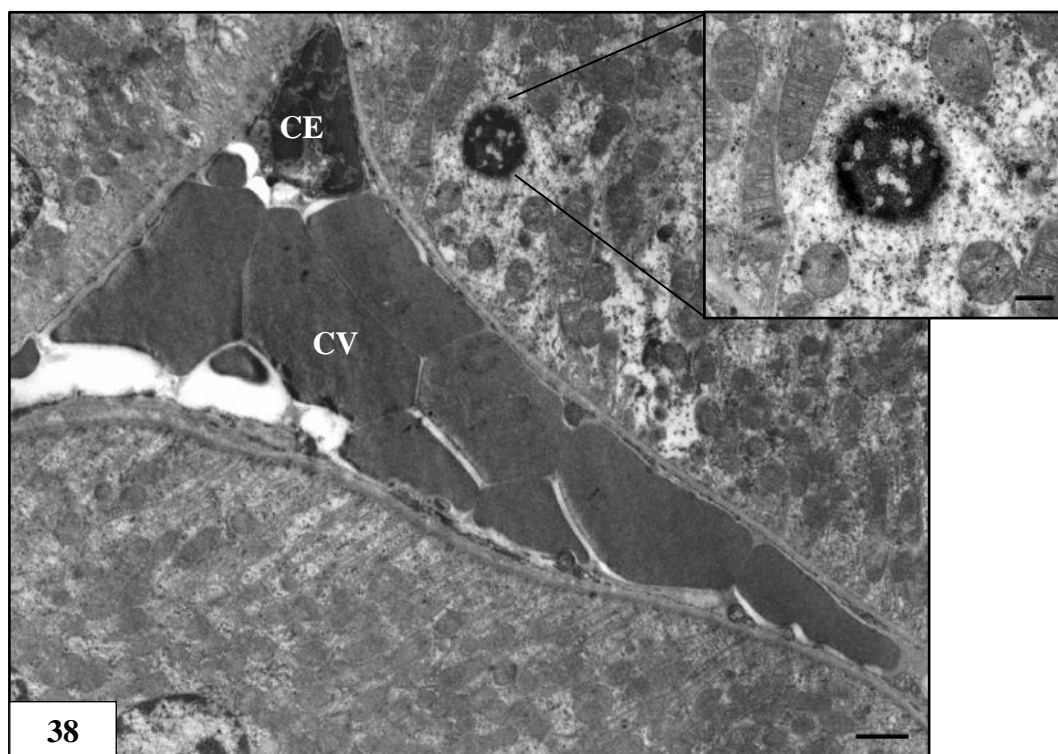


Figura 38: Congestão vascular (CV) e célula apresentando núcleo picnótico (destacado em maior aumento). Célula endotelial (CE). Barra = 2 μ m.

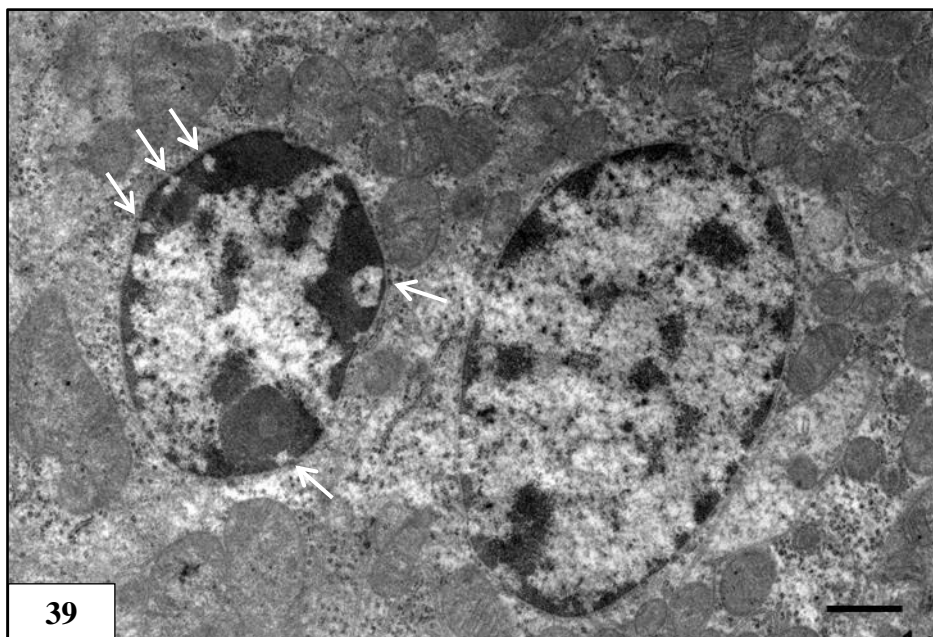
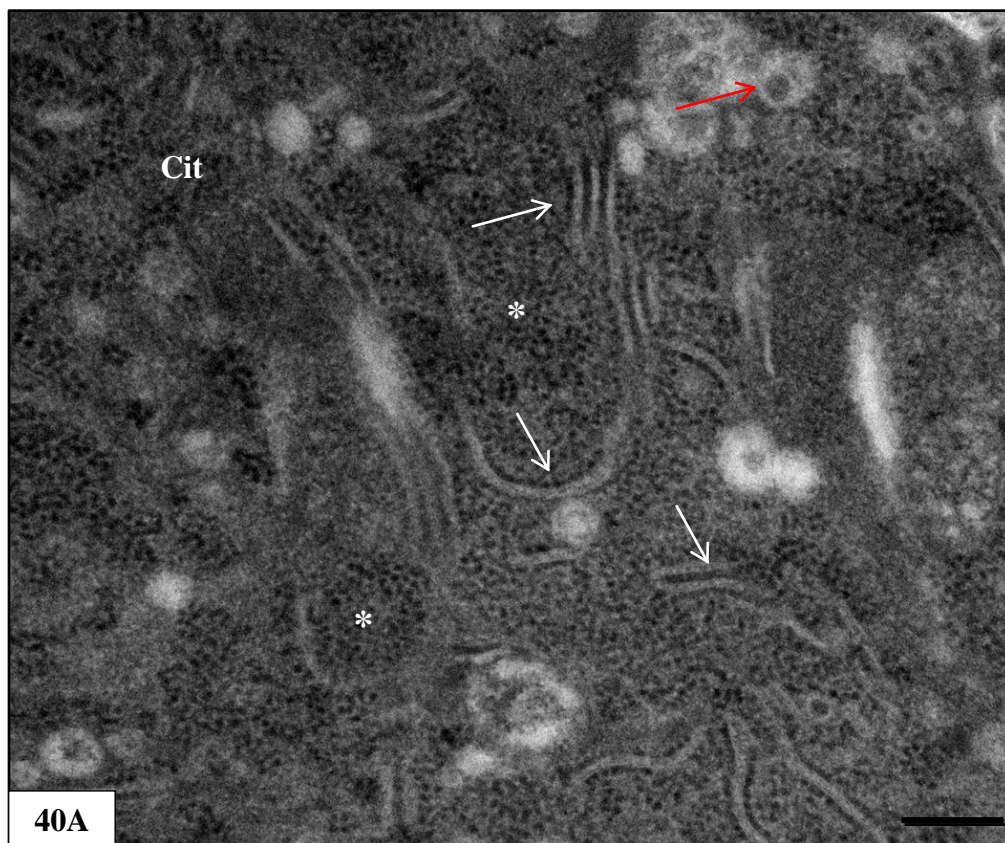
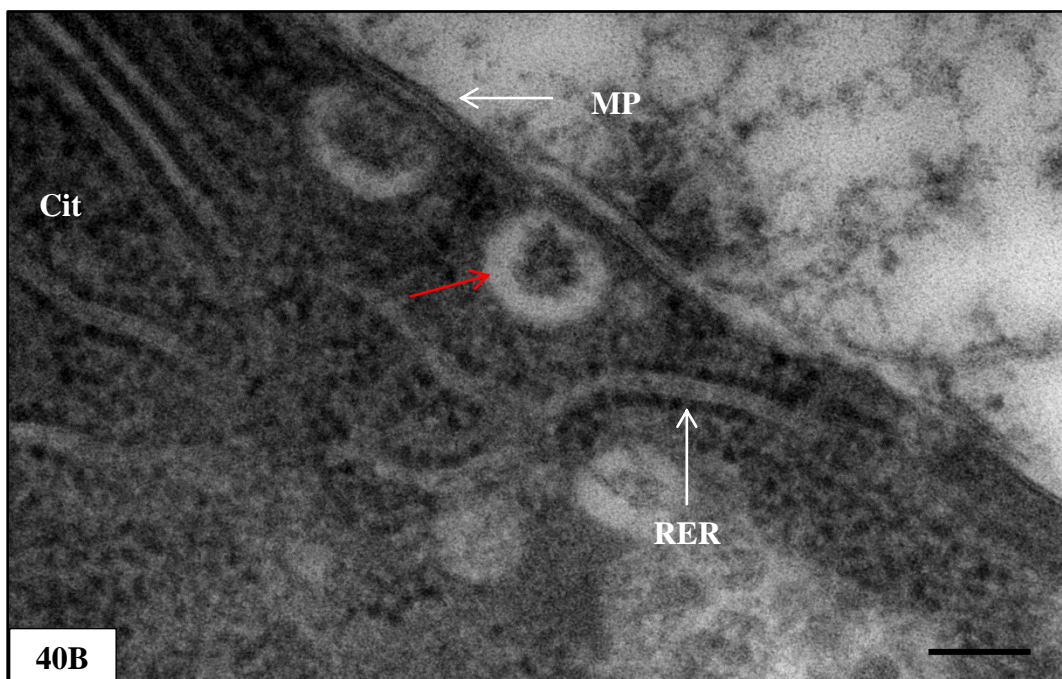
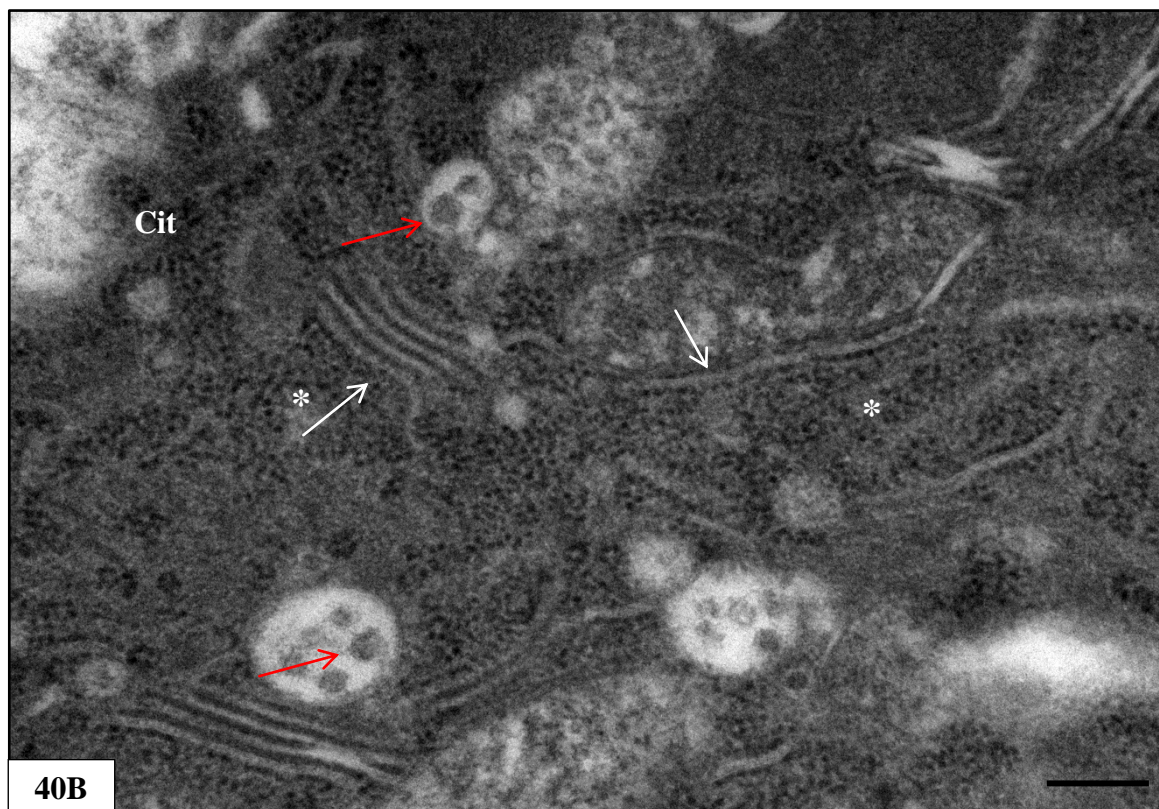


Figura 39. Sinais sutis de degeneração nuclear (setas) de célula intersticial. Barra = 1 μ m.





Figuras 40A-40C: Intensa atividade proteica de célula intersticial, evidenciada pelo espessamento de retículo endoplasmático rugoso (setas brancas) e áreas com inúmeros ribossomos eletrondensos (*). Partículas semelhantes em morfologia e diâmetro aos DENV (setas vermelhas) no interior de compartimento membranoso no citoplasma. Citoplasma (Cit). Retículo endoplasmático rugoso (RER). Membrana plasmática (MP). Barras (A, B) = 200nm. (C) = 100nm.

5.11. Análise molecular

O resultado do teste de RT-PCR em tempo real a partir de amostras de macerados de tecidos 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 (pulmão, fígado, coração, rim, baço e cerebelo), observamos que o fígado (33,33%), cerebelo (25%), pulmão (25%), baço (8,3%) e rim (8,3%) apresentaram maior recuperação do RNA viral (Tabela 3).

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

Órgão	Baço	Cerebelo	Coração	Fígado	Pulmão	Rim
Positivos/Testados (%)	1/12 (8,3%)	3/12 (42,85%)	0/12	4/12 (28,57%)	3/12 (28,57%)	1/12 (8,3%)

Conforme mostrado na tabela 4, o órgão que obteve a maior média de título recuperado foi o baço (1×10^{12} cópias/mL). O RNA viral pôde ser recuperado de 4 das 12 amostras de fígado testadas, com média dos títulos igual a $4,6 \times 10^4$ cópias/mL. No cerebelo e pulmão, a fita positiva do RNA foi recuperada em 3 das 12 amostras testadas, com média dos títulos igual a $2,66 \times 10^4$ e $3,94 \times 10^4$ cópias/mL, respectivamente. Das 12 amostras de rim testadas, somente em 1 foi possível detectar e quantificar a carga viral, sendo a média da quantificação igual a $1,78 \times 10^3$ cópias/mL. Não foi detectado o genoma viral nas amostras de coração testadas.

A fita positiva do RNA viral foi detectada em 8 dos 12 camundongos (66,66%), em pelo menos um órgão testado. Em dois animais, o RNA do DENV-3 foi detectado em dois órgãos distintos (Tabela 4), e em um detectamos a carga viral em três órgãos. Conforme mostrado na tabela 5, o camundongo 4 apresentou maior média de título de RNA recuperado.

Tabela 4. Quantificação da carga viral do DENV-3 por RT-PCR em tempo real, a partir de órgãos de camundongos BALB/c.

Camundongos	Quantificação do DENV-3 (cópias de RNA/mL)					
	Baço	Cerebelo	Coração	Fígado	Pulmão	Rim
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	$2,65 \times 10^4$	ND	ND	$3,68 \times 10^4$	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	1×10^{12}	$2,23 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	$8,93 \times 10^4$	ND	ND
6	ND	$6,93 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	$6,01 \times 10^4$	$4,15 \times 10^5$	$2,14 \times 10^4$
8	ND	ND	ND	ND	$2,05 \times 10^4$	ND
9	ND	ND	ND	$4,18 \times 10^5$	ND	ND
10	ND	ND	ND	$3,86 \times 10^3$	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Média/ órgão	$8,33 \times 10^{10}$	$2,66 \times 10^4$	0	$4,76 \times 10^4$	$3,94 \times 10^4$	$1,78 \times 10^3$

ND = não detectado.

Tabela 5. Média da quantificação dos títulos de RNA viral recuperados por camundongo BALB/c.

Camundongos	Média dos títulos recuperados (cópias de RNA/mL)
1	ND
2	$1,06 \times 10^4$
3	ND
4	$1,67 \times 10^{11}$
5	$1,49 \times 10^4$
6	$1,16 \times 10^4$
7	$8,28 \times 10^4$
8	$3,42 \times 10^3$
9	$6,97 \times 10^4$
10	$6,43 \times 10^2$
11	ND
12	ND

6. DISCUSSÃO

Atualmente, há fortes linhas de evidências sugerindo uma relação específica entre a genética viral e o resultado clínico da infecção por DEN. Todos os quatro sorotipos possuem a habilidade para causar SCD/FHD, porém, a infecção 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 resultar em uma série de resultados clínicos, incluindo doença grave tanto em infecções primárias como secundárias, como observado em vários estudos epidemiológicos 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 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 porque certos indivíduos apresentam DEN e outros desenvolvem DG, o estabelecimento de modelos animais pode ser de grande relevância para estudos sobre a patogênese da doença.

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

Contudo, estudos prévios realizados no Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (IOC, Fiocruz) utilizando camundongos BALB/c infectados com cepas de DENV-1 e DENV-2 não neuroadaptadas e inoculadas pelas vias IV ou IP detectaram viremia do 2º ao 11º dia pós-infecção (Barth *et al.*, 2006; Paes *et al.*, 2005;), além de alterações teciduais similares àsquelas observadas em casos humanos (Barth *et al.*, 2006; Barreto *et al.*, 2007, 2009; Paes *et al.*, 2009; Rasinhas, 2013; Jácome, 2015b).

Alterações em tecido pulmonar durante a infecção pelos DENV são comumente observadas, caracterizadas principalmente por pneumonite, hemoptise, hemorragia pulmonar e congestão de septos alveolares (Bhamarapavati, Tuchinda e Boonpucknavick, 1967; Guzman *et al.*, 1990; Setlik *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Marchiori *et al.*, 2009).

Neste estudo, as análises morfológicas de pulmão de camundongos BALB/c quando infectados com DENV-3 revelaram pneumonia intersticial, infiltrado inflamatório peribronquiolar, focos de hemorragia parenquimal e bronquiolar, edema capilar, necrose de células intersticiais e ativação de células endoteliais, plaquetas, célula inflamatória mononucleada e célula inflamatória polimorfonucleada, evidenciada pela emissão de prolongamentos de membrana citoplasmática. Estas alterações assemelham-se às observadas a partir de 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).

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) e Jácome (2015b), que observaram espessamento de septo interalveolar, focos de hemorragia, 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-2 não neuroadaptado e com os resultados preliminares (não publicados) de experimentos realizados com o DENV-1. No entanto, até onde sabemos, este é o primeiro relato de necrose de células intersticiais pulmonares em infecção por DENV. 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 3 das 12 amostras de pulmão de camundongos BALB/c infectados. Embora a

média dos títulos encontrados ($3,94 \times 10^4$) fosse menor que o inoculado, a detecção do RNA sugere que houve disseminação viral.

A disfunção hepática é um aspecto comum durante a infecção por DENV e o envolvimento do fígado na patogênese da infecção é demonstrado pelo aumento dos níveis das transaminases TGO e TGP, lesão tecidual, presença de antígenos e RNA do DENV em amostras provenientes de casos humanos (Bhamarapavati e Halstead, 1964; Bhamarapavati, Tuchinda e Boonpucknavik, 1967; Burke, 1968; Kuo *et al.*, 1992.; Kalayanarooj *et al.*, 1997; Miagostovich *et al.*, 1997; Nguyen, Nguyen e Tieu, 1997; Rosen, Khin e Tin, 1989; Rosen, Drouet e Deubel 1999; Wang *et al.*, 1990; Póvoa *et al.*, 2014). Os achados histopatológicos relatados 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;). Essas lesões podem ser consequência direta da presença do DENV e/ou resultantes de uma resposta imune exacerbada (Costa *et al.*, 2013).

Em nossas análises de tecido hepático, diferentes alterações foram observadas e corroboram as pontuadas por Basílio-de-Oliveira (2005) e Póvoa (2014) que, a partir de casos humanos, detectaram inclusões lipídicas na região perinuclear de hepatócitos, microesteatose e macroesteatose, infiltrado celular no espaço periportal, infiltrado inflamatório no interstício, focos de hemorragia e degeneração nuclear. O espessamento de mitocôndrias, indicativo de processo apoptótico e reportado em estudos realizados com cultura de células HepG2 (El-Bacha *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, como alterações de funções hepáticas e da morfologia do tecido também é observado (Chen *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012). Infiltrado de células inflamatórias, congestão de capilares sinusóides, congestão vascular, inclusões semelhantes a lipídeos, focos de hemorragia e microesteatose, 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, 2015b). Necrose, acúmulo de líquido no capilar e hiperplasia de células de Kupffer (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2005) não foram verificados durante este estudo.

Observamos 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 comprovada.

A presença do DENV já foi verificada em amostras de fígado humano e murino através da detecção do genoma viral, do antígeno viral ou da fita complementar do RNA do vírus (Miagostovich *et al.*, 1997; Barreto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2005, 2009; de Macedo *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014). Neste estudo, a fita positiva RNA do DENV-3 pôde ser detectada em 4 das 12 amostras de fígado de camundongos BALB/c infectados, com média dos títulos igual a $4,76 \times 10^4$ cópias/mL. A detecção do DENV em amostras de fígado através de MET já foi descrita por Limonta e colaboradores (2012). Embora o RNA do DENV tenha sido detectado, a presença de partículas virais não puderam ser verificadas devido a fixação insatisfatória do órgão.

O envolvimento do tecido muscular cardíaco na infecção pelos DENV não é incomum e as manifestações clínicas associadas à DEN podem variar amplamente, desde a bradicardia assintomática a miocardite fatal (Sheetal e Jacob, 2016). Diversos estudos já reportaram arritmias, hipotensão, miocardite, depressão miocárdica, com sintomas de insuficiência cardíaca e choque e pericardite (Lee, Teo e Low, 2009; Miranda *et al.*, 2013; Shivanthan *et al.*, 2015; Sheetal e Jacob, 2016). O envolvimento do miocárdio pode ser resultado direto da infecção pelo DENV, porém múltiplos fatores, tais quais citocinas, e/ou mediadores celulares da resposta imune podem representar importante papel na patogênese da miocardite viral (Pelupessy, Allo e Jota, 1989; Dhan *et al.*, 1990; Kasim *et al.*, 1991; Matsumoria e Sasayama, 1995).

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 e 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 e infiltrado de células inflamatórias mononucleares (Weerakoon *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013; Póvoa *et al.*, 2014), também observadas neste estudo, em amostras de coração de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com DENV-3. Sinais de edema intersticial, hemorragia, infiltração de neutrófilos e eosinófilos e degeneração nuclear, com alterações na mitocôndria e presença de núcleos picnóticos, já reportados (Weerakoon *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2013; Póvoa *et al.*, 2014), não foi verificado em nossas análises prévias. Tomados em conjunto, tais achados sugerem que a infecção direta do DENV do miocárdio pode ser responsável, pelo menos em parte, pela disfunção cardíaca.

No presente estudo, as análises morfológicas a partir de amostras de coração de camundongos BALB/c inoculados pela via IV com DENV-3 revelaram presença de células inflamatórias mononucleares e plaquetas no interstício, degeneração das fibras do miocárdio, com sinais de fibrose e desarranjo das mesmas. Ativação de células endoteliais e células inflamatórias mononucleares, evidenciada pelo espessamento de citoplasma e emissão de prolongamentos de membrana citoplasmática também foi observada. Tais resultados corroboram os achados de Rasinhas (2013) e Jácome (2015a) ao estudarem amostras de coração BALB/c infectados por DENV-1, -2 e -3 pela via intravenosa. Nesse estudo, entretanto, não foi possível observar acúmulo de líquido no capilar, produção de vesículas de transporte e presença de PSD em células endoteliais e cardiomiócitos, como descrito por esses autores.

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) e o antígeno viral foi identificado em células inflamatórias nesse órgão (Miranda *et al.*, 2013; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005). Embora no presente estudo, não tenha sido detectada a presença da fita positiva do RNA viral e nem PSD em células endoteliais e/ou cardíacas em nenhum dos animais testados, os resultados aqui apresentados são preliminares e mais amostras de coração de camundongos BALB/c infectados com DENV-3 serão processadas e testadas para análises por MET e RT-PCR em tempo real.

A relação entre a infecção por DENV e desenvolvimento de distúrbios no sistema nervoso central (SNC) foi descrita pela primeira vez em 1976, por Sanguansermisri e colaboradores (Sanguansermisri *et al.*, 1976) e mais tarde por Gulati e Maheshwari (2007). As manifestações neurológicas em pacientes com DEN são diversas, incluindo convulsões febris, encefalopatia, encefalite, meningite asséptica, trombose e hemorragias e intracranianas,

efusões subdurais, mononeuropatias, polineuropatias, síndrome de Guillain-Barré e transmielite (Verma, Sahu e Holla, 2014; Aggarwal, Kumar e Faridi, 2016). Os fatores envolvidos na fisiopatologia das lesões são diversos e incluem lesão tecidual direta causada pelo vírus devido a sua neurotropicidade, hemorragia capilar, coagulação intravascular disseminada e distúrbios metabólicos (Lum *et al.*, 1996; Gulati e Maheshwari, 2007). Ademais, casos de paraparesia, quadriparesia e hemiplagia, ainda que reversíveis, já foram observados em humanos infectados pelos DENV (Gutch, Aggarwal e Amar, 2012).

A gravidade da doença neurológica causada pelos diferentes sorotipos de DENV tem sido analisada em vários estudos e o DENV-2 e -3 têm sido apontados como os principais causadores de sintomas neurológicos (Lum *et al.*, 1996, Row, Weinstein, e Murray-Smith, 1996, Hommel *et al.*, 1998).

Nenhum sinal de alteração neurológica foi observado nos camundongos infectados pela cepa de DENV-3 durante o período entre a infecção e eutanásia. Entretanto, sinais de encefalite, paralisia e cegueira já foram reportados em trabalhos desenvolvidos com camundongos (Falgout *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Johnson e Roehrig, 1999; Huang *et al.*, 2000; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2013). Tal fato pode estar relacionado à via de inoculação invasiva escolhida ou à escolha de camundongos humanizados ou imunodeficientes como modelo experimental.

Neste estudo, as alterações morfológicas observadas em amostras de cerebelo foram: distribuição heterogênea dos neurônios de Purkinje, com perda da linearidade da camada, focos de hemorragia e presença de eritrócitos no interstício, celularidade exacerbada na substância branca, sinais de degeneração celular, com presença de núcleos picnóticos, ativação do endotélio, caracterizada pela produção de vesículas de transporte, sinais sutis de necrose de célula endotelial e células do interstício e intensa atividade proteica em células intersticiais, evidenciada pelo espessamento do retículo endoplasmático rugoso e presença de inúmeros ribossomos eletrondensos. Além disso, pode-se observar presença de células inflamatórias mononucleares no interstício e aderidas ao endotélio ativado. Dentre as alterações teciduais verificadas, a que se assemelha aos achados de Jácome (2015b), que utilizou camundongos BALB/c infectados com duas linhagens de DENV-2 não-neuroadaptado, é a presença de vesículas de transporte no citoplasma de células endoteliais. Além disso, acúmulo de líquido no lúmen de capilares e no espaço perivascular, infiltrado inflamatório mononuclear e plaquetas circulantes nos capilares já foram reportados (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Jácome, 2015b), porém tais alterações não puderam ser analisadas neste estudo devido ao estado de preservação insatisfatório do tecido.

Neste estudo, o RNA viral foi detectado em amostras de cerebelo dos camundongos infectados por DENV-3. Das 12 amostras testadas, 3 foram positivas (42,85%) e os títulos variaram entre $2,65 \times 10^4$ e $2,23 \times 10^5$ cópias de RNA/mL, com média igual a $2,66 \times 10^4$. Tanto o genoma quanto antígenos virais do DENV já foram detectados em amostras de cérebro de camundongos infectados experimentalmente (Lin *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Johnson e Roehrig, 1999; Barreto *et al.*, 2004; Shresta *et al.*, 2006), e a partir de casos fatais humanos (Miagostovich *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011). Através de MET, Limonta e colaboradores (2012) detectaram PSD em uma amostra proveniente de caso humano de óbito e Sriurairatna e colaboradores (1973), em cérebro de camundongos neonatos infectados intracranialmente. Tais resultados sugerem que o DENV pode infectar células do SNC tanto em humanos quanto em camundongos.

Diversas formas de comprometimento renal têm sido identificadas em pacientes com DEN, incluindo elevação do nível de creatinina sérica, síndrome renal aguda, necrose tubular aguda, síndrome urêmica hemolítica, proteinúria, glomerulopatia e síndrome nefrótica (Horvath, McBride e 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 e Nayer, 2014; Oliveira e 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, rbdomiólise, hemólise e lesão glomerular aguda (Lima e Nogueira, 2008).

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, edema 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 imuno-histoquímica 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

apenas 1 das 12 amostras testadas. Além disso, PSDs 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 células endoteliais desempenham papel importante na patogênese da FHD (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Dalrymple e Mackow, 2012) e trabalhos prévios em cultura celular demonstraram que os DENV modulam a função de células endoteliais por ação direta e/ou indireta (Avirutnan *et al.*, 1998; Rothman e Ennis, 1999; King *et al.*, 2000). Neste trabalho, células endoteliais de capilares sanguíneos no pulmão, coração e cerebelo exibiram prolongamentos de membrana citoplasmática, espessamento de citoplasma e produção de vesículas de transporte. De acordo com Feroze (1997), a presença de um grande número de vacúolos endocíticos e prolongamentos de membrana em células endoteliais podem ser indicativos de ativação das mesmas. Sugere-se que estas células são permissíveis à replicação de DENV 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.

O envolvimento do baço durante a infecção pelos DENV já foi reportado (Gulati e *et al.*, 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 e Maheshwari, 2007; de Moura Mendonça *et al.*, 2011; Bhaskar e Moorthy, 2012; Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Neste estudo, o genoma viral foi detectado em 1 amostra de baço de camundongo BALB/c infectado com DENV-3, apresentando o maior título recuperado durante este estudo. 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). Além disso, um estudo prévio com modelo murino também reportou a presença do vírus neste órgão (Shresta *et al.*, 2006).

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 na maioria dos órgãos testados por RT-PCR em tempo real e identificação de PSD em célula intersticial renal. Por fim, mais estudos são necessários buscando a consolidação deste modelo e um maior entendimento da fisiopatogenia do DENV-3, através de testes imunológicos e bioquímicos.

7. CONCLUSÕES

- Alterações morfológicas já descritas no pulmão, coração, fígado e rim de casos humanos de infecção por DENV também foram observadas nestes órgãos de camundongos BALB/c infectados por DENV-3 pela via intravenosa.
- Não foram observadas diferenças no perfil das alterações morfológicas induzidas por DENV-3 no pulmão de camundongos infectados, quando comparado com estudos prévios realizados pelo Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral com cepas de DENV-1 e DENV-2; porém, ao contrário destes, focos de necrose foram observados em células intersticiais pulmonares.
- 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.
- O genoma viral foi detectado na maioria dos órgãos testados por RT-PCR em tempo real, com exceção do coração 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.
- Através deste trabalho e dos resultados divulgados, concluímos que o camundongo BALB/c foi susceptível à cepa de DENV-3 epidêmica e não neuroadaptada utilizada na infecção experimental e pode ser utilizado como modelo animal para estudos de monoinfecção pelo DENV.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar nova experimentação animal, a fim de obter amostras de fígado e cerebelo em melhores condições de fixação para análise por MET.
- Detectar e titular o RNA viral a partir de mais amostras de macerados de órgãos, soro e saliva de camundongos BALB/c infectados com DENV-3 através de RT-PCR em tempo real.
- Fenotipar o infiltrado inflamatório induzido pela infecção por DENV-3 nos diferentes órgãos de camundongos BALB/c.
- Realizar estudos histomorfométricos em amostras dos diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados com DENV-3, objetivando mensurar as alterações morfológicas.
- Verificar a presença de partículas dos DENV assim como sua biossíntese em células de diferentes órgãos de camundongos infectados, através da técnica de imunomicroscopia.
- Realizar sorologia a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c infectados com DENV-3, a fim de avaliar a produção e dosagem de anticorpos.
- Realizar testes bioquímicos a partir de amostras de soro de camundongos BALB/c infectados com DENV-3 objetivando a avaliação da função hepática e dosagem das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase.
- Realizar ensaios de citometria de fluxo e imunomarcção objetivando identificação e dosagem de diferentes citocinas envolvidas na infecção por DENV a partir de amostras de soro e de diferentes órgãos de camundongos infectados com DENV-3.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, A., Kumar, P., Faridi, M. M. A. (2015). Neurological manifestation as presenting feature of dengue infection. *J Pediatr Neurosci.* 10(1): 76–77.
- Alexander-Miller, M.A., Leggatt, G.R., Berzofsky, J.A. (1996). 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*;93(9):4102-7. Epub 1996/04/30.
- Amorim, J.H., Alves, R.P., Boscardin, S.B., Ferreira, L.C. (2014). The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res.*;181:53-60. Epub 2014 Jan 13.
- An, J., Kimura-Kuroda, J., Hirabayashi, Y., Yasui, K. (1999) Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology*; 263(1): 70-7.
- Araújo, F.M., Nogueira, R.M., de Araújo, J.M., Ramalho, I.L., Roriz, M.L., de Melo, M.E. e Coelho, I.C. (2006). Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 101(8): 925-8
- Araújo, J.M., Nogueira, R.M., Schatzmayr, H.G., Zanotto, P.M., Bello, G. (2009). Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*; 9(4): 71625
- Ashour, J., Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Belicha-Villanueva, A., Plumlee, C.R., BernalRubio, D., Williams, K.L., Harris, E., Fernandez-Sesma, A., Schindler, C., García-Sastre, A. (2010). Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. *Cell Host Microbe.*; 8(5): 410-21.
- Atrasheuskaya, A., Petzelbauer P., Fredeking, T.M., Ignatyev, G. (2003). Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immun and Med Microbiol.*; 35: 33-42.
- Avirutnan, P., Malasit, P., Seliger, B., Bhakdi, S., Husmann, M. (1998) Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J.Immunol.*161, 6338 - 6346.
- Balsitis, S.J., Coloma, J., Castro, G., Alava, A., Flores, D. (2009). Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3–specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg.* 80: 416–424.
- Balsitis, S.J., Williams, K.L., Lachica, R., Flores, D., Kyle, J.L., Mehlhop, E., Johnson, S., Diamond, M.S., Beatty, P.R., Harris, E. (2010). Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog.*; 6(2): e1000790.
- Barreto DF, Takiya CM, Paes MV, Farias-Filho J, Pinhão AT, Alves AM, Costa SM, Barth OM (2004). Histopathological aspects of Dengue-2 virus infected mice tissues and complementary virus isolation. *J Submicrosc Cytol Pathol Apr*;36(2):121-30.
- Barreto, D.F., Takiya, C.M., Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M., Farias-Filho, J.C., Barth, O.M. (2007). Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with denguevirus serotype 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 102(2): 175-82.
- Barreto, D.F, Schatzmayr, H.G, Takiya, C.M., Jácome, F.C.; Silva, M.E.V., Faria, N.R.C., Nogueira, R.M.R, Barth, O.M. (2009). Histopathological and ultrastructural studies of lung tissue of mice reinfected with dengue virus serotype 1 or 2. *Virus Reviews and Research.*; 14: 21-32.
- Barth, O.M., Barreto, D.F., Paes, M.V., Takiya, C.M., Pinhão, A.T., Schatzmayr, H.G. (2006). Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 101(8): 905-15.
- Basílio-de-Oliveira, C.A., Aguiar, G.R., Baldanza, M.S., Barth, O.M., Eyer-Silva, W.A., Paes, M.V. (2005). Pathologic Study of a Fatal Case of Dengue-3 Virus Infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.*; 9(4): 341-7

- Bente, D.A., Melkus, M.W., Garcia, J.V., Rico-Hesse, R. (2005). Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol*; 79(21): 13797-9.
- Bhamarapavati, N., Halstead, S.B. (1964). Studies on dengue virus infection I. Immunofluorescence localization of virus in mouse tissue. *Arch. Pathol.* 77, 538 – 543.
- Bhamarapavati, N., Tuchinda, P., Boonpucknavik, V. (1967) Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol.* 61: 500–510.
- Bhamarapavati, N. (1989). Homostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 11(Suppl. 4): S826-829.
- Bhamarapavati, N. (1993). Pathology of dengue haemorrhagic fever. In P Thong-charoen, *Monograph on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever.* WHO-SEARO, New Delhi 22:72-79.
- Bhaskar, E., Moorthy, S. (2012). Spontaneous splenic rupture in dengue fever with non-fatal outcome in an adult. *J Infect Dev Ctries*; 6(4): 369-72
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J. e Hay, S.I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*; 496(7446): 504-7.
- Bhoi, S.K., Naik, S., Kumar, S., Phadke, R.V., Kalita, J., Misra, U.K. (2014). Cranial imaging findings in dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2014; 342(1-2): 36-41.
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87(2), 125–148.
- Boonpucknavig, V., Bhamarapavati, N., Boonpucknavig, S., Futrakul, P., Tanpaichitr, P. (1976). Glomerular changes in dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med*;100:206–12
- Brinton, M. (1986). Replication of flavivirus. In: *The Togaviridae and Flaviviridae* (S. Schlesinger & M. Schlesinger, eds.). New York: Plenum Press [S.I.], 327-365.
- Burke, T. (1968) Dengue haemorrhagic fever: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 682–692.
- Burke, D.S., Nisalak, A., Johnson, D.E., Scott, R.M. (1988). A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 38: 172-180
- Calisher. (1989). Printed in Great Britain Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *J. gen. Virol.* Vol: 70, 37-43.
- Cam, B.V., Fonsmark, L., Hue, N.B., Phuong, N.T., Poulsen, A., Heegaard, E.D. (2001). Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.*; 65(6): 848-51
- Cao-Lormeau, V.-M. (2009). Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology Journal*, 6, 35.
- Cavalcanti, L.P., Vilar, D., Souza-Santos, R., Teixeira, M.G. (2011). Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*; 17(1): 132-4
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2016). Dengue. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/>. Acesso em 30 out. 2016
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., Marks, R.M.. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*; 3(8): 866-71.

- Chen, H.C., Lai, S.Y., Sung, J.M., Lee, S.H., Lin, Y.C., Wang, W.K., Chen, Y.C., Kao, C.L., King, C.C., Wu-Hsieh, B.A. (2004). Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol.*; 73(3): 419-31
- Chen, H.C., Hofman, F.M., Kung, J.T., Lin, Y.D., Wu-Hsieh, B.A. (2007). Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol.*; 81(11): 5518-26.
- Clyde, K., Kyle, J.L., e Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.*; 80(23): 11418-31.
- Costa, S.M., Paes, M.V., Barreto, D.F., Pinhão, A.T., Barth, O.M., Queiroz, J.L., Armôa, G.R., Freire, M.S., Alves, A.M. (2006). 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*; 24(2): 195-205.
- Costa, V.V., Fagundes, C.T., da Glória de Souza, D., Teixeira, M.M. (2013) Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection: Protection versus Disease Induction. *Am J Pathol.* 182: 1950–51.
- Cox, J., Mota, J., Sukupolvi-Petty, S., Diamond, M.S., Rico-Hesse, R. (2012). Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. *J Virol.*; 86(14): 7637-49.
- Cunha, R.V. e Nogueira, R.M.R. (2005). Dengue e Dengue Hemorrágico.. In: Coura JR (ed). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara. p. 1767- 1781
- Dalrymple, N.A e Mackow, E.R. (2012). Roles for Endothelial Cells in Dengue Virus Infection. *Advances in Virology*, 8(8): e840654
- de Macedo, F.C., Nicol, A.F., Cooper, L.D., Yearsley, M., Pires, A.R., Nuovo, G.J. (2006) Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol.*15(4):223-8
- De Moura Mendonça, L.S., de Moura Mendonça, M.L., Parrode, N., Barbosa, M., Cardoso, R.M., de Araújo-Filho, J.A. (2011). Splenic rupture in dengue hemorrhagic fever: report of a case and review. *Jpn J Infect Dis*; 64(4): 330-2.
- del Angel, R.M., Reyes-del Valle, J. (2013) Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10)
- Dhan, R., Khanna, M., Chaturvedi, U.C., Mathur, A. (1990). Effect of dengue virus-induced cytotoxin on capillary permeability. *J Exp Pathol.* 71: 83-88.
- Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Tangthawornchaikul, N., Malasit, P. (2010). Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Nat Acad Sci USA*;107(39):16922-7. Epub 2010/09/15.
- Edelman, R. e Hombach, J. (2008). Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas: summary of a World Health Organization Technical Consultation. *Vaccine*; 26(33): 4113-9
- El-Bacha, T., Midlej, V., Pereira da Silva, A.P., Silva da Costa, L., Benchimol, M., Galina, A., Da Poian, A.T. (2007). Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim Biophys Acta.* 1772(10): 1158-66.
- Eram, S., Setyabudi, Y., Sadono, T.I., Sutrisno, D.S., Gubler, D.J., Sulianti Saroso, J. (1979). Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. II. Clinical Studies. *Am J Trop Med Hyg*; 28, 711-716.
- Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S.P., Yin, Z., Keller, T.H., Vasudevan, S.G., Hommel, U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. 2006. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol: 13(4) 372–373

- Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J.J., Lai, C.J. (1990). Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol.*; 64(9): 4356-63
- Feroze, N.G. (1997). *Ultrastructural Pathology on the Cell and Matrix*, 4th ed., p. 619-1414
- Frias-Staheli, N., Dorner, M., Marukian, S., Billerbeck, E., Labitt, R.N., Rice, C.M., Ploss, A. (2014). Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. *J Virol*; 88(4): 2205-18
- Gonçalves, D., Prado, R.Q., Xavier, E.A., de Oliveira, N.C., Guedes, P.M.M., da Silva, J.S., Figueiredo, L.T.M., Aquino, V.H. (2012). Immunocompetent Mice Model for Dengue Virus Infection. *Sci Wld J*; .525947.
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Koonin, E. V., e Blinov, V. M. (1989). N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res*, 17(10), 3889–3897.
- Gubler, D.J. e Clark, G.G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1(2): 55-7
- Gubler, D.J. (1997) Human behaviour and cultural context in disease control. *Trop Med Int Health*. 2(11): A1-2.
- Gubler, D.J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin. Microbiol. Rev.*; 11(3): 480-496.
- Gubler, D.J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*; 10(2):100-3.
- Gubler, D.J. (2006). Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp*. 277: 3-16
- Gulati, S., Maheshwari, A. (2007). Atypical manifestations of dengue. *Trop Med Int Health*. (9):1087-95.
- Gutch, M., Aggarwal, A., Amar, A. (2012). Hypokalemic quadriparesis: An unusual manifestation of dengue fever. *J Nat Sci Biol Med.*; 3(1): 81–83
- Gutierrez, G., Standish, K., Narvaez, F., Perez, M. A., Saborio, S., Elizondo, D., Harris, E. (2011). Unusual Dengue Virus 3 Epidemic in Nicaragua, 2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(11), e1394.
- Guzman, M.G., Kouri, G.P., Bravo, J., Soler, M., Vazquez, S., Morier, L. (1990). Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: A retrospective seroepidemiologic study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 42(2):179-84.
- Guzmán, M.G. e Kouri G. (2003). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*; 27(1): 1-13.
- Guzmán, M.G., Peláez, O., Kourí, G., Quintana, I., Vázquez, S., Pentón, M., Avila, L.C.; Grupo Multidisciplinario para el Control de la Epidemia de Dengue 2001-2002. (2006). [Final characterization of and lessons learned from the dengue 3 epidemic in Cuba, 2001-2002]. *Rev Panam Salud Publica*. 19(4):282-9.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martínez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons, C., Yoksan, S. e Peeling, R.W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 8(12): 7-16.
- Guzman, M.G. e Harris, E. (2015). Dengue. *Lancet*. 385: 453–65
- Halstead, S.B. (1992). The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *Rapp Trimest Statist Sanit Mondo*; 45: 292-8
- Halstead, S.B. (2003). Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses. *Advances in Virus Research: Academic Press*; 2003. p. 421-67.

- Harris, E., Videia, E., Pérez, L., Sandoval, E., Téllez, Y., Pérez, M.L., Cuadra, R., Rocha, J., Idiaquez, W., Alonso, R.E., Delgado, M.A., Campo, L.A., Acevedo, F., Gonzalez, A., Amador, J.J., Balmaseda, A. (2000). Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 63(1-2):5-11
- Henchal, E.A., Gentry, M.K., McCown, J.M., Brandt, W.E. (1982). Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg.*;31(4):830-6.
- Hommel, D., Talarmin, A., Deubel, V., Reynes, J.M., Drouet, M.T., Sarthou, J.L., Hulin, A. (1998). Dengue encephalitis in French Guiana. *Res Virol.* 149(4):235-8
- Horstick, O., Martinez, E., Guzman, M.G., Martin, J.L., Ranzinger, S.R. (2015). WHO Dengue Case Classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathog Glob Health.*
- Horvath, R., McBride, W.J.H., Hanna, J.N. (1999). Clinical features of hospitalized patients during dengue-3 epidemic in far North Queensland 1997–1999. *Dengue Bull*; 23: 24–29
- Hotta, H., Murakami, I., Miyasaki, K., Takeda, Y., Shirane, H., Hotta, S. (1981). Localization of dengue virus in nude mice. *Microbiol Immunol* 25: 89-93
- Huang, K.J., Li, S.Y., Chen, S.C., Liu, H.S., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Liu, C.C., Lei, H.Y. (2000). Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol.* 81(9): 2177- 82.
- Huerre, M.R., Lan, N.T., Marianneau, P., Hue, N.B., Khun, H., Hung, N.T., Khen, N.T., Drouet, M.T., Huong, V.T., Ha, D.Q., Buisson, Y., Deubel, V. (2001) Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch.* 438: 107–115.
- Humphrey, C.D., Pittman, E.E. (1974). A simple methylene blue-azure-II basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol.* 49: 9
- Jácome, F.C. , dos Santos, F.B , Rasinhas, A.C. , Silva, M. A. N. , Nunes P.G , Barth, O.M , Barreto, D.F. (2015a). Heart Compromise and Detection of Dengue Virus-Like Particles in Cardiac Tissue of Experimentally Infected Murine Model. *International Journal of Research Studies in Biosciences.* v. 3, p. 101-109.
- Jácome, F.C. Análise de viremia e ultraestrutural de linhagens do vírus dengue tipo 2 (DENV-2) em camundongos BALB/c . 2015b. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2015
- Jaiswal, S., Pearson, T., Friberg, H., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Rothman, A.L., Mathew, A. (2009). Dengue virus infection and virus-specific HLA-A2 restricted immune responses in humanized NOD-scid IL2rgammanull mice. *PLoS One.*; 4(10): 7251.
- Jaiswal, S., Pazoles, P., Woda, M., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Brehm, M.A., Mathew, A. (2012) Enhanced humoral and HLA-A2-restricted dengue virus-specific T-cell responses in humanized BLT NSG mice. *Immunology.*; 136(3): 334-43.
- Jessie, K., Fong, M.Y., Devi, S., Lam, S.K., Wong, K.T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*; 189(8): 1411-1418.
- Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., Smith, D.R. (2004). Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.*; 149(5): 915-27.4
- Johnson, A.J. e Roehrig, J.T. (1999). New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol.*; 73(1): 783-6.
- Jones, C.T., Patkar, C.G., e Kuhn, R.J. (2005). Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 331, 247-259

- Juffrie, M., Meer, D.M., Hack, C.E., Haasnoot, K., Sutaryo Veerman, A.J., Thijs, L.G. (2000). Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun* 68: 702-707.
- Kalayanaroj, S., Vaughn, D.W., Nimmannitya, S., Green, S., Suntayakorn, S., Kunentrasai, N., Viramitrachai, W. (1997). Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J. Infect. Dis.* 176, 313–321.
- Kasim, Y.A., Anky, Tri Rini, K.E., Sumarmo, S.P. (1991). Hyperventilation in children with Dengue Haemorrhagic Fever (DHF). *Paediatr Indones.* 1991; 31: 245–252.
- King, A.D., Nisalak, A., Kalayanaroj, 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.
- King, C.A., Marshall, J.S., Alshufara, H., Anderson, R. (2000) Release of vasoactive cytokines by antibody enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J. Virol.* 74, 7156 - 7160.
- Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J., Westaway, E.G. (2001). Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J. Virol.* 75: 6719-6728.
- Kularatne, S.A., Gawarammana, I.B., Kumarasiri, P.R. (2005) 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*; 36: 686-692.
- Kularatne, S.A., Imbulpitaya, I.V., Abeysekera, R.A., Waduge, R.N., Rajapakse, R.P., Weerakoon, K.G. (2014) Extensive haemorrhagic necrosis of liver is an unpredictable fatal complication in dengue infection: a postmortem study. *BMC Infect Dis.* 14: 141
- Kuo, C.H., Tai, D.I., Chang-Chien, C.S., Lan, C.K., Chiou, S.S., Liaw, Y.F. (1992). Liver biochemical tests and dengue fever. *Am J Trop Med Hyg.*; 47(3): 265-70.
- Kuruville, J.G., Troyer, R.M., Devi, S., Akkina, R. (2007). Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology*; 369(1): 143-52
- Laoprasopwattana, K., Pruekprasert, P., Dissaneewate, P., Geater, A., Vachvanichsanong, P. (2010) Outcome of dengue hemorrhagic fever-caused acute kidney injury in Thai children. *J Pediatr.* 57: 303–9.
- Larreal, Y., Valero, N., Estévez, J., Reyes, I., Maldonado, M., Espina, L.M., Arias, J., Meleán, E., Añez, G., Atencio, R. (2005). Hepatic alterations in patients with dengue. *Invest Clin.* 46(2):169-78.
- Lee, C.H., Teo, C., Low, A.F. (2009) Fulminant dengue myocarditis masquerading as acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 136(3): 69-71. Epub 2008 Aug 13.
- Legrand, N., Ploss, A., Balling, R., Becker, P.D., Borsotti, C., Brezillon, N., Debarry, J., de Jong, Y., Deng, H., Di Santo, J.P., Eisenbarth, S., Eynon, E., Flavell, R.A., Guzman, C.A., Huntington, N.D., Kremsdorf, D., Manns, M.P., Manz, M.G., Mention, J.J., Ott, M., Rathinam, C., Rice, C.M., Rongvaux, A., Stevens, S., Spits, H., Strick-Marchand, H., Takizawa, H., van Lent, A.U., Wang, C., Weijer, K., Willinger, T., Ziegler, P. (2009). Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe.*; 6(1): 5-9
- Leung, D., Schroder, K., White, H., Fang, N-X., Stoermer, M.J., Abbenate, G., Martin, J.L., Young, P.R., Fairlie, DP. (2001) 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*; 276 49 pp. 45762–45771.
- Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E., e Padmanabhan, R. (1999). 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*; 73(4), 3108–3116.
- Li, X.F., Deng, Y.Q., Zhao, H., Ye, Q., Wang, H.J., Li, S.H., Zhu, S.Y., Shi, P.Y., Qin, E.D., Zhang, B., Qin, C.F. (2013). Noninvasive bioluminescence imaging of dengue virus infection in the brain of A129 mice. *Appl Microbiol Biotechnol.*; 97(10): 4589-96.

- Ligon, B.L. (2005). Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever: A Review of the History, Transmission, Treatment, and Prevention. *Semin Pediatr Infect Dis.* Jan;16(1):60-5
- Lima, E.Q., Nogueira, M.L. (2008). Viral hemorrhagic fever-induced acute kidney injury. *Semin Nephrol*; 28: 409–415
- Lima, M. da R. Q., Nogueira, R. M. R., Schatzmayr, H. G., & dos Santos, F. B. (2010). Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*; 4(7), e738.
- Lima, M.R., Nogueira, R.M., Schatzmayr, H.G., de Filippis, A.M., Limonta, D., dos Santos, F.B. (2011) A new approach to dengue fatal cases diagnosis ns1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl Trop Dis.*; 5(5): e1147
- Limonta, D., Falcón, V., Torres, G., Capó, V., Menéndez, I., Rosario, D., Castellanos, Y., Alvarez, M., RodríguezRoche, R., de la Rosa, M.C., Pavón, A., López, L., González, K., Guillén, G., Diaz, J., Guzmán, M.G. (2012). Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. *Infection.* 40(6): 689-94.
- Lin, Y.L., Liao, C.L., Chen, L.K., Yeh, C.T., Liu, C.I, Ma, S.H, Huang, Y.Y., Huang, Y.L., Kao, C.L., King, C.C. (1998). Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol.*; 72(12): 9729-37.
- Lindenbach, B. D. e Rice, C. M. (2001). *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.
- Lizarraga, K., Nayer, A. (2014). Dengue-associated kidney disease. *Journal of Nephropathology*, 3(2), 57–62.
- Lombardi, R., Yu, L., Younes-Ibrahim, M., Schor, N., Burdman, E.A. (2008). Epidemiology of acute kidney injury in Latin America. *Semin Nephrol*; 28: 320–329
- Lozach, P.Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J.L., Rey, F.A., Desprès, P., Arenzana-Seisdedos, F., Amara, A. (2005). 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.* 280:23698–23708.
- Lum, L.C., Lam, S.K., Choy, Y.S., George, R., Harun, F. (1996) Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg.*; 54: 256-9
- Malik, R., Gogna, A., Meher, J., Singh, K.K., Sharma, S.K. (2014). Dengue encephalopathy - still an enigma? *Infect Dev Ctries.*; 8(8): 1076-8.
- Marchiori, E., Ferreira, J.L.N., Bittencourt, C.N., Araújo Neto, C.A., Zanetti, G., Mano, C.M., Santos, A.A.S.D., Vianna, A.D. (2009). Pulmonary hemorrhage syndrome associated with dengue fever, High-resolution computed tomography findings: a case report. *Orphanet J Rare Dis.* 4: 8.
- Mathew, A. e Rothman, A.L. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological Reviews.* 2008;225(1):300-13.
- Matsumoria, A., Sasayama, S. (1995). Immunomodulating agents for the management of heart failure with myocarditis and cardiomyopathy—lesson from animal experiments. *Eur Heart J.* 16: 140–143.
- McArthur, M. A., Sztein, M. B., & Edelman, R. (2013). Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. *Expert Rev of Vaccines*, 12(8), 933–953.
- Messer, W.B., Vitarana, U.T., Sivananthan, K., Elvtigala, J., Preethimala, L.D., Ramesh, R., Withana, N., Gubler, D.J., De Silva, A.M. (2002). Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 66(6):765-73.

- Miagostovich, M.P., Ramos, R.G., Nicol, A.F., Nogueira, R.M., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A.V., Marchevsky, R.S., Mesquita, R.P., Schatzmayr, H.G. (1997). Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.*; 16(4): 204-8
- Milligan, G. N., Sarathy, V. V., Infante, E., Li, L., Campbell, G. A., Beatty, P. R., Bourne, N. (2015). A Dengue Virus Type 4 Model of Disseminated Lethal Infection in AG129 Mice. *PLoS ONE*, 10(5), e0125476.
- Miranda, C.H., Borges, M.de C., Matsuno, A.K., Vilar, F.C., Gali, L.G., Volpe, G.J., Schmidt, A., PazinFilho, A., da Silva, F.M., de Castro-Jorge, L.A., de Oliveira, M.F., Saggiaro, F., Martines, R.B., da Fonseca, B.A. (2013). Evaluation of cardiac involvement during dengue viral infection. *Clin Infect Dis.*57:812-819.
- Misra UK, Kalita J, Syam UK, Dhole TN. Neurological manifestations of dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2006; 244(1-2): 117-22.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X-n., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A. (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*;9(7):921-7.
- Morrison, J., e García-Sastre, A. (2014). STAT2 signaling and dengue virus infection. *JAK-STAT*, 3(1), e27715.
- Mota, J. e Rico-Hesse, R. (2011). Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever. *PLoS One.*; 6(6): e20762.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*; 3 (1) 13-22
- Mukhopadhyay, M., Chatterjee, N., Maity, P., Patar, K. (2014). Spontaneous splenic rupture: A rare presentation of dengue fever. *Indian J Crit Care Med*; 18(2): 110-2
- Muller, D.A., Young, P.R. (2013). The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 98(2):192-208
- Munoz-Jordan, G.G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle and A. Garcia-Sastre (2003). Inhibition of interferon signaling by denguevirus. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 100 (24), pp. 14333–14338.
- Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*, 5, 299–309.
- Mustafa, M.S., Rasotgi, V., Jain, S., Gupta, V. (2015) Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India.*; 71(1):67-70
- Nguyen, T.L., Nguyen, T.H., Tieu, N.T. (1997). The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol.*; 148(4): 273-7.
- Nisalak, A., Endy, T.P., Nimmannitya, S., Kalayanarooj, S., Thisyakorn, U., Scott, R.M., Burke, D.S., Hoke, C.H., Innis, B.L., Vaughn, D.W. (2003). Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg.* 68(2):191-202.
- Nishiura, H. e Halstead, S. (2007). Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. *J Infect Dis [S.I.]*, v. 195, n. 7, p. 1007-13
- Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., Lampe, E. e Schatzmayr, H.G. (1990). Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 85(2) :253.
- Nogueira, R.M., Zagner, S.M., Martins, I.S., Lampe, E., Miagostovich, M.P. e Schatzmayr, H.G. (1991) Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 86(2): 269.

- Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Souza, R.W., Zagne, S.M. e Schatzmayr, H.G. (1993). Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes *Epidemiol Infect*; 111(1): 163-70
- Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., Schatzmayr, H.G., dos Santos, F.B., de Araújo, E.S., de Filippis, A.M., de Souza, R.V., Zagne, S.M., Nicolai, C., Baran, M., Teixeira Filho, G. (1999). Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 May-Jun;94(3):297-304.
- Nogueira, R.M., Schatzmayr, H.G., de Filippis, A.M., dos Santos, F.B., da Cunha, R.V., Coelho, J.O., de Souza, L.J., Guimarães, F.R., de Araújo, E.S., De Simone, T.S., Baran, M., Teixeira, G. Jr. e Miagostovich, M.P. (2002). Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis.*; 11(9): 1376-81
- Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Chokephaibulkit K, Perng GC. (2009). Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Publ Hlth.*; 40(2): 253-62.
- Normile D. (2013). Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*. 342:415
- Obeyesekere, I., Hermon, Y. (1973). Arbovirus heart disease: myocarditis and cardiomyopathy following dengue and chikungunya fever--a follow-up study. *Am Heart J*. 85(2): 186-94.
- Oliveira, J. F. P., Burdman, E. A. (2015). Dengue-associated acute kidney injury. *Clin Kidney J*, 8(6), 681–685.
- Osanaí, C.H., Travassos da Rosa, A.P., Tang, A.T., do Amaral, R.S., Passos, A.D. e Tauil, P.L. (1983) Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop São Paulo*; 25(1): 53-4
- Paes, M.V., Pinhão, A.T., Barreto, D.F., Costa, S.M., Oliveira, M.P, Nogueira, A.C., Takiya, C.M., Farias-Filho, J.C., Schatzmayr, H.G., Alves, A.M., Barth, O.M. (2005). Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*. 338(2): 236-46.
- Paes, M.V., Lenzi, H.L., Nogueira, A.C., Nuovo, G.J., Pinhão, A.T., Mota, E.M., Basílio-de-Oliveira, C.A., Schatzmayr, H., Barth, O.M., Alves, A.M. (2009). Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest.*; 89(10): 1140-51
- Pagliari, C., Simões Quaresma, J.A., Kanashiro-Galo, L., de Carvalho, L.V., Vitoria, W.O., da Silva, W.L., Penny, R., Vasconcelos, B.C., da Costa Vasconcelos, P.F., Duarte, M.I. (2016). Human kidney damage in fatal dengue hemorrhagic fever results of glomeruli injury mainly induced by IL17. *J Clin Virol*. 75:16-20
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. (2007). Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock 108 syndrome (DHF/DSS). *Immun Cell Biol*; 85(1):43-5. Epub 2006/11/30.
- Passos, M.N.P., Santos, L.M.J., Pereira, M.R.R., Casali, C.G., Fortes, B.P.M.D., Valencia, L.I.O., Alexandre, A.J., Medronho, R.A. (2004). 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* 37: 293-295.
- Pelupessy, J.M., Allo, E.R., Jota, S. (1989). Pericardial effusion in dengue haemorrhagic fever. *Paediatrica indonesiana* 1989; 29:72-5
- Perera, R. e Kuhn, R.J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.*; 11(4): 369-77.
- Pontes, R.J.S. e Ruffino-Netto, A. (1994). Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev Saude Publ*, 28(3), 218-227.
- Potisopon, S., Priet, S., Collet, A., Decroly, E., Canard, B., Selisko, B. (2014) The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. *Nucleic Acids Res.*; 42(18):11642-56.

- Póvoa, T.F., Alves, A.M., Oliveira, C.A., Nuovo, G.J., Chagas, V.L., Paes, M.V. (2014). The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*; 15; 9(4): e83386
- Prestwood, T.R., Prigozhin, D.M., Sharar, K.L., Zellweger, R.M., Shresta, S.A. (2008). Mousepassaged dengue virus strain with reduced affinity for heparan sulfate causes severe disease in mice by establishing increased systemic viral loads. *J Virol.*; 82(17): 8411-21.
- Rajmane, Y., Shaikh, S., Basha, K., Reddy, G.E., Nair, S., Kamath, S., Sreejesh, G., Rao, H., Ramana, V., Kumar, A.S. (2013). Infant mouse brain passaged Dengue serotype 2 virus induces non-neurological disease with inflammatory spleen collapse in AG129 mice after splenic adaptation. *Virus Res.*173(2): 386-97
- Ramos, C., Sánchez, G., Pando, R.H., Baquera, J., Hernández, D., Mota, J., Ramos, J., Flores, A., Llausás, E. (1998). Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol.* (4):465-8.
- Rasinha, A da C. (2013). 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.
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J*; 13, 131.
- Raut, C.G., Deolankar, R.P., Kolhapure, R.M., Goverdhan, M.K. (1996). Susceptibility of laboratorybred rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta Virol*; 40(3): 143-6.
- Reed, L.J. e Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percents endpoints. *Am J Hyg*; 27: 493-497.
- Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., Del Angel, R.M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.*; 79(8): 4557-67.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*;17:208-12.
- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., Strauss, J.H.(1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.*; 229(4715): 726-33
- Richardson, J., Molina-Cruz, A., Salazar, M.I., Black W 4th. (2006). Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*; 74(1): 132-41.
- Rodenhuis-Zybert, I.A, Wilchut, J. e Smith, J.M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity *Cell Mol Life Sci.* 67:2773–2786.
- Rosen, L., Khin, M.M., Tin, U. (1989). 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.* 140, 351–360.
- Rosen, L., Drouet, M.T., Deubel, V. (1999). Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 720–724.
- Rothman, A.L. e Ennis, F.A. (1999). Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.*; 257(1): 1-6.
- Row, D., Weinstein, P., Murray-Smith, S. (1996) Dengue fever with encephalopathy in Australia. *American J Trop Med Hyg*; 54, 253–255.
- Sabchareon, A., Sirivichayakul, C., Limkittikul, K., Chanthavanich, P., Suvannadabba, S., Jiwariyavej, V., Vithaya, J., Wut, D., Krisana, P., Harold, S. M., Letson, G. W. (2012). 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*, 6(7), e1732.

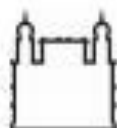
- Sabin, A.B. (1952). Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*; 1(1): 30-50.
- Salgado, D.M., Eltit, J.M., Mansfield, K., Panqueba, C., Castro, D., Vega, M.R., Xhaja, K., Schmidt, D., Martin, K.J., Allen, P.D., Rodriguez, J.A., Dinsmore, J.H., López, J.R, Bosch, I. (2010) Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 29(3): 238-42.
- Sanguanserm Sri, T., Poneprasert, B., Phornphutkul, B., Kulapongs, P., Tantachamrun, T. (1976). Acute encephalopathy associated with dengue infection. Bangkok: SEAMEO TROPMED; p. 10-1.
- Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V. e Wigg, M.D. (2008). Febre amarela e dengue. *Introdução à Virologia Humana.*, 2. Ed. (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), pp.399-408.
- Sarathy, V.V., Milligan, G.N., Bourne, N., Barret, A.D.T. (2015). Mouse models of dengue virus infection for vaccine testing. *Vaccine*. 33: 7051-7060
- Sariol, C.A. e White, L.J. (2014). Utility, limitations, and future of non-human primates for dengue research and vaccine development. *Front Immunol.*; 5: 452.
- Satarasinghe, R.L., Ramesh, R., Riyaz, A.A., Gunarathne, P.A., de Silva, A.P. (2007). Hypothyroidism is a predisposing factor for fenofibrate-induced rhabdomyolysis-patient report and literature review. *Drug Metabol Drug Interact*. 22(4): 279283.
- Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M. e Travassos da Rosa, A.P. (1986). An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81(2):245-6.
- Schlesinger, R. W. (1977). *Dengue Viruses*. *Virology Monographs*, Vol. 16 (S. GARD and C. HALLAUER, Editors). IV + 132 S., 34 Abb., 26 Tab Wien-New York Springer-Verlag.
- Scott, L.J. (2016). Tetravalent Dengue Vaccine: A Review in the Prevention of Dengue Disease. *Drugs*, 76(13):1301-12.
- Setlik, R.F., Ouellette, D., Morgan, J., McAllister, C.K., Dorsey, D., Agan, B.K. (2004). Pulmonary hemorrhage syndrome associated with an autochthonous case of dengue hemorrhagic fever. *Southern Medical Journal*. 97: 688–691
- Sheetal, S., Jacob, E. (2016). A Study on the Cardiac Manifestations of Dengue. *J Assoc Physicians India*.;64(5):30-34.
- Shivanthan, M., Navinan, M., Constantine, G., & Rajapakse, S. (2015). Cardiac involvement in dengue infection. *J Infect Develop Country*; 9(04), 338-346.
- Shresta, S., Kyle, J.L., Beatty, P.R. e Harris, E. (2004). Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*. 2: 262-273.
- Shresta. S., Sharar, K.L., Prigozhin, D.M., Beatty, P.R., Harris, E. (2006). Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol.*; 80(20): 10208-17.
- Solomon, T., Dung, N.M., Vaughn, D.W., Kneen, R., Thao, L.T.T., Raengsakulrach, B., Loan, H.T., Day, N.P.J., Farrar, J., Myint, K.S.A., Warrell. M.J., James, W.S., Nisalak, A., White, N.J. (2000). Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*.; 355(9209): 1053- 1059.
- Songco, R.S., Hayes, C.G., Leus, C.D., Manaloto, C.O. (1987). Dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Filipino children: clinical experience during the 1983-1984 epidemic. *Southeast Asian J of Trop Med & Pub Hlth*; 18: 284-290
- Souza, L.J., Coelho, J.M., Silva, E.J., Abukater, M., Almeida, F.C., Fonte, A.S., Souza, L.A. (2008). Acute hepatitis due to dengue virus in a chronic hepatitis patient. *Braz J Infect Dis.*; 12(5): 456-9.
- Sriurairatna, S., Bhamarapravati, N., Phalavadtana, O. (1973). Dengue virus infection of mice: morphology and morphogenesis of dengue type-2 virus in suckling mouse neurones. *Infect Immun*. 8(6): 1017-28.

- Sumarmo, H.W., Wulur, H., Jahja, E., Gubler, D. J., Suharyono, W., Sorensen, K. (1983). Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. *Bull WHO*; 61(4), 693–701.
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). (2009). Nota Técnica: Situação Epidemiológica. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf. Acesso em 04/05/2016
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). (2010). Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, p 231-253,
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). (2013). Situação Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525. Acesso em 04/05/2016
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). (2014). Boletim Epidemiológico - Volume 45 - nº 17 - 2014 - Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 29 de 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/04/BE-2014-45--17---Dengue-SE29.pdf>. Acesso em 04/05/2016.
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). (2015). Boletim Epidemiológico - Volume 46 - nº 44 - 2015 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf>. Acesso em 04/05/2016
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). (2016). 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. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/17/2016-016---Dengue-SE16-publica---o.pdf>. Acesso em 04/05/2016
- Tan, G. K., Ng, J. K. W., Trasti, S. L., Schul, W., Yip, G., & Alonso, S. (2010). A Non Mouse-Adapted Dengue Virus Strain as a New Model of Severe Dengue Infection in AG129 Mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(4), e672.
- Teixeira, M.G., Costa, Mda. C., Barreto, F. e Barreto, M.L. (2009). Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publ*; 25(1): 7-18.
- Temporão, J.G., Penna, G.O., Carmo, E.H., Coelho, G.E., do Socorro Silva Azevedo, R., Teixeira, M.R.N., da Costa, P.F.V. (2011). Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*;17(5):938-40
- Tristão-Sá, R. e Zagne, S.M.O. (2008). Classificação da Dengue. In: Souza LJD, editor. *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio; p. 67-74.
- Trung, D.T., Thao le, T.T., Hien, T.T., Hung, N.T., Vinh, N.N., Hien, P.T., Chinh, N.T., Simmons, C., Wills, B. (2010). Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. 83(4): 774-80
- Torres, A.F., Braga, D.N., Muniz, F., Mendonca, C., Oliveira, D.N., de Souza, E.T., Burke, A., Tavora, F. (2013) Lymphocytic myocarditis at autopsy in patients with dengue fever. *Brazil J Inf Dis* 17: 619-621
- Vannice, K.S., Roehrig, J.T. e Hombach, J. (2015). Next generation dengue vaccines: A review of the preclinical development pipeline. *Vaccine*, 34 (50), 7091-7099.
- Vannice, K.S., Durbin, A. e Hombach, J. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine*, 34 (26), 2934-2938.
- Vasilakis, N., Holmes, E. C., Fokam, E. B., Faye, O., Diallo, M., Sall, A. A., & Weaver, S. C. (2007). Evolutionary Processes among Sylvatic Dengue Type 2 Viruses . *J Virol*, 81(17), 9591–9595.
- Vasilakis, N., Cardosa, J., Hanley, K. A., Holmes, E. C., & Weaver, S. C. (2011). Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Rev Microbiol*, 9(7), 532–541.

- Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A., Nisalak, A. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 181(1):2-9.
- Verma, R., Sahu, R., Holla, V. (2014). Neurological manifestations of dengue infection: a review. *J Neurol Sci.* 346(1-2):26-34
- Wang, L.Y., Chang, W.Y., Lu, S.N., Chen, T.P. (1990). Sequential changes of serum transaminase and abnormal sonography in patients with suspected dengue fever. *Kao Hsiung Ihsueh Tsa Chih* 6, 483–489.
- Wang, C.C., Wu, C.C., Liu, J.W., Lin, A.S., Liu, S.F., Chung, Y.H., Su, M.C., Lee, I.K., Lin, M.C. (2007) Chest radiographic presentation in patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 77: 291–296.
- Weaver, S.C. e Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution* volume 9, Issue 4, Pages 523-540.
- Weerakoon, K.G.A.D., Kularatne, S.A.M., Edussuriya, D.H., Kodikara, S.K.A, Gunatilake, L.P.G, Pinto V.G., Seneviratne, A.B., Gunasena, S. (2011). Histopathological diagnosis of myocarditis in a dengue outbreak in Sri Lanka, *BMC Research Notes*, 4: 268,
- Wengler, G. e Gross, H.J. (1978). Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology*; 89(2): 423- 37.
- Wengler, G., Nowak, T. e Wahn, K. (1987). 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.* 160:210-219.
- WHO (World Health Organization). (1997). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublicacion/en/index.html>. Acesso em 04/06/2016.
- WHO (World Health Organization - US). (2009). Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control – New Edition Geneva: World Health Organization;
- WHO (World Health Organization). (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases, Pages 140. Geneva
- WHO (World Health Organization), (2014). Global Alert and Response. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>. Acesso em 04/05/2016
- Wilson, M.E e Chen L.H. (2015). Dengue: update on epidemiology. *Curr Infect Dis Rep.* 17(1): 457.
- Wu, S.J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J.R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M.K., Filgueira, L., Marovich, M.A., Wong, H.K., Blauvelt, A., Murphy, G.S., Robb, M.L., Innes, B.L., Birx, D.L., Hayes, C.G., Frankel, S.S. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. - *Nat Med.*; 6(7): 816-20.
- Yamanaka, A., Konishi, E. (2009). A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.*; 27(28): 3735-43.
- Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*; 319(5871): 1834-7
- Zellweger, R.M., Prestwood, T.R. e Shrestha, S. (2010). Antibodies enhance infection of LSECs in a model of ADE-induced severe dengue disease. *Cell Host Microbe.* Cell Host Microbe.; 7(2): 128–39.

Zompi, S. e Harris, E. (2012). Animal models of dengue virus infection. *Viruses*; 4(1): 6282

Anexo I



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